

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

**Analyse génotypique et fonctionnelle des  
cardiomyocytes issus de la différenciation précoce  
des cellules souches embryonnaires murines**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie  
Discipline : Sciences de la vie et de la santé  
Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

**DAGOUASSAT Maylis**

Le 3 mai 2006, devant le jury ci-dessous

**Président de Jury** : Professeur Denis ESCANDE

**Rapporteurs** : Docteur SAVATIER Pierre, Directeur de Recherche INSERM Lyon  
Docteur VASSORT Guy, Directeur de Recherche INSERM Montpellier

**Examineur** : Docteur SAMUEL Jane-Lise, Directeur de Recherche INSERM Paris

**Directeur de Thèse** : Docteur JOURDON Philippe, Chargé de Recherche CNRS Nantes

# Sommaire

<b>Introduction Générale .....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Les cellules souches embryonnaires.....</b>	<b>12</b>
<b>I.1 Origine des cellules ES.....</b>	<b>12</b>
<b>I.2 Auto-renouvellement.....</b>	<b>14</b>
I.2.1 Télomérase.....	14
I.2.2 LIF.....	15
I.2.3 Oct-4.....	20
<b>I.3 Pluripotence des cellules ES.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.1 Profil d'expression des cellules ES murines et humaines.....</b>	<b>24</b>
I.3.1.1 Puces à ADN.....	25
I.3.1.2 SAGE.....	25
I.3.1.3 Analyse protéomique.....	26
<b>I.3.2 Partenaires de la pluripotence.....</b>	<b>26</b>
I.3.2.1 STAT-3.....	26
I.3.2.2 Oct-4.....	26
I.3.2.3 Nanog.....	28
I.3.2.4 BMP.....	29
I.3.2.5 Wnt.....	30
<b>I.3.3 Autres facteurs intervenant dans la pluripotence.....</b>	<b>32</b>
<b>II. Développement cardiaque.....</b>	<b>34</b>
<b>II.1 La mise en place du mésoderme.....</b>	<b>34</b>
<b>II.2 La cardiogénèse.....</b>	<b>36</b>
II.2.1 Formation du tube cardiaque.....	36
II.2.2 La boucle cardiaque.....	38
II.2.3 La septation des chambres et des vaisseaux.....	38
<b>II.2.4 Existence d'un deuxième champ cardiaque : Origine des cellules du</b>	
<b>ventricule droit et du cône de sortie aortique.....</b>	<b>39</b>
<b>II.3 Aspect moléculaire de la cardiogénèse.....</b>	<b>39</b>
<b>II.3.1 Spécification du lignage cardiaque.....</b>	<b>39</b>
<b>II.3.2 Différenciation cardiaque et migration des progéniteurs cardiaques...41</b>	
II.3.2.1 Nkx2.5 .....	41
II.3.2.2 Myocardine.....	43
II.3.2.3 Famille des facteurs de transcription GATA.....	43
II.3.2.4 Mesp1 et 2.....	45
II.3.2.5 Crypto 1.....	46
<b>II.3.3 Formation de la boucle.....</b>	<b>46</b>
<b>II.3.4 Morphogénèse des chambres : spécification ventriculaire.....</b>	<b>47</b>
II.3.4.1 Mef2.....	47
II.3.4.2 dHand et eHand.....	49
II.3.4.3 Irx4.....	49
II.3.4.4 Tbx5.....	50
II.3.4.5 Chaînes lourdes des myosines.....	51

II.3.4.6 Chaînes légères des myosines.....	51
II.3.4.7 Facteurs natriurétiques (ANF et BNP).....	52
II.3.5 Maturation des chambres et septation.....	52
II.4 Naissance du système de conduction cardiaque.....	53
II.4.1 Etudes du développement du système de conduction.....	54
II.4.2 Aspect moléculaire de ce développement.....	57
III. Le couplage excitation/contraction.....	59
III.1 Activité électrique des différentes régions du cœur.....	59
III.1.1 le nœud sinusal.....	59
III.1.2 Les oreillettes.....	64
III.1.5 Les ventricules.....	65
III.2 Le répertoire des canaux ioniques.....	67
III.2.1 Les canaux sodiques.....	67
III.2.2 Les canaux calciques.....	69
III.2.3 Les canaux potassiques.....	71
III.2.4 Les canaux activés par l'hyperpolarisation HCN.....	76
III.2.5 Les connexines.....	77
III.3 La contraction cardiaque.....	79
III.3.1 Différentes phases de la contraction.....	79
III.3.2 Les partenaires de la régulation calcique.....	80
III.4 Calcium et activité de pacemaker.....	84
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>86</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>114</b>
1 <sup>ère</sup> partie : Profil d'expression des canaux ioniques dans les cardiomyocytes dérivés des cellules ES.....	115
2 <sup>ème</sup> partie : Co-culture des cardiomyocytes dérivés des cellules ES et des cardiomyocytes néonataux.....	134
3 <sup>ème</sup> partie : Effets du TGF- $\beta$ sur la différenciation des cellules ES.....	141
<b>Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>160</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>165</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>183</b>

## Abréviations

$\alpha$  MHC : chaîne lourde de la myosine de type  $\alpha$

$\beta$  MHC : chaîne lourde de la myosine de type  $\beta$

BMP: Bone Marrow Protein

CNTF : facteur neutrophique ciliaire

Conx : connexine

EB : corps embryoïdes

ES : cellules souches embryonnaires

FP : fibres de Purkinjé

hES : cellules souches embryonnaires humaines

hMPCs : cellules mésenchymateuses humaines

ICM : cellules de la masse interne

LIF: leukemia inhibitory factor

MEF : fibroblaste embryonnaire murin

MLC2a : chaîne légère de la myosine de type atrial

MLC2v : chaîne légère de la myosine de type ventriculaire

NAV: nœud atrio-ventriculaire

NS ou NAS : nœud sinusal ou nœud sinoauriculaire

PA : potentiel d'action

PDM : potentiel de diastolique maximal

Rb : retinoblastome

RIP3: récepteur à l'IP3

RS : reticulum sarcoplasmique

RYR: récepteur à la ryanodine

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor

## **Définitions**

**Profil génotypique: Ce terme désigne les ARNms transcripts dans un type cellulaire donné et à temps donné.**

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les maladies cardiaques ou cardiopathies sont une des premières causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. Ces maladies peuvent se regrouper en deux grandes classes : les cardiopathies congénitales et les cardiopathies acquises consécutives à un épisode ischémique, ou liées à une infection. Ces maladies conduisent très fréquemment à une insuffisance cardiaque. Celle-ci correspond à une incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque touche 16 millions de personnes à travers le monde et représente un problème majeur de santé publique. Pour pallier cette insuffisance, les moyens mis en œuvre sont d'ordre médicamenteux et chirurgicaux. Dans les phases ultimes, la transplantation cardiaque s'avère nécessaire. Cependant, la pénurie d'organes a contraint à rechercher de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, la thérapie cellulaire visant à améliorer ou à réparer une fonction défaillante en transplantant des cellules saines dans un organe ou un tissu ciblé, se présente comme une voie nouvelle très prometteuse, permettant d'améliorer la fonction cardiaque déficiente.

Par ailleurs, la plupart des cardiomyopathies se caractérisent par des troubles du rythme et nécessitent la pose d'un pacemaker artificiel. Ce dernier présente un certain nombre d'inconvénients tels qu'une absence de modulation du rythme lors d'un exercice intense, une durée de vie limitée des batteries nécessitant une intervention pour leur remplacement et un risque non négligeable d'infection pouvant conduire à son retrait. La création d'un pacemaker biologique pouvant moduler le rythme en fonction de l'activité physique du porteur de ce pacemaker, s'avère donc nécessaire. Les cellules souches embryonnaires (ES) sont une source potentielle pour la thérapie cellulaire. En effet, différents travaux ont mis en évidence, que ces cellules pluripotentes peuvent se différencier *in vitro* en différents types cellulaires et plus particulièrement en cellules cardiaques. De plus, différents types de cardiomyocytes (cellules de type pacemaker, atrial et ventriculaire) ont pu être obtenus à partir de ces cellules. Afin d'établir les conditions permettant de créer un pacemaker biologique par différenciation des cellules ES, il est indispensable (1) de caractériser les différents types cellulaires cardiaques au cours du processus de différenciation, (2) de définir les différents stades où chacun de ces types est prépondérant, et (3) de sélectionner à un stade précis de cette différenciation *in vitro*, le type cellulaire correspondant le mieux

aux cellules de type pacemaker du cœur normal. Notre travail a donc été tout d'abord de caractériser le génotype et le phénotype des cellules cardiaques obtenues par différenciation *in vitro* des cellules ES. Ceci a été réalisé à différents stades de cette différenciation : un stade précoce correspondant à 10-11 jours, et un stade plus tardif 15 jours. Les résultats obtenus mettent en évidence 1) qu'au stade précoce les cardiomyocytes présentent des activités électrique et contractile spontanées similaires à celles observées dans les cellules de type pacemaker du cœur adulte. 2) qu'au stade plus tardif, le phénotype de ces cardiomyocytes est principalement de type atrial. Cette première étude a fait l'objet d'une communication orale à l'AHA (American Heart Association) en novembre 2004 (Dagouassat M *et al.*, 2004) et d'un article en cours de soumission à J.Physiol.

Nous avons ensuite recherché si les cardiomyocytes issus de la différenciation des cellules ES conservent leurs caractéristiques lorsqu'ils sont implantés dans un environnement cardiaque particulier, tel que le myocarde auriculaire ou le myocarde ventriculaire. Pour cela, nous avons cultivé les cardiomyocytes obtenus par différenciation des cellules ES en présence de cellules cardiaques isolées soit à partir d'oreillettes, soit à partir de ventricules de cœurs de souris de 2 jours. Nos résultats montrent que les cellules cardiaques issues des cellules ES mises en culture avec des cellules ventriculaires néonatales ont une capacité de différenciation limitée en cellules ventriculaires.

En thérapie cellulaire, un facteur important est la production en quantité suffisante des cellules que l'on souhaite implanter ou greffer. Cependant, la production des cardiomyocytes par différenciation des cellules ES est relativement limitée. Des travaux récents ont suggéré que cette productivité pouvait être accrue par addition de facteurs de croissance à des moments clés du protocole de différenciation. Il a ainsi été montré que les membres de la famille des « Transforming Growth Factor- $\beta$  » (TGF- $\beta$ ) sont de puissants régulateurs de diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Itoh *et al.*, 2000). Cette famille de cytokines se compose non seulement des différentes isoformes du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) mais également des « Bone Morphogenetic Protein » (BMPs), de l'activine, pour ne citer que deux éléments parmi les sept constituant cette famille. Par ailleurs, le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle clé dans le développement embryonnaire. En effet, chez la souris,

l'inactivation du gène codant pour ce facteur de croissance induit la mortalité des embryons au stade 10,5 jours post-coïtum (Dickson *et al.*, 1995). D'autre part, l'activation des récepteurs au TGF- $\beta$ 1 induit principalement la voie de signalisation impliquant les facteurs de transcription smad2. L'inactivation du gène codant pour smad2 chez la souris (smad2<sup>-/-</sup>) induit une perte du pouvoir de l'épiblaste à se différencier dans les 3 types de feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) (Heyer *et al.*, 1999 ; Waldrip *et al.*, 1998). Enfin, il a été montré que l'endoderme libère des facteurs de croissance appartenant à cette superfamille du TGF- $\beta$  telle que BMP2 et nodal. Ceux-ci se sont révélés être des inducteurs de la différenciation du mésoderme en progéniteurs cardiaques. De plus, l'expression du TGF- $\beta$ 1 a été identifiée dans le mésoderme cardiaque d'embryons de 7 jours (Akhurst *et al.*, 1999). Enfin, différents travaux ont montré que le TGF- $\beta$ 1 pouvait stimuler la capacité de différenciation *in vitro* des cellules ES murines et des cellules carcinomiales P19 en cardiomyocytes (Slager *et al.*, 1993 ; Behfar *et al.*, 2002). Le prétraitement des cellules ES et des cellules P19 avec du TGF- $\beta$  pendant 24H augmente les capacités de différenciation de ces cellules en progéniteurs cardiaques. Cependant, l'identification des gènes activés consécutivement à un prétraitement par le TGF- $\beta$ 1, n'a pas été, à notre connaissance, réalisée. Nous avons donc recherché si l'on pouvait identifier ces gènes au cours de cette phase de prédifférenciation. Pour cela, nous avons réalisé une étude comparative du profil d'expression des cellules ES traitées ou non par le TGF- $\beta$  en utilisant des puces à ADN pangénomique. Cette étude nous a permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués et de suggérer une voie de signalisation activée par le TGF- $\beta$  dans les cellules ES.

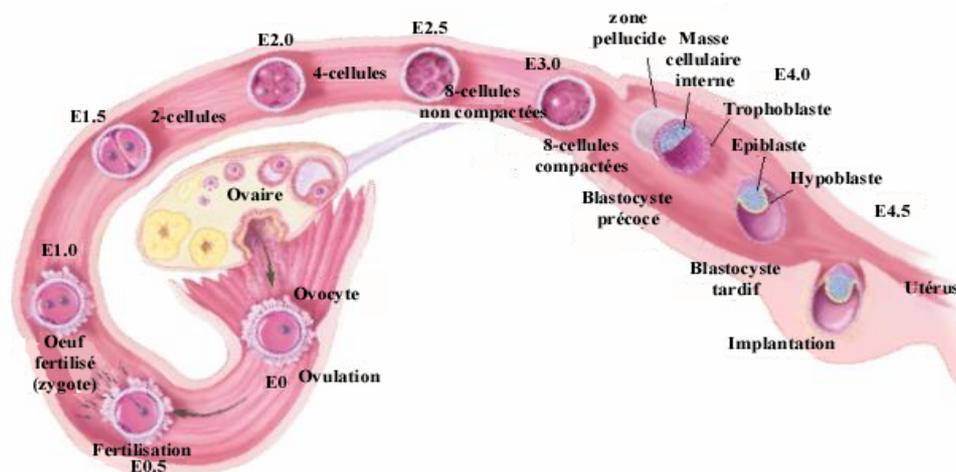
# **INTRODUCTION**

## I. Les cellules souches embryonnaires de souris (ES)

Les cellules souches embryonnaires sont issues de l'embryon à un stade précoce, et présentent deux propriétés principales : l'auto-renouvellement à long terme en culture et la pluripotence.

### I.1 Origine des cellules ES

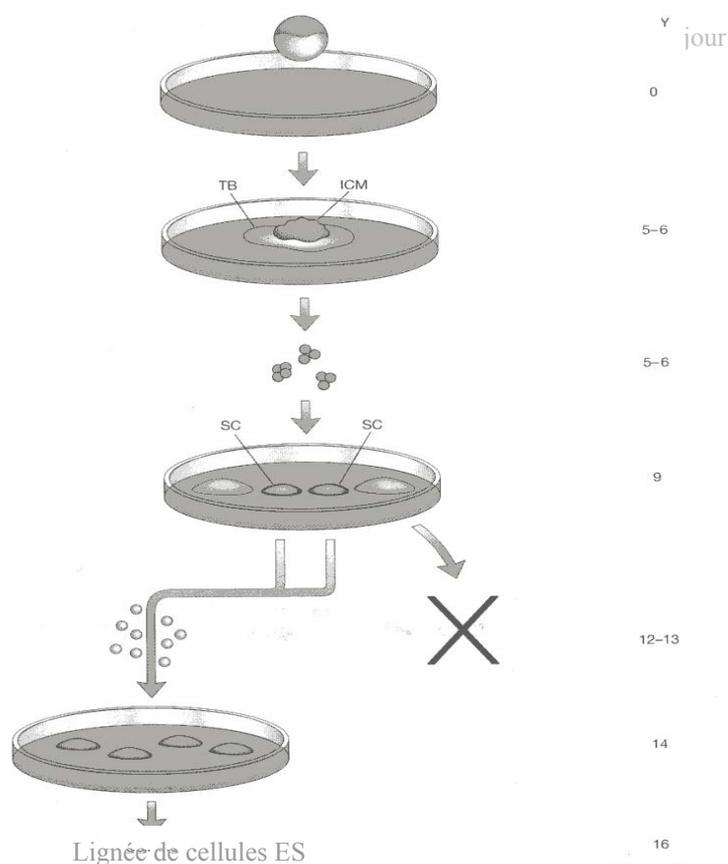
La fécondation de l'ovocyte mature par un spermatozoïde se produit au niveau de la corne utérine. Le zygote ou œuf ainsi formé, transite vers l'utérus avant de s'y implanter. Au cours de ce transit, l'œuf va subir un programme de divisions cellulaires le conduisant au stade de 16 cellules compactes constituant la morula (Gilbert *et al.*, 2000). Ces cellules ont la capacité de redonner un organisme complet, elles sont dites totipotentes. Au cours de l'étape suivante, une cavité se creuse, le blastocoele. La morula se transforme en blastocyste précoce. La couche cellulaire la plus externe constitue le trophoblaste, et les cellules les plus internes sont repoussées vers l'un des pôles. Ces cellules constituent les cellules de la masse interne (ICM) ou bouton embryonnaire. Celles-ci correspondent aux cellules souches embryonnaires pluripotentes qui donneront par la suite les trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme, ectoderme, ainsi que la lignée germinale (Evans et Kaufman., 1981 ; Pelton *et al.*, 1998) (figure 1).



**Figure 1: Processus d'implantation du blastocyste murin du jour embryonnaire 0 (E0) au jour 5 (E5)** Après fécondation, le zygote ou œuf transite par la corne utérine. Il subit une série de divisions cellulaires le conduisant au stade morula. Celle-ci se creuse et devient blastocyste précoce composé du bouton embryonnaire (ICM) et du trophoblaste qui donnera le placenta. Au stade tardif, l'ICM se différencie en épiblaste, et en hypoblaste ou endoderme primitif qui participera à la formation du sac vitellin. Au 4<sup>ème</sup> jour, ce blastocyste tardif va s'implanter dans la paroi utérine (extrait de Stem cells. NIH. <http://stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp>).

Au cours de l'étape suivante, un groupe de cellules non polarisées de l'ICM se différencie en endoderme primitif ou hypoblaste. Les autres cellules constituant l'ICM s'organisent en épiblaste ou ectoderme primitif. Ce stade correspond au blastocyste tardif ou préimplantatoire. Les lignées de cellules souches embryonnaires sont établies à partir des cellules de l'ICM des blastocystes précoces ou à partir des cellules de l'épiblaste des blastocystes préimplantatoires.

L'établissement d'une lignée stable s'effectue selon plusieurs étapes. Les blastocystes sont prélevés dans les cornes utérines. Les cellules de l'ICM sont séparées du trophoctoderme par microchirurgie ou par immuno-chirurgie, puis cultivées, sous-clonées pour générer une lignée de cellules ES (figure 2).



**Figure 2 : Un exemple d'établissement d'une lignée ES de souris. Les blastocystes sont récupérés et mis en culture (jour 0).** Après 5 à 6 jours, les cellules de la masse interne (ICM) ayant proliféré, sont séparées du trophoctoderme (TS) et dissociées en petits « clusters » avant d'être réensemencées. Au 9<sup>ème</sup> jour, des petites colonies de cellules souches (SC) apparaissent, sont examinées et classées selon leur morphologie. Les colonies qui ressemblent à des cellules ES sont dissociées en petits « clusters » et réensemencées. Au 14<sup>ème</sup> jour, les cellules sont sous-clonées pour établir une lignée permanente de cellules ES. (D'après le protocole de A. Nagy extrait de « Manipulating the mouse embryo »)

Différentes lignées de cellules ES issues de la souris (Evans et Kaufman, 1981 ; Nagy *et al.*, 1993 ; Smith *et al.*, 1991), de l'homme (Thomson *et al.*, 1998), du primate non humain (Thomson et Marshall, 1998) et du poulet ont été établies. Des cellules ressemblant aux cellules ES ont pu être également établies dans différentes espèces (rat, lapin, porc) (Vassilieva *et al.*, 2000 ; Graves *et al.*, 1993, Li *et al.*, 2004). Quelques marqueurs sont exprimés à la surface des cellules ES et permettent de les caractériser. Le tableau I compare la présence de ces marqueurs dans les différentes espèces de cellules ES établies.

	ES souris	ES primates	ES humaines
SSEA-1	+	-	-
SSEA-3	-	+	+
SSEA-4	-	+	+
TRA-1-60	-	+	+
TRA-1-81	-	+	+
Phosphatase alcaline	+	+	+

**Tableau I : Tableau comparatif des différents marqueurs des cellules ES humaines, primates et murines** (SSEA : stage specific embryonic antigen, TRA : tumor rejection antigen)

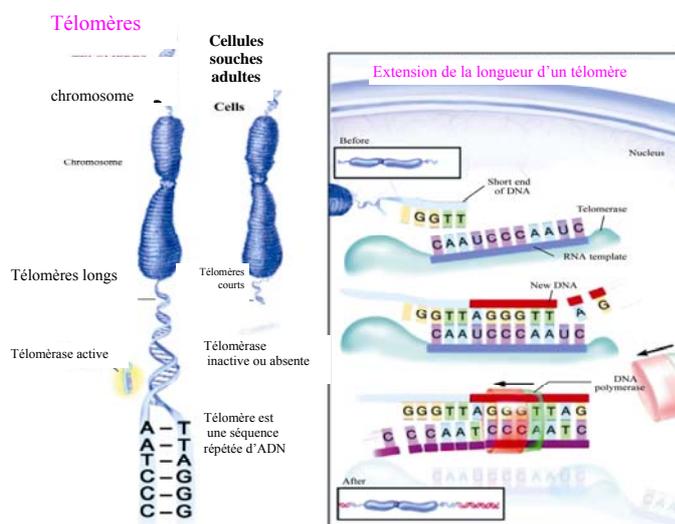
## I.1.2 Auto -renouvellement

Les cellules ES peuvent subir un nombre illimité de divisions cellulaires en culture sans se différencier. Cette propriété d'auto-renouvellement à long terme se met en place grâce à l'intervention de trois principaux acteurs : la Télomérase, le leukemia inhibitory factor (LIF) et le facteur de transcription Oct-4.

### I.1.2.1 La télomérase

La télomérase empêche les chromosomes de se raccourcir à chaque division en maintenant la longueur des télomères situés à leurs extrémités (figure 3). Ces télomères permettent l'agrégation cellulaire lors des divisions cellulaires et participent à la stabilité génomique. Des télomères longs sont associés à des lignées cellulaires immortelles. Les cellules ES et les cellules cancéreuses partagent cette propriété. A l'inverse, au cours de la vie d'un organisme, les télomères des cellules adultes

deviennent plus courts du fait d'une activité télomérasique diminuée. Les cellules ES ont conservé une activité télomérase intense, ce qui leur confère une grande capacité de prolifération.



**Figure 3: Elongation d'un télomère. La télomérase se fixe à l'extrémité d'un télomère via une matrice d'ARN.** Elle se positionne par appariement des bases entre la matrice d'ARN et l'amorce d'ADN simple brin et ajoute des bases G et T une à une à l'amorce, en suivant les ordres de la matrice. L'ADN polymérase complète le brin d'ADN, et donc l'extrémité du chromosome. (Extrait de Stem cells." NIH. <http://stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp> »)

### I.1.2.2 Le LIF

Le LIF appartient à la famille des interleukines 6 (IL6). Cette dernière comprend de nombreux membres dont l'IL-11, l'oncostatine M (OSM), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), et la cardiotrophine-1 (CT-1). L'identification du LIF comme inducteur de la différenciation des cellules monocytaires M1 en macrophages matures a permis de purifier et de cloner le LIF (Gearing *et al.*, 1987, Gough *et al.*, 1988). *In vitro*, le LIF est produit en faible quantité par diverses lignées cellulaires telles que les lignées fibroblastiques STO et MEF (Anegon *et al.*, 1990). La plupart des lignées de cellules ES sont cultivées *in vitro* sur ces cellules qualifiées de cellules nourricières. Des fibroblastes incapables de produire du LIF ne peuvent plus assurer l'auto-renouvellement et le maintien de l'état indifférencié des cellules ES (Stewart *et al.*, 1992).

Le LIF est une cytokine aux effets pléiotropes dépendant du type cellulaire et de la maturité cellulaire. Ces fonctions s'étendent du stade embryonnaire à l'adulte. Le LIF intervient notamment lors du processus d'implantation de l'œuf au niveau de la

muqueuse utérine, et au cours du développement fœtal (Stewart *et al.*, 1992). *In vivo* chez la souris, il permet de maintenir l'ICM lors d'un retard d'implantation du blastocyste (diapause). Ceci pourrait expliquer la dépendance au LIF des cellules ES murines en culture.

- Le récepteur au LIF :

Le signal de la famille des cytokines IL6 est transmis via des récepteurs homo ou hétérodimériques. Le récepteur au LIF est composé de deux partenaires : un récepteur de faible affinité (LIFR $\alpha$ ) et une protéine gp130 dont la présence est indispensable pour que le LIFR $\alpha$  fixe le LIF avec une forte affinité. Les cellules ES humaines expriment faiblement le récepteur au LIF (Brandenberg *et al.*, 2004, Carpenter *et al.*, 2004). Par épissage alternatif, il est possible d'obtenir un récepteur soluble de LIFR $\alpha$ . Ce dernier existe chez la souris, mais est absent chez l'homme (Gearing *et al.*, 1991). Ce récepteur soluble pourrait être un antagoniste de l'action du LIF, limitant ainsi ces effets au niveau de sites locaux de production.

Ce récepteur permet l'activation de trois voies de signalisation : La voie JAK/STAT3, MAPK et la voie de la PI3K. Ces voies sont impliquées respectivement dans l'auto-renouvellement, la différenciation et le contrôle de la prolifération des cellules ES.

a) Voie JAK/STAT3 :

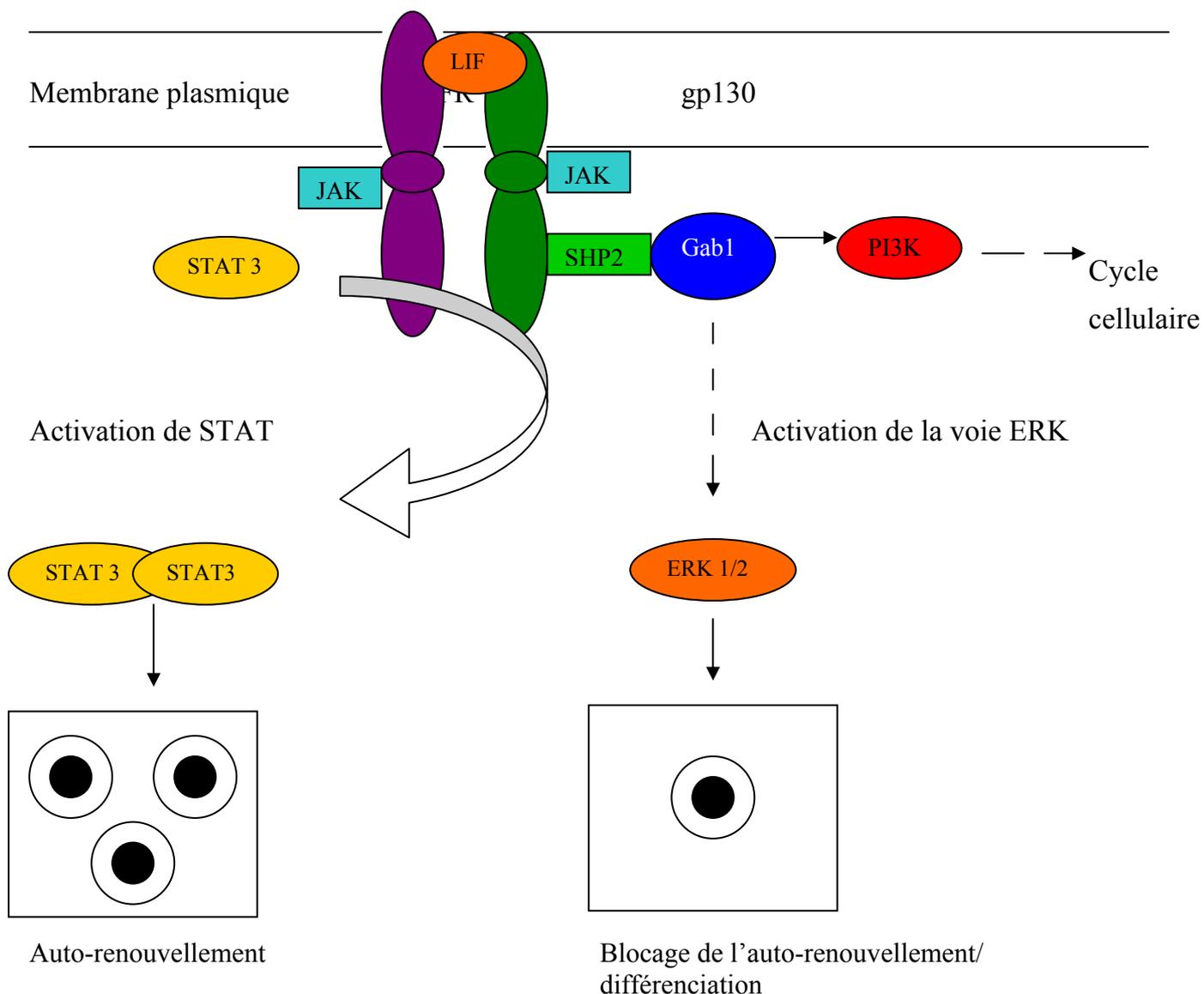
Elle se divise en deux parties. La première aboutit à l'expression des gènes spécifiques de cette voie, et la deuxième permet de réguler cette voie de signalisation. LIFR $\alpha$  et gp130 sont associés de manière constitutive à des tyrosines kinases de la famille JAK (Janus Kinase) ou src. Lors de la liaison du LIF, ces kinases sont activées et phosphorylent les deux composés du récepteur. Le récepteur phosphorylé recrute des protéines différentes via leurs domaines SH2 (src homology domain 2). Des facteurs de transcription de la famille des STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont alors associés au récepteur (Pawson et Scott, 1997). Les STATs phosphorylés au niveau de leurs résidus tyrosines et serines à l'extrémité C-terminale se dimérisent et migrent dans le noyau où ils se fixent sur leurs séquences promotrices. (Darnell, 1997, Pellegrini et Dusanter-Fourt, 1997).

L'induction transitoire de bon nombre d'effecteurs du LIF indique l'importance de régulateurs négatifs qui permettent entre autre la déphosphorylation rapide des STATs et des MAPKs (Cohen, 1997, Starr et Hilton, 1999). Les protéines STATs induisent la synthèse de leurs propres répresseurs, les protéines SOCs (Suppressor of Cytokine Signaling). Ces dernières, en s'associant directement avec les JAKs et en bloquant leur activité, diminuent la phosphorylation des STATs (Starr *et al.*, 1997, Starr et Hilton, 1999). Une autre famille de répresseurs des protéines STATs, les PIAS (Protein Inhibitory Associated with STAT), empêche la liaison des STATs à l'ADN (Chung *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1998). De plus, des phosphatases spécifiques déphosphorylent les protéines STATs qui sont relarguées dans le cytoplasme. Elles peuvent ainsi être réinduites par une nouvelle vague de signaux positifs (Hilton, 1999).

Dans les cellules ES, ce sont les facteurs de transcription STAT 3 et son inhibiteur SOC 3 qui sont impliqués. L'expression du gène STAT 3 n'est pas modifiée par le LIF dans les cellules ES où la quantité d'ARNm et de protéines reste constante (Bœuf *et al.*, 1997). A l'inverse, l'expression du gène SOC 3 est régulée par le LIF. De plus, la surexpression de SOC 3 réprime la transcription en réponse au LIF, et la concentration de cette protéine détermine le taux de survie des cellules ES (Duval *et al.*, 2000). Un excès ou un défaut de phosphorylation de STAT 3, ou du niveau d'expression des protéines SOCs, ou des phosphatases de type SHP, engage irréversiblement les cellules ES soit dans certaines voies de différenciation, soit vers la mort cellulaire par apoptose (Bœuf *et al.*, 1997, Niwa *et al.*, 2000).

#### b) Voie des MAPKs :

Cette cascade fait intervenir différents partenaires dont Grb2, SOS, Ras, Raf, MEKK et ERK. ERK se dimérise et est transloquée dans le noyau où elle active des gènes cibles tels que elk, myc et les facteurs de réponse au sérum (SRF). Le couplage du récepteur au LIF avec cette voie s'effectue grâce à un intermédiaire : la protéine SHP2. Cette dernière va interagir avec Grb2. La suppression du site de fixation de SHP2 dans les cellules ES conduit à une inhibition de la voie ras, et à une augmentation de l'auto-renouvellement. A l'inverse, une déficience de Grb2 ou de SHP2 conduit à une diminution de la différenciation. Ainsi, La voie ERK s'oppose à l'auto-renouvellement des cellules ES, et est impliquée dans la différenciation de ces cellules.



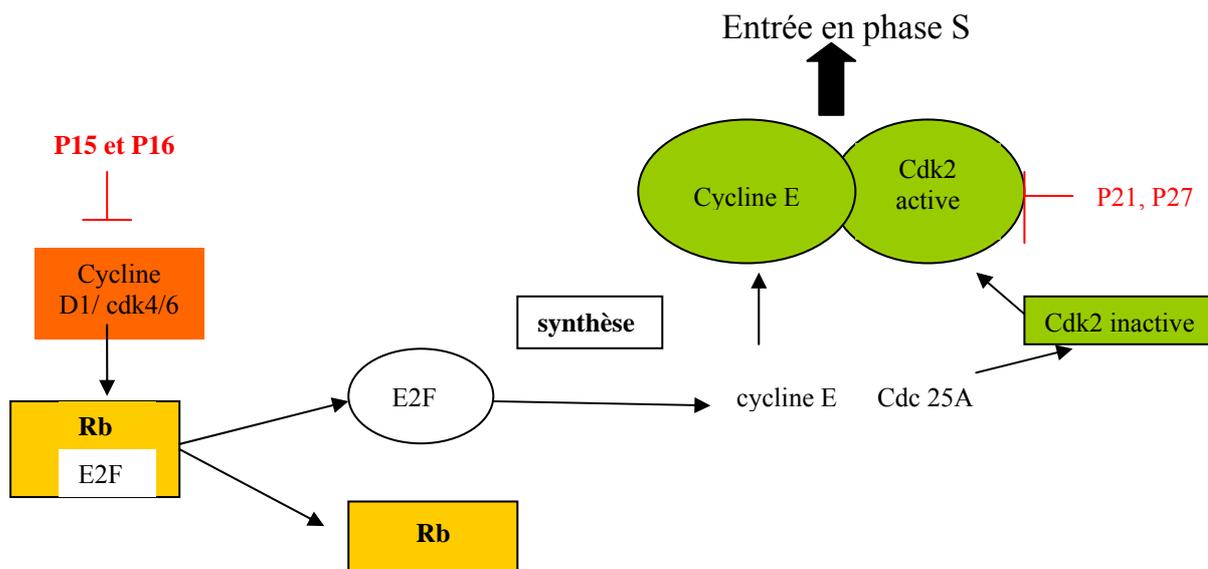
**Figure 4: La voie de signalisation LIF-STAT3 intervient dans l'auto-renouvellement des cellules ES, la voie MAPK induit leur différenciation.**

c) voie PI3K :

La famille des PI3Ks intervient dans de nombreux processus physiologiques et notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, la survie ou la migration cellulaire (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001)). Elle se divise en trois classes dont la classe I<sub>A</sub> activée par le récepteur au LIF. La PI3K intervient dans les cellules ES murines (1) en contrôlant leur prolifération cellulaire, (2) en régulant leur auto-renouvellement.

Dans les cellules somatiques adultes, la prolifération est contrôlée en régulant la progression de la phase G1 vers S. Durant cette progression, Rb (rétinoblastome) est phosphorylé par le couple cycline D1/cycline dépendant kinase 4 (cdk4) et cycline

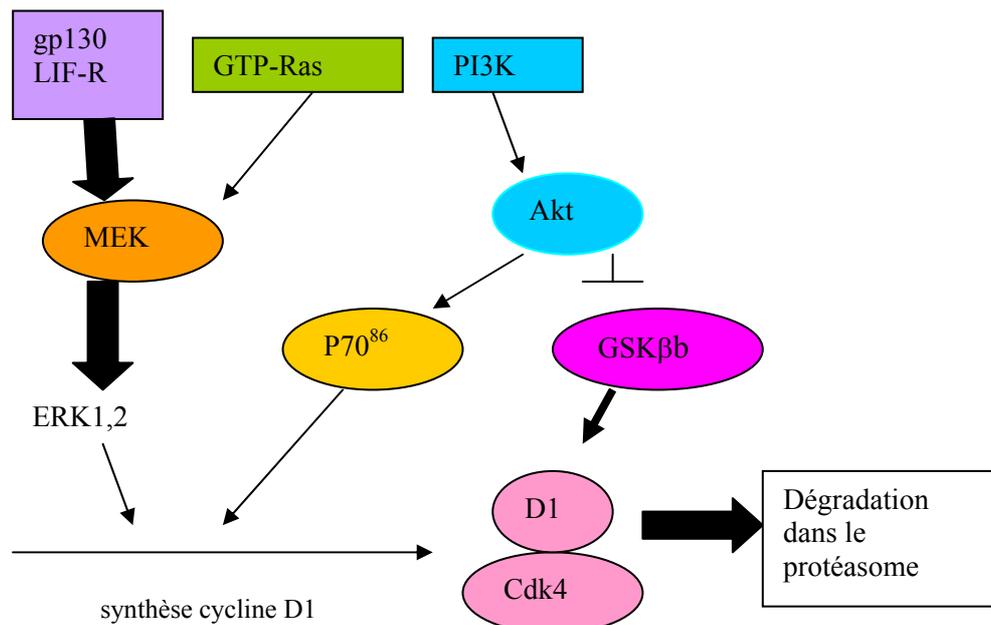
D1/cdk6. Le facteur de transcription E2F piégé par Rb est partiellement libéré ce qui permet l'activation de la transcription de la cycline E et de *cdc25A*, phosphatase qui active *cdk2*. Ces événements conduisent à la formation d'un complexe cycline E/*cdk2* actif, qui va phosphoryler Rb et relarguer complètement E2F, induisant l'expression des gènes impliqués dans le passage en phase S. De plus, le couple cycline D1/*cdk4/6* est modulé par les protéines inhibitrices P15 et P16 et le couple cycline E/*cdk2* par les protéines P21 et P27.



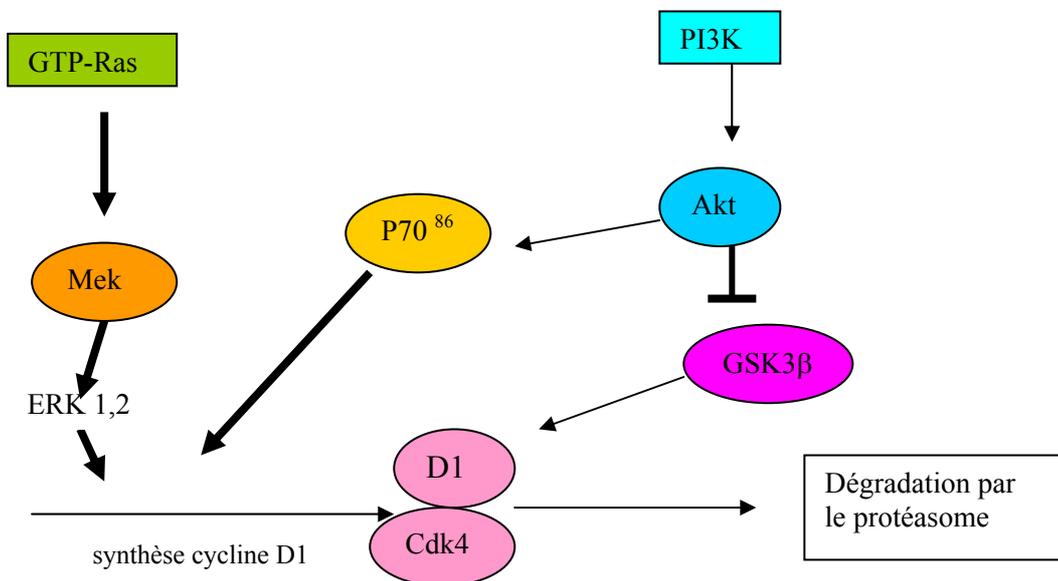
**Figure 5: Régulation de la progression G1/S dans les cellules somatiques adultes.**

Dans les cellules ES murines, la phase G1 est courte et n'excède pas 1,5h (Savatier *et al.*, 1994). A la différence des cellules somatiques, Rb ne semble pas être le point clé de ce contrôle. La prolifération des cellules ES serait régulée par *myc*, et par la PI3K (Burdon *et al.*, 2002 ; Jirmanova *et al.*, 2002). Contrairement aux cellules somatiques adultes, les cellules ES sont résistantes à P16, et expriment un faible niveau de cycline D1, et pas de cyclines D2 et D3. Cependant, au cours de la différenciation des cellules *in vivo* et *in vitro* le niveau d'expression des cyclines D1 augmente. Le faible niveau d'expression de la cycline D1 est le résultat d'une dégradation intense par le protéasome ; à l'inverse cette dégradation est inhibée lors de la différenciation. Les voies ERK et PI3K seraient impliquées dans la régulation de l'expression de la cycline D1 dans ces deux conditions (Jirmanova *et al.*, 2002). Dans les cellules ES, la PI3K intervient à deux niveaux (1) la voie PI3K/p70 S6 kinase impliquée dans la synthèse de la cycline D1 est faiblement activée (2) la voie PI3K/ Akt/GSK $\beta$  intervenant dans la

### A) Cellules ES



### B) Différenciation des cellules ES



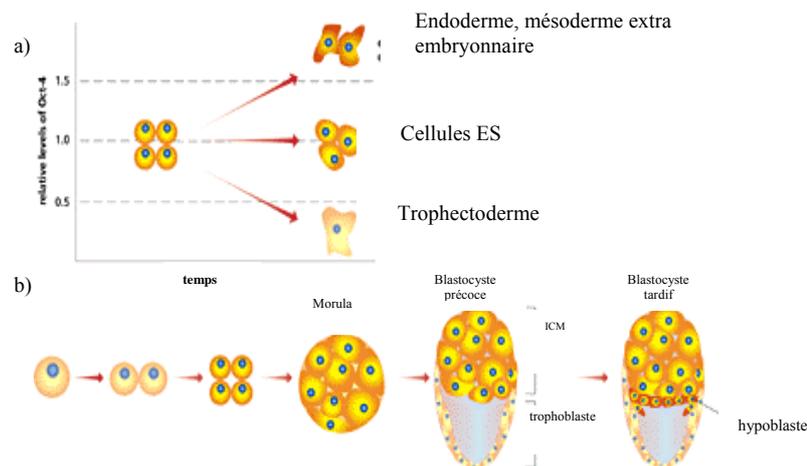
Représentation de la contribution des voies ERK et PI3K dans le contrôle de la synthèse de la cycline D1 au cours de la différenciation des cellules ES induite par acide rétinolique (d'après Jirmanova *et al.*, 2002)

dégradation est favorisée (figures ci-contre). Lors de la différenciation, les voies ERK et PI3K/p70 S6 kinase permettent la synthèse de la cycline D1 et l'apparition du mécanisme décrit plus haut pour les cellules somatiques adultes.

L'intervention de la PI3K dans l'auto-renouvellement des cellules ES a pu être démontrée en utilisant des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme. Dans ces conditions, le LIF ne peut maintenir l'auto-renouvellement des cellules ES. L'action de la PI3K passerait par une inhibition de la voie ERK (Paling *et al.*, 2004).

### **I.2.3 Oct-4**

Oct-4 est l'un des acteurs indispensables au maintien de la prolifération et de l'état indifférencié des cellules ES. Ce facteur de transcription est codé par le gène *pou5f1*, dont l'expression varie au cours du développement. Celui-ci appartient à la classe 5 de la famille POU qui comprend entre autres Pit-1, Oct-2, Unf-1. Cette famille intervient principalement au cours du développement et de la différenciation (Pesce et Scholer, 2001). Oct-4 est présent *in vivo*, du zygote au stade blastocyttaire où il est requis pour maintenir la pluripotence des cellules de la masse interne et de l'épiblaste à des stades plus tardifs du développement. L'équipe de Niwa a montré que la modification du niveau d'expression de ce facteur de transcription exerce une influence sur le devenir des cellules ES (Niwa *et al.*, 2000). En effet, la diminution de son niveau d'expression (50%) conduit les cellules ES vers une différenciation trophoctodermique. A l'inverse, un niveau d'expression accru (50%) par un transgène sous contrôle de la tétracycline, conduit les cellules ES vers une différenciation endodermique et mésodermique extraembryonnaires (Figure 6).



**Figure 6: Le niveau d'expression d'Oct-4 influence le destin des cellules ES.** a) Une augmentation conduit les cellules vers une différenciation endodermique et mésodermique extra-embryonnaire. Une diminution conduit vers le trophectoderme. b) Rappel de l'expression d'Oct-4 *in vivo* (d'après Stewart CL, 2000).

Oct-4 agit sur trois niveaux pour maintenir l'état indifférencié des cellules ES et leur prolifération: 1) Il active l'expression d'une protéine inhabituellement exprimée dans les cellules ES : Grb2 associated docking protein (Gab1) qui va inhiber l'activation de la voie MAPK et activer la voie de la PI3K ; 2) Il coopère avec la voie de signalisation JAK/STAT3 induite par le LIF pour activer les facteurs de transcription Ref1 et Utl1 « undifferentiated cell transcription factor 1 », impliqués dans l'état indifférencié ou pluripotent de ces cellules ; 3) Il coopère avec d'autres facteurs de transcription. Ce dernier point sera développé dans le paragraphe suivant.

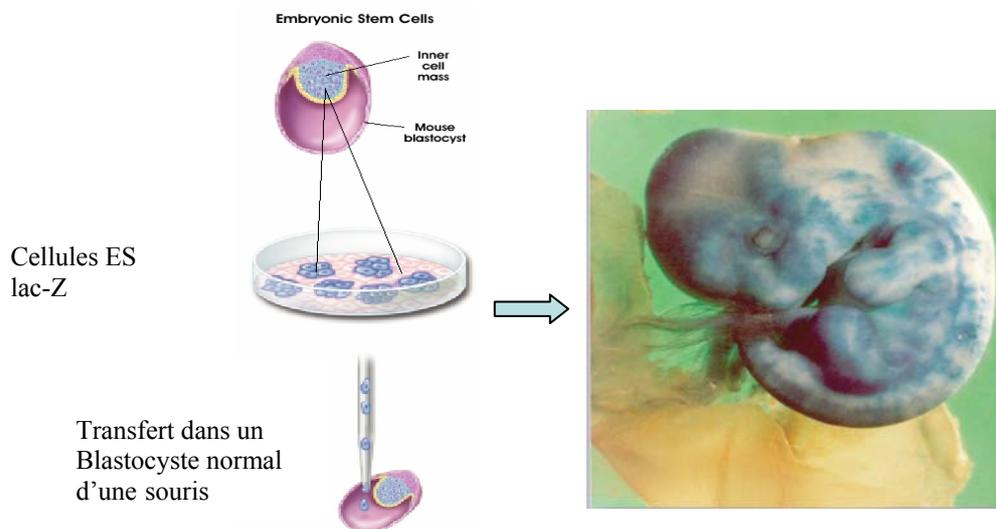
### I.1.3 Pluripotence des cellules ES

Les cellules ES sont dites pluripotentes car elles ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires qui constituent un organisme. Afin de s'assurer que les lignées de cellules ES établies et celles maintenues à long terme en culture possèdent et conservent cette propriété, trois approches sont utilisées : la création de chimère, la formation de tératome et la différenciation dirigée.

- La production de chimère :

Les cellules ES transfectées avec le gène rapporteur lacZ ou GFP sont injectées dans la cavité d'un blastocyste. Ce dernier est transféré dans l'utérus d'une femelle pseudogestante. La descendance qui en résulte est une chimère. Cette dernière se définit comme le mélange pour chaque tissu ou organe, de cellules issues à la fois des cellules ES injectées et des cellules ES du blastocyste hôte (figure 7). Toutefois, la

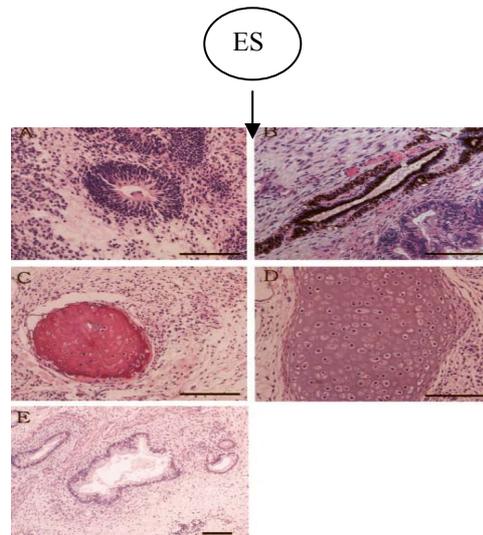
capacité des cellules ES à redonner un embryon complet semble se perdre au cours de la culture. (Nagy *et al.*, 1990).



**Figure 7: formation des chimères** (extrait A.Smith., 2001)

#### - La formation de tératome

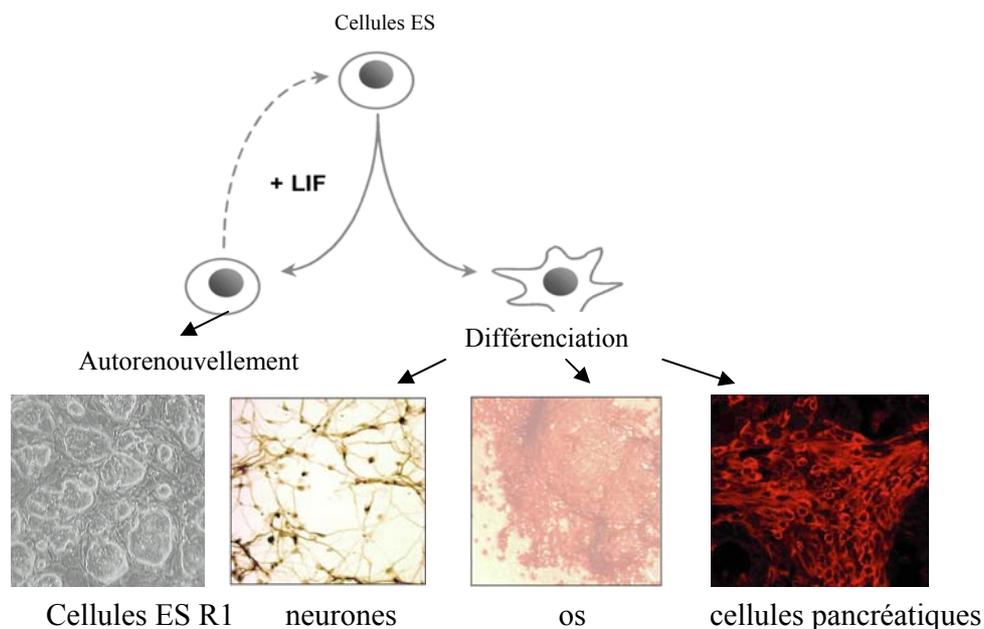
Les cellules ES sont injectées sous la peau ou dans la capsule de rein de souris adultes génétiquement identiques ou immunodéficientes (souris « nude » ou SCID), afin d'éviter un rejet des tissus. Les cellules ES injectées dans ces souris hôtes vont donner une tumeur bénigne nommée tératome. L'observation de celle-ci au microscope montre la présence des trois types de feuillet embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et des cellules dérivées de ces différents feuillets. En effet, un tératome peut contenir des structures intestinales (des cellules épithéliales ou des fibres musculaires lisses), du muscle squelettique ou cardiaque, du tissu neural, du cartilage, de l'os et parfois des cheveux. Ainsi, les cellules ES maintenues en culture à long terme *in vitro*, peuvent se comporter comme des cellules pluripotentes *in vivo*.



**Figure 8 : Tératome formé par des cellules ES humaines testées dans des souris SCID 12 semaines après injection.** (A), rosette neuroépithéliale, (B) rosette pigmentée de l'épithélium rétinien, (C) îlots osseux montrant une différenciation osseuse, (D) cartilage, (E) épithélium glandulaire avec muscle lisse et tissu conjonctif échelle, 100 $\mu$ m.

- Différenciation spontanée ou dirigée

Cette dernière technique se réalise en retirant du milieu de culture le LIF et les cellules nourricières. Les cellules vont s'agréger pour constituer des amas cellulaires nommés corps embryoïdes (EBs). Ces derniers ressemblent aux tératomes observés chez les animaux. Les EBs se composent de zones organisées partiellement ou complètement différenciées qui sont dérivées des trois feuilletts embryonnaires.



**Figure 9: Différenciation des cellules ES dans les différents types cellulaires issus des trois types de feuilletts embryonnaires.**

Les cellules ES peuvent se différencier dans les trois types de feuillets embryonnaires, mais quels sont les acteurs de cette pluripotence et comment est-elle conservée ? Pour répondre à ces questions, des travaux se sont intéressés au profil transcriptionnel des cellules ES murines et humaines et ont permis l'identification d'un certain nombre de gènes impliqués dans le maintien de cet état indifférencié.

### **I.1.3.1 Profil d'expression des cellules ES murines et humaines**

#### **I.1.3.1.1 Puces à ADN**

La recherche de la signature génique permettant de comprendre les mécanismes sous-jacents le maintien de la pluripotence des cellules ES, a été entreprise par différentes équipes. Les premières études ont comparé le profil transcriptionnel des cellules ES murines, des cellules souches ou progéniteurs hématopoïétiques et neuronaux (Ramalho-Santos *et al.*, 2002 ; Ivanova *et al.*, 2002). Six gènes communs ont pu être ainsi identifiés. Il s'agit d'une part de facteurs impliqués dans la transcription, dans la traduction, de protéines impliquées dans la liaison à l'ADN, le protéasome ou qui interviennent dans la conformation d'autres protéines. Une série de gènes dont la fonction était inconnue a aussi été identifiée. En 2003, Sharov *et al* ont approfondi cette analyse en comparant les transcrits de souris des ovocytes, des blastocystes, des cellules souches embryonnaires et adultes et des embryons préimplantatoires. Dans cette étude, les cellules ES murines ont montré un profil transcriptionnel spécifique par rapport aux cellules souches adultes et 88 gènes ont pu être ainsi identifiés. Sato *et al* en 2004 se sont intéressés aux cellules ES humaines et ont entrepris de comparer le profil transcriptionnel des cellules ES humaines différenciées et indifférenciées. Dans cette étude, 918 gènes sont spécifiques des cellules ES humaines, et parmi eux les récepteurs et les inhibiteurs des voies FGF, Wnt et TGF- $\beta$  ont été identifiés, suggérant une régulation de ces voies de signalisation dans les cellules ES. Par ailleurs, une comparaison avec l'étude de Ramalho-Santos, a permis d'identifier 227 gènes communs aux cellules ES murines et humaines. Parmi eux, Oct-4, Nanog, Utl1 sont fortement exprimés dans les cellules ES murines ; à l'inverse, Sox2, gp130 et Rex 1 sont pauvrement exprimés dans les cellules ES humaines. De plus, les différentes lignées de cellules ES humaines établies ne sont pas homogènes, ce qui peut expliquer les variations de leur profil transcriptionnel (Carpenter *et al.*, 2004). Ces expériences

présentent de nombreux problèmes techniques tels que la pureté des populations, la modification possible de l'expression des gènes lors d'une culture à long terme, et le seuil de détection des gènes exprimés.

#### **I.1.3.1.2 SAGE « Serial Analysis of Gene Expression »**

La technique de SAGE permet de cribler et d'analyser des centaines de transcrits et de déterminer, en comparant différentes conditions, les niveaux d'expression des gènes. Elle consiste à réaliser un inventaire des transcrits (ARNm présents dans un échantillon de cellules, tissus ou organes et convertis en ADNc) en isolant à partir de chacun d'eux un court fragment spécifique de 9 à 14 pbs appelé séquence tag. Tous les tags (jusqu'à une cinquantaine) sont ensuite concaténés en une longue séquence unique qui est clonée et séquencée, révélant ainsi l'identité de chaque tag (et donc du gène dont il est issu). La fréquence avec laquelle le tag de chaque transcrit est retrouvé dans chaque population étudiée, reflète le niveau d'expression de chacun.

L'étude comparative des cellules ES humaines avec la lignée ES murine R1 a montré que les membres de la voie de signalisation du LIF sont plus fortement exprimés dans les cellules ES murines (Anisimov *et al.*, 2002 ; Richards *et al.*, 2004). A l'inverse les facteurs de transcription Oct-4 et Sox2 sont plus représentés dans les ES humaines. Cependant, cette méthode se heurte aux mêmes problèmes que ceux des puces à ADN : l'hétérogénéité des populations de cellules ES humaines. En utilisant une banque de 40 SAGEs de souris, les transcrits de certains gènes identifiés par les puces ont été comparés. Les facteurs de transcription Utl1, Sox 2, Oct-4 et nanog se sont avérés de bons indicateurs de la pluripotence des cellules ES. Cependant, pour s'assurer qu'un gène intervient de façon non équivoque dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES, une étude fonctionnelle est nécessaire.

#### **I.1.3.1.3 Analyse protéomique**

L'approche protéomique est essentielle pour interpréter le phénotype cellulaire des cellules ES. Le maintien de la pluripotence de ces cellules nécessite une régulation des événements associés à la transcription, à la traduction ainsi que ceux impliqués dans les modifications posttraductionnelles. Elliott *et al* en 2004 ont établi une banque de données sur la lignée ES R1 murine en utilisant une électrophorèse à 2 dimensions couplée à la spectrométrie de masse. Sur les 700 spots obtenus, 241 ont été étudiés et

correspondent à des protéines identifiées dont la moitié est associée à la réparation de l'ADN, la transcription, et la traduction. 21% de ces protéines présentent une modification posttraductionnelle spécifique, suggérant un rôle important de ces modifications sur l'activité des protéines. Ces premiers résultats montrent que les analyses du transcriptome sont insuffisantes pour expliquer les bases moléculaires et cellulaires de la pluripotence des cellules ES.

### **I.1.3.2 Partenaires de la pluripotence**

Parmi les gènes identifiés STAT-3, Oct-4, Nanog, BMP et Wnt se présentent comme les acteurs de cet état indifférencié.

#### **I.1.3.2.1 STAT-3**

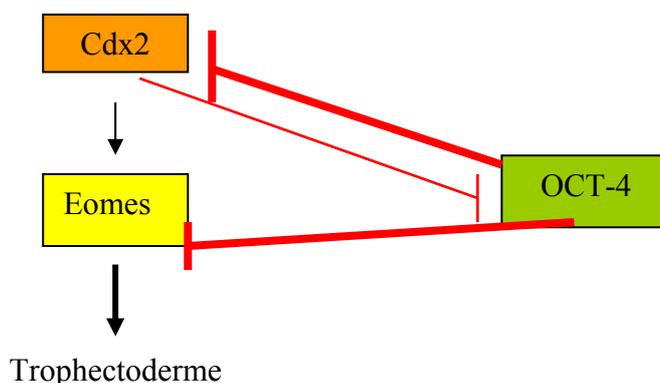
Comme décrit dans le paragraphe précédent, la fixation du LIF sur son récepteur active les voies de signalisation ERK et JAK/STAT3. STAT3 active les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules ES, et est le facteur clé de cette cascade. Matsuda *et al* en 1999 ont montré qu'une forme active de STAT3 induite par le tamoxifène pouvait maintenir la pluripotence des cellules ES en l'absence de LIF. La voie ERK, à l'inverse, induit la différenciation des cellules ES. Ainsi, l'état indifférencié de ces cellules dépend de l'équilibre entre les différents signaux émanant de ces deux voies de signalisation. Toutefois, plusieurs études ont remis en cause le rôle primordial de STAT3 dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES. D'une part, des embryons déficients pour la voie de signalisation LIF/STAT3 se développent normalement jusqu'au stade blastocytaire sans effet sur les cellules de la masse interne. D'autre part, quelques lignées de cellules ES murines peuvent conserver leur capacité de pluripotence en l'absence de LIF (Berger *et al.*, 1997 ; Dani *et al.*, 1998). Ceci suggère que d'autres facteurs peuvent être impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES.

#### **I.1.3.2.2 Oct-4**

Oct-4 intervient dans le maintien de la pluripotence des cellules ES en inhibant la différenciation des cellules ES en trophoctoderme. Niwa *et al* en 2005 montrent que des cellules ES murines *in vitro* et *in vivo* peuvent se différencier en trophoctoderme. *In vitro*, la surexpression du facteur de transcription cdx2 impliqué dans cette différenciation conduit les cellules ES vers une différenciation trophoctodermique. *In*

*vivo*, des cellules ES transfectées avec une forme inducible de *cdx2* par une hormone sont injectées dans un blastocyste hôte. En l'absence de l'hormone, les cellules ES colonisent tous les tissus de l'embryon, tandis qu'en sa présence elles envahissent le placenta.

Niwa *et al* démontrent qu'Oct-4 agit en bloquant l'expression et l'activité de *cdx2* (Niwa *et al.*, 2005). En l'absence de gène *cdx2* fonctionnel, les embryons sont dépourvus de trophoctoderme et expriment fortement les gènes Oct-4 et *nanog* (Strumpf *et al.*, 2005), suggérant une répression par *cdx2* des gènes impliqués dans la pluripotence. Par ailleurs, dans les cellules ES déficientes pour Oct-4, le niveau d'expression de *cdx2* est augmenté. Il existe donc une boucle de régulation négative réciproque permettant à *cdx2* d'interférer directement sur la boucle de régulation d'Oct-4, et à Oct-4 d'agir sur celle de *cdx2*. Ce mécanisme nécessiterait l'intervention d'un troisième partenaire permettant de neutraliser les effets activateurs transcriptionnels de chacun (figure 10). La différenciation en trophoctoderme nécessite la présence d'un deuxième facteur de transcription Eomes. La surexpression de ce dernier en l'absence de *cdx2* conduit à une différenciation incomplète. En effet, Eomes n'agit pas sur le niveau d'expression d'Oct-4. A l'inverse, Oct-4 inhibe l'expression de ce facteur (figure 10).



**Figure 10 : Mode d'action d'Oct-4 dans les cellules ES murines aboutissant à l'inhibition de la différenciation en trophoctoderme (d'après Niwa *et al.*, 2005)**

Dans les cellules ES humaines, *Cdx2* n'est pas exprimé (Hay *et al.*, 2004). Toutefois, une diminution d'expression d'Oct-4 entraîne une augmentation d'expression de *cdx2* et des autres marqueurs de la différenciation en trophoctoderme, ainsi que du facteur de transcription GATA 6 impliqué dans la différenciation en endoderme primitif.

Oct-4 a besoin de cofacteurs pour assurer la transcription de ces gènes cibles. Les cofacteurs principaux, Sox2 et Foxd3 (connu sous le nom de genesis) interviennent dans la pluripotence. En l'absence de l'un ou l'autre de ces deux cofacteurs, les embryons sont dépourvus d'épiblaste. Sox2 et Oct-4 agissent sur un ensemble de gènes dont Sox2, pou5f1, fgf4, nanog et utf1.

### **I.1.3.2.3 Nanog**

Le facteur de transcription Nanog, découvert par Chambers *et al* et Mitsui *et al*, est un membre de la famille des facteurs de transcription se fixant à l'ADN. Il intervient dans la pluripotence des cellules ES et dans la formation de l'épiblaste *in vivo*. Deux gènes ont été identifiés chez l'homme et un chez la souris. Nanog est présent dans les cellules ES murines et humaines, les cellules souches embryonnaires germinales (EG) et peut être détecté dans le tissu adulte. Son niveau d'expression varie au cours du développement : il est détecté au stade morula, augmente et se maintient au niveau de l'ICM et de l'épiblaste et diminue lors de la gastrulation (Mitsui *et al.*, 2003 ; Chambers *et al.*, 2003).

Pour confirmer son rôle dans la pluripotence, un transgène codant pour Nanog a été intégré dans les cellules ES. La surexpression de ce facteur de transcription permet de maintenir les capacités de pluripotence de ces cellules en présence d'un antagoniste du récepteur au LIF. A l'inverse, les cellules ES non modifiées dans les mêmes conditions se différencient (Vernallis *et al.*, 1997). Une analyse biochimique a pu démontrer (1) que la surexpression de Nanog dans ces cellules n'affecte pas l'activation de Stat3, et (2) que Stat3 n'agit pas sur Nanog (Chambers *et al.*, 2003 ; Mitsui *et al.*, 2003). Par ailleurs, en l'absence de gp130, Nanog ne maintient pas l'auto-renouvellement des cellules ES. En dépit de l'indépendance de ces deux voies, elles agissent ensemble pour assurer la pluripotence des cellules ES.

Nanog inhibe la différenciation des cellules ES en endoderme primitif *in vitro* et participe *in vivo* au maintien de l'épiblaste. En l'absence de gène Nanog fonctionnel, les embryons forment du trophoctoderme et de l'endoderme primitif, mais pas d'épiblaste (Mitsui *et al.*, 2003). Les cellules ES déficientes pour Nanog se différencient en endoderme extraembryonnaire. Dans les deux cas, une surexpression

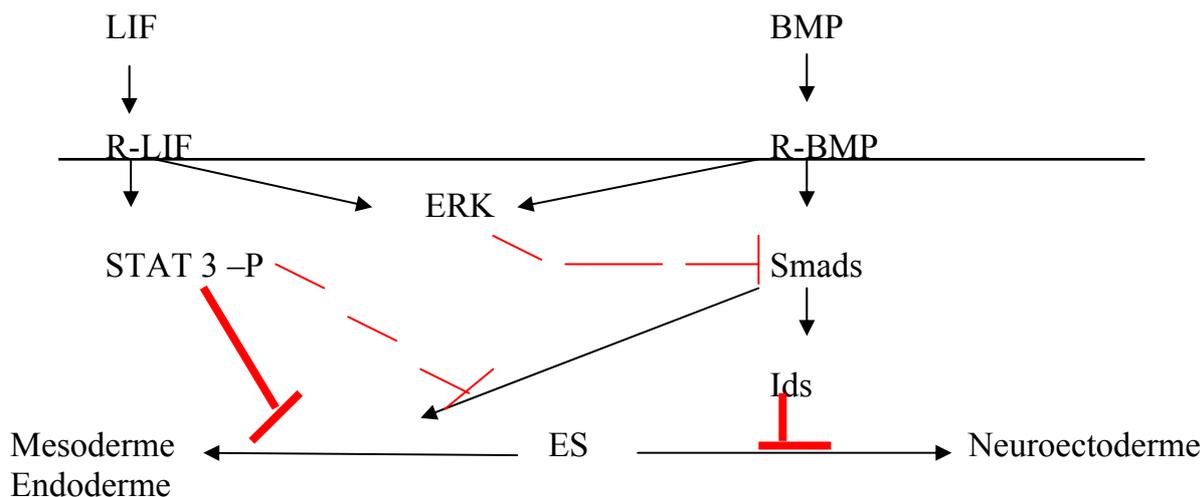
des facteurs de transcription GATA 4 et 6 est observée, suggérant un contrôle négatif de Nanog sur ces gènes.

#### **I.1.3.2.4 BMPs**

Les BMPs appartiennent à la superfamille du TGF- $\beta$  et participent au maintien de la pluripotence des cellules ES murines en inhibant leur différenciation en neuroectoderme (Munoz-Sanjuan et Brivanlou, 2002 ; Ying *et al.*, 2003). En effet, en l'absence de sérum, le LIF ne peut bloquer la différenciation spontanée des cellules ES en neurones. L'addition dans ces cultures de facteurs de croissance tels que BMP4, BMP2, GDF6, permet de maintenir les cellules ES à long terme dans un état indifférencié (Ying *et al.*, 2003). A l'inverse, le TGF- $\beta$ 1 ne peut assurer cette fonction. Cependant, en présence de BMP et en l'absence de LIF une différenciation non neuronale est activée.

En se fixant sur leur récepteur serine/thréonine kinase, les BMPs activent les voies de signalisation ERK, P38 MAPK et smads. Ces dernières induisent dans les cellules ES, l'expression de nombreux gènes dont la famille Id. Parmi ces membres, les facteurs de transcription à « hélice-boucle-hélice », Id1, Id2 ou Id3 sont activés dans les cellules ES murines. Ces derniers agissent en séquestrant les protéines E qui sont les partenaires des facteurs de transcription proneuronaux tels que Mash-1. Les membres de la famille Id peuvent exercer leur action en interagissant avec d'autres facteurs tels que Pax (Norton, 2000). Par ailleurs, l'expression de Id est augmentée en présence de sérum et peut être induite par Nanog.

Il existe un équilibre entre la voie de signalisation du LIF et celle des BMPs. Cette dernière inhibe la différenciation des cellules ES en neuroectoderme et celle du LIF en endoderme et mésoderme (figure 11). Ainsi, STAT 3 peut réprimer directement ou indirectement les gènes conduisant au mésoderme et à l'endoderme alors que smads activent ces mêmes gènes. STAT 3 peut agir pour limiter l'action des smads et restreindre leurs actions sur certains gènes comme Id. Ces interactions pourraient se réaliser sous la forme d'un complexe ternaire impliquant STAT 3/Smads et le cofacteur P300 comme cela a été décrit dans les cellules neuroépithéliales (Nakashima *et al.*, 1999).



**Figure 11: Interaction de la voie LIF et BMPs dans le maintien de la pluripotence des cellules ES murines.** La voie LIF inhibe la différenciation en mésoderme et endoderme, et la voie BMPs celle en neuroectoderme. La voie ERK est activée par ces deux voies et s'oppose à l'auto-renouvellement. Néanmoins, cette voie peut être considérée comme une boucle de régulation négative en inhibant la phosphorylation des smads (d'après Nakashima *et al.*, 1999)

A la différence des cellules ES murines, les cellules ES humaines répondent différemment aux BMPs. Ces derniers favorisent leur différenciation. En effet, la culture des cellules ES humaines sur des cellules nourricières en présence de sérum, induit leur différenciation en endoderme primitif (Pera *et al.*, 2004). L'utilisation d'un antagoniste de la voie des BMPs (Noggin) inhibe cette différenciation (Pera *et al.*, 2004). Par ailleurs, la voie du TGF- $\beta$  pourrait également intervenir dans le maintien de cet état indifférencié (Amit *et al.*, 2004). Les BMPs peuvent également être la cible d'autres voies de signalisation telles que celle activée par les Wnt.

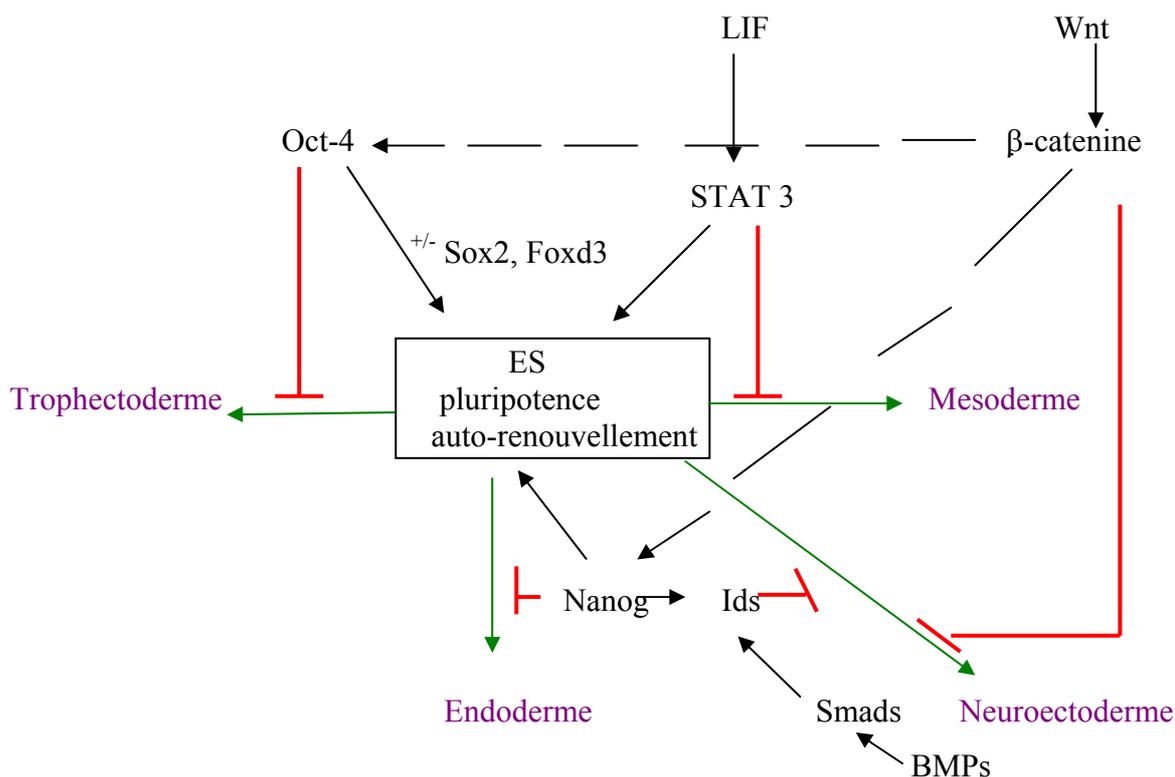
### I.1.3.2.5 Wnt

La voie de signalisation activée par les Wnts interviendrait à deux niveaux dans le maintien de la pluripotence des cellules ES : 1) elle supprimerait la différenciation neuronale de ces cellules (Aubert *et al.*, 2002), et 2) elle maintiendrait le phénotype indifférencié et les capacités de pluripotence des cellules ES murines et humaines (Sato *et al.*, 2004). En effet, les cultures de cellules ES murines et humaines, en présence ou en absence de sérum et de cellules nourricières, permettent de maintenir l'expression des facteurs de transcription Oct-4 et Nanog dans ces deux lignées cellulaires (Sato *et al.*, 2004). Les Wnts sont des glycoprotéines qui se fixent sur le récepteur frizzled. L'activation de cette voie conduit à l'inhibition de la glycogène

synthase kinase 3 (GSK3), permettant une accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci interagit avec Tcf/Lef pour réguler l'expression des gènes cibles. Sato *et al* ont démontré en utilisant un inhibiteur de la GSK3 nommé BIO que l'activation de la voie Wnt maintenait le phénotype indifférencié des cellules ES murines et humaines et l'expression d'Oct-4, Rex1 et Nanog en l'absence de LIF.

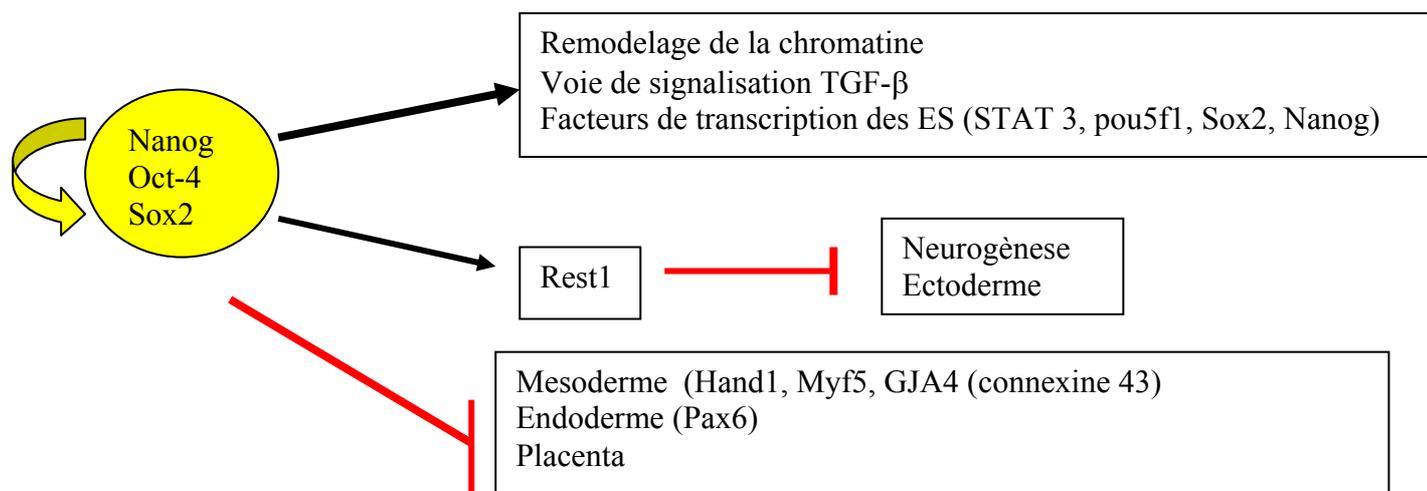
Il existerait une interaction synergique entre la voie Wnt et celle du LIF pour inhiber la différenciation des cellules ES murines (Hao *et al.*, 2006). La voie Wnt stimulerait la transcription de STAT 3 permettant ainsi une accumulation de la protéine dans le cytoplasme et une activation de STAT 3 par les JAK kinases.

L'ensemble de ces facteurs agit en réseau pour maintenir l'état indifférencié des cellules ES. Le schéma ci-dessous, résume le mode d'action de ces différents éléments dans les cellules ES murines (figure 12).



**Figure 12: Relation entre les différentes voies qui interviennent dans la pluripotence des cellules ES murines.** Oct-4 inhibe la voie de différenciation en trophoctoderme, Nanog celle en endoderme. Les voies activées par les BMPs et les Wnts permettent d'inhiber la différenciation en neuroectoderme. Cependant, ces facteurs ne peuvent indépendamment conserver l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules ES. Des facteurs additifs tels que STAT3 activé par le LIF sont requis pour maintenir à long terme la pluripotence des cellules ES.

Les cellules ES humaines présentent un schéma de régulation où Oct-4, Sox2 et Nanog constitueraient le point central (Orkin *et al.*, 2005). L'équipe de Boyer *et al* en 2005 ont montré en utilisant une technique couplant l'immunoprécipitation de la chromatine et les puces à ADN (CHIP/CHIP), que ces trois facteurs individuellement ou ensemble se localisent sur les régions promotrices d'un grand nombre de gènes-cibles (Boyer *et al.*, 2005). Ces facteurs pourraient contrôler leur propre expression et inhiber celle des gènes impliqués dans la différenciation des cellules ES dans les trois types de feuillet embryonnaires (figure 13).



**Figure 13 : Modèle de régulation transcriptionnel hypothétique conduisant au maintien de la pluripotence des cellules ES humaines.** Les trois facteurs de transcription activent les gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  ou d'autres facteurs de transcription, et le gène Rest1 qui réprime spécifiquement les gènes neuronaux. De même ces facteurs inhibent les gènes impliqués dans la différenciation en endoderme, ectoderme, mésoderme ou trophoctoderme (d'après Boyer *et al.*, 2005).

#### I1.4 Autres facteurs intervenant dans la régulation de la pluripotence

##### - La méthylation

Des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN peuvent intervenir pour réguler l'expression spatiale et temporelle des acteurs de l'auto-renouvellement et de la pluripotence des cellules ES (Hattori *et al.*, 2004). Des études du promoteur et de l'« enhancer » du gène Oct-4 dans les cellules ES murines ont révélé que ces régions sont hypométhylées dans les cellules trophoblastiques, ce qui entraîne une répression de ce gène. L'expression des méthylases et déméthylases est forte dans les cellules ES, puis diminue lors de la différenciation. Ceci suggère leur importance dans la régulation et l'activation des gènes impliqués dans la pluripotence des cellules ES.

#### - Les miRNAs

Les microRNAs sont des petits ARNs de 22 nucléotides non codants qui interviennent dans la régulation posttranscriptionnelle des gènes. Des miRNAs ont été identifiés dans les cellules ES murines et humaines et peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules ES. Des cellules ES déficientes pour la machinerie permettant l'obtention de ces miRNAs sont incapables de se différencier (Kanellopoulou *et al.*, 2005).

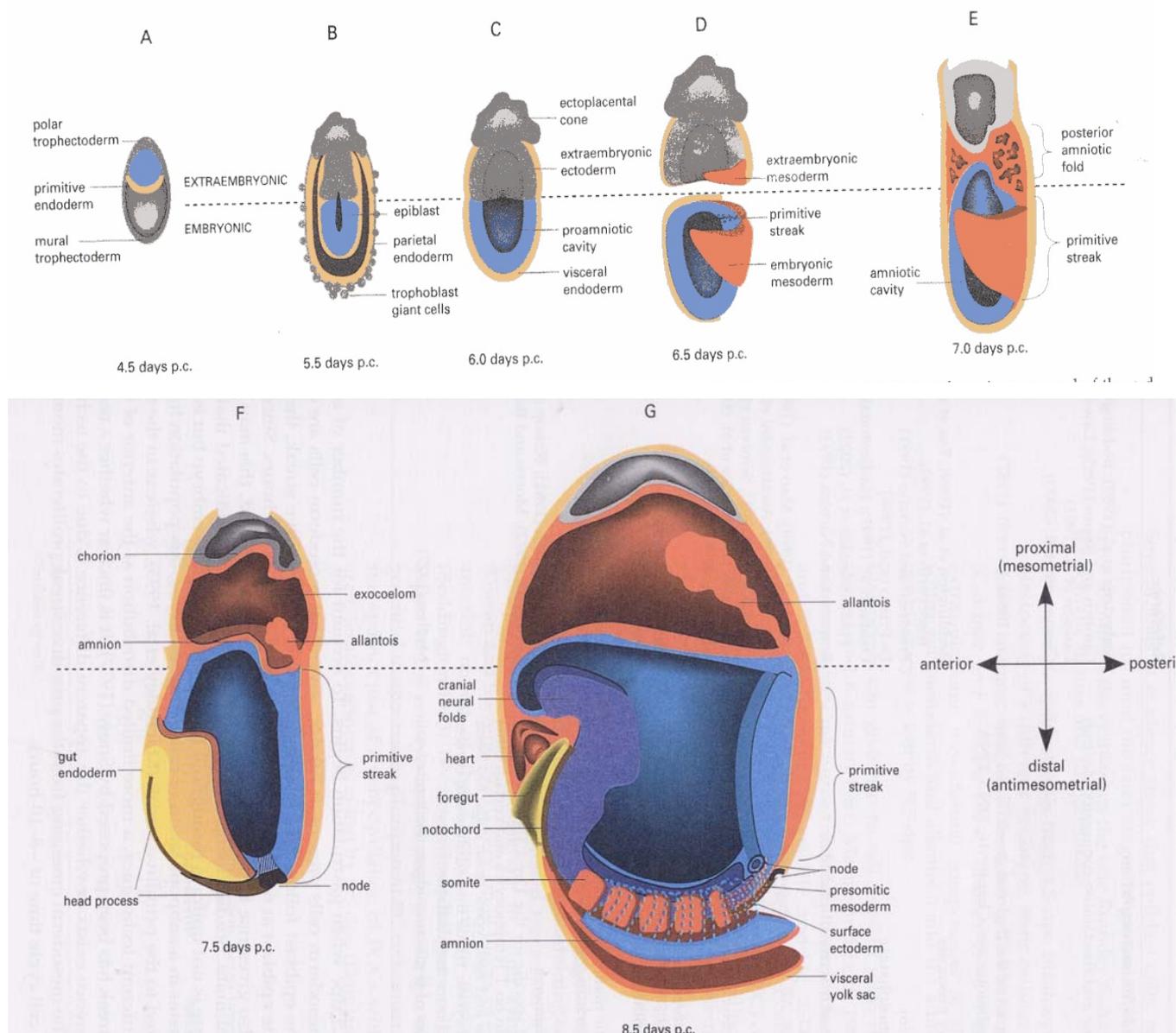
#### - La matrice extracellulaire

Selon le support sur lequel les cellules ES sont cultivées, ces cellules vont synthétiser divers types d'intégrines qui permettent l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et le maintien de la pluripotence.

### • Bilan des propriétés des cellules ES

Les cellules ES se caractérisent par les différents critères cités ci-dessous

- Elles dérivent de l'embryon au stade blastocyttaire précoce (ICM), ou tardif (épiblaste)
- Elles sont capables d'auto-renouvellement à long terme *in vitro* sans se différencier.
- Elles expriment le facteur de transcription Oct-4
- Elles maintiennent un caryotype stable, diploïde
- Elles sont pluripotentes : capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme)
- Elles sont capables de s'intégrer dans tous les tissus fœtaux durant le développement et de constituer des chimères
- Elles sont capables de coloniser les lignées germinales
- Elles sont clonogéniques (la division symétrique des cellules ES aboutit à deux cellules filles strictement identiques)
- Elles peuvent être induites dans une voie de prolifération ou de différenciation
- Elles ne possèdent pas de « check point » ou point de contrôle en phase G1 du cycle cellulaire. Ces cellules sont en phase S, et aucun stimulus extérieur n'est requis pour enclencher la division cellulaire



### Figure 14: Représentation schématique du développement chez la souris de

**l'implantation à la neurula.** A) L'embryon est composé de trois feuillets au moment de l'implantation : Trophectoderme (gris), endoderme primitif (jaune), épiblaste (bleu). Au cours de l'étape suivante, l'endoderme primitif se différencie en endoderme pariétal (B) et en endoderme viscéral ; l'épiblaste s'organise en épithélium bordant la cavité amniotique (C). Puis, la ligne primitive se forme à 6,5 jours (D). Les cellules épiblastiques s'invaginent le long de cette ligne permettant la formation du mésoderme embryonnaire et extra-embryonnaire. A 7 jours, La ligne primitive s'étend à travers la partie distale de la gastrula et la cavité constituant le sac vitellin apparaît dans le mésoderme extraembryonnaire (E). A 7,5 jours, le mésoderme extraembryonnaire se différencie en allantoïde, chorion et amnios qui constitueront le placenta et le sac vitellin, l'endoderme constitué à partir de l'invagination des cellules épiblastiques le long de la ligne primitive donne l'intestin (jaune), la notochorde et le neuroectoderme (marron) sont présents. A 8,5 jours, (G) le neuroectoderme (en mauve) s'organise en plis neuronaux. Le mésoderme embryonnaire se différencie pour donner le mésoderme latéral dont le cœur, le mésoderme para-axial qui s'organise en somites. La ligne primitive continue de fournir le mésoderme additionnel pour les futures structures du tronc. (D'après de « manipulating the mouse embryo », Nagy et al, 2003)

- Leur chromosome X n'est pas inactivé contrairement aux cellules somatiques femelles de mammifères

Les cellules ES peuvent se différencier dans les différents types cellulaires qui constituent un organisme dont le cœur. Cette différenciation cardiaque présente des similitudes avec le développement du cœur *in vivo*. Les cellules ES constituent donc un modèle très intéressant pour cette étude. Nous aborderons dans le chapitre suivant le développement *in vivo* du cœur, puis les aspects moléculaires conduisant à sa formation en tenant compte des données obtenues par les manipulations génétiques des embryons et des cellules ES.

## **II. Développement cardiaque**

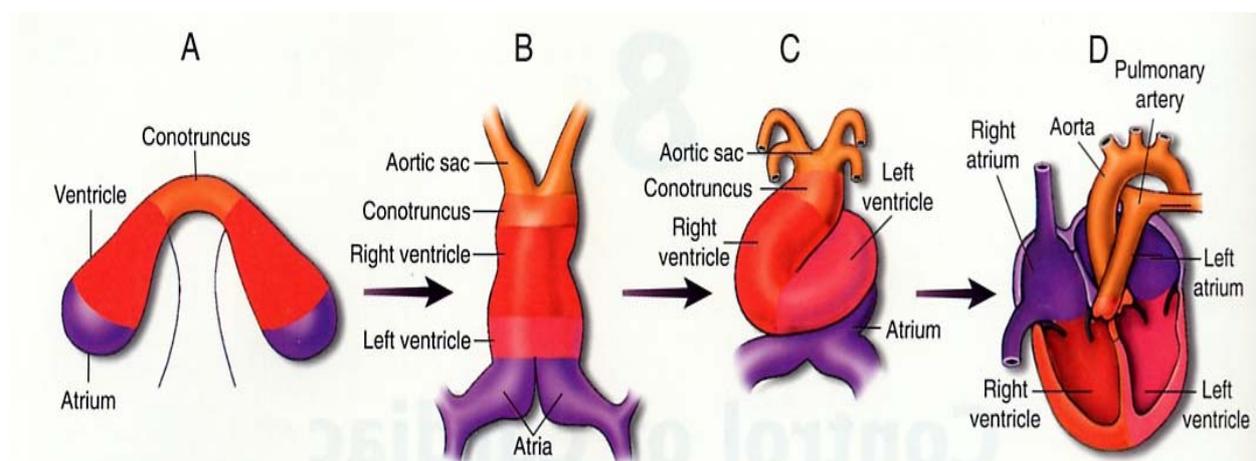
### **B. La mise en place du mésoderme**

Le mésoderme est spécifié au cours de la gastrulation, qui débute au cours de l'implantation chez les rongeurs et les primates. Les mouvements morphogénétiques décrits sont semblables à ceux observés chez le poulet. La gastrulation débute lors de la naissance de la ligne primitive. Celle-ci se forme à partir des cellules épiblastiques à 6,5 jours de développement (figure 14). Cette ligne détermine l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Les cellules épiblastiques s'invaginent le long de la ligne primitive et vont migrer entre l'épiblaste et l'endoderme viscéral pour constituer les feuilletts endodermiques et mésodermiques. Vingt quatre heures après le début de la gastrulation, le mésoderme va migrer dans deux directions, postérieurement et latéralement pour constituer le mésoderme embryonnaire et extraembryonnaire (figure 14 D), à l'inverse l'endoderme suivra une voie plus antérieure par rapport à la ligne primitive. A ce stade, les trois feuilletts sont déterminés et sont différenciés. L'épiblaste prendra le nom d'ectoderme. A 7,5 jours, le mésoderme est spécifié et il se divise en différentes structures du tissu extraembryonnaire dont l'annios, le chorion et l'allantoïde qui constitueront le placenta et le sac vitellin. Le mésoderme embryonnaire se différencie en mésoderme latéral qui donnera le cœur, en mésoderme intermédiaire

qui constituera le système uro-génital et en mésoderme paraxial ou somitique qui aboutira à la formation de la colonne vertébrale et à la plupart des tissus conjonctifs du dos (figure 14).

### A) La cardiogénèse

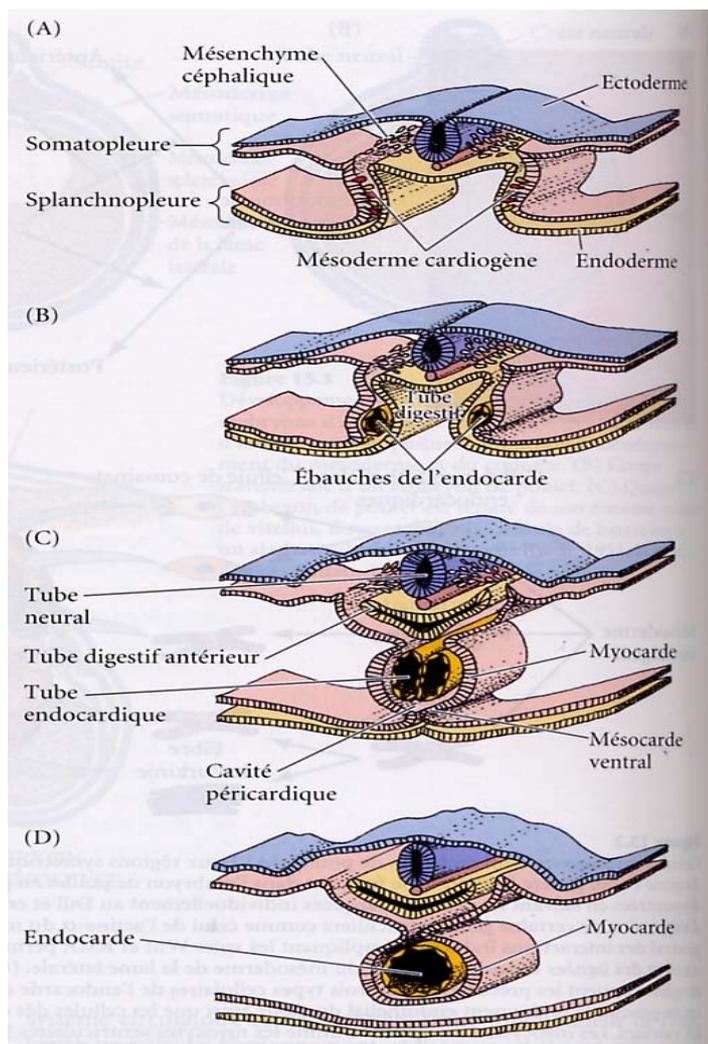
Elle débute à 7,5 jours et se termine à 11 jours chez la souris. Elle se déroule en plusieurs étapes aboutissant à la formation du cœur adulte (figure 15).



**Figure 15 : Schéma du développement du cœur des vertébrés.** Les cellules du mésoderme précardiaque sont localisées au niveau du croissant cardiaque (A) Ces cellules vont migrer pour former le tube linéaire cardiaque (B) Ensuite, le tube va subir une boucle droite (C) puis une septation pour donner les différentes régions du cœur (conotruncus, tronc commun des artères) (extrait de Harvey., 1999)

#### II.1.2.1 Formation du tube cardiaque

Les futures cellules cardiaques proviennent du mésoderme latéral antérieur et constituent le premier champ cardiaque. Celui-ci se divise en deux feuillets : un feuillet somatique ou externe qui s'associe au trophoctoderme pour former la somatopleure et un feuillet splanchnique ou interne qui s'étale sur l'endoderme primitif pour former la splanchnopleure (figure 16). A 7 jours, la spécification du lignage cardiaque se réalise à partir des cellules du mésoderme splanchnique.



**Figure 16: Formation du cœur du poulet à partir du mésoderme splanchnique.** En réponse à des signaux venant de l'endoderme, le mésoderme splanchnique se différencie en mésoderme précardiaque (A). Ces cellules vont migrer de part et d'autre de la plaque neurale, puis converger au niveau de la ligne médiane ventrale pour constituer le tube cardiaque linéaire (B) Le tube digestif antérieur se ferme par un repliement centripète du mésoderme splanchnique qui met en contact les deux tubes cardiaques (C et D) (Extrait de *Biologie du développement*, Gilbert., 2004))

En réponse à des signaux venant de l'endoderme, une portion en forme de croissant du mésoderme splanchnique localisée dans la région antérieure et dorso-latérale de l'embryon se différencie en mésoderme précardiaque (Olson et Srivastava, 1996 ; Fishman et Olson, 1997). Les cellules ne se contractent pas à ce stade par manque d'organisation des protéines contractiles. A 8 jours, les cellules du mésoderme précardiaque vont migrer de part et d'autre de la plaque neurale, puis converger au niveau de la ligne médiane ventrale pour constituer le tube cardiaque linéaire. Cette migration cesse lorsqu'elles rencontrent les parois du tube digestif antérieur (figure 16). De même que chez le poulet, le tube digestif antérieur se ferme par un repliement

centripète ou plicature du mésoderme splanchnique qui met en contact les deux tubes cardiaques (figure 16). Cette origine bilatérale du cœur peut être démontrée en bloquant chirurgicalement la fusion du mésoderme. On obtient alors une condition appelée *cardia bifida* où le cœur se forme de chaque côté du corps.

Durant la formation du tube cardiaque, les cellules du mésoderme cardiaque commencent à exprimer la N-cadhérine et s'organisent en un épithélium qui bordera la future cavité péricardiale dans laquelle se formera le cœur. La synthèse de N-cadhérine sera réprimée dans une partie de ces cellules qui se dissocient de l'épithélium et forment l'endocarde. Ce dernier participe à la formation des valvules cardiaques et secrète des protéines qui réguleront la croissance du myocarde et la localisation du tissu nerveux dans le cœur. A l'inverse, les cellules qui expriment un fort taux de N-cadhérine donneront le myocarde. Ces deux tissus sont séparés par une matrice extracellulaire appelée gelée cardiaque. Ce tube cardiaque n'est pas homogène tout le long de sa longueur. Il est divisé en différents segments dont les expressions géniques préfigurent les futures chambres atriales et ventriculaires. Rapidement, le tube linéaire commence à battre et initie le processus de boucle.

### **II.1.2.2 Boucle cardiaque**

La boucle cardiaque permet d'une part d'orienter les chambres atriales et ventriculaires selon un axe gauche/droite et d'autre part d'aligner les vaisseaux avec les chambres cardiaques. Pour atteindre ce but, le tube cardiaque linéaire va subir une boucle dextrogyre.

### **II.1.2.3 La septation des chambres et des vaisseaux**

La septation permet de démarquer les chambres atriales et ventriculaires par la formation du septum interventriculaire et des valves. Cette séparation s'effectue lorsque les cellules du myocarde produisent un facteur qui induit les cellules de l'endocarde voisin à se détacher et à pénétrer dans la gelée cardiaque située entre les deux feuilletts endocardique et myocardique. Ces cellules endocardiques forment les coussinets endocardiques qui divisent le tube cardiaque en deux parties atriale et ventriculaire. Pendant ce temps, l'oreillette est cloisonnée par deux septums qui se dirigent vers les coussinets endocardiques (figure 15)

Cependant, une population cellulaire issue de la crête neurale peut participer à la cardiogénèse. Ces cellules migrent à partir des plis neuronaux et se condensent avec le tronc commun des artères. Cet ensemble donnera les artères aortique et pulmonaire. Après la septation de ces artères, les vaisseaux vont effectuer une rotation pour achever la connection avec les ventricules droit et gauche.

#### **II.1.2.4 Existence d'un deuxième champ cardiaque : Origine des cellules du ventricule droit et du cône de sortie aortique**

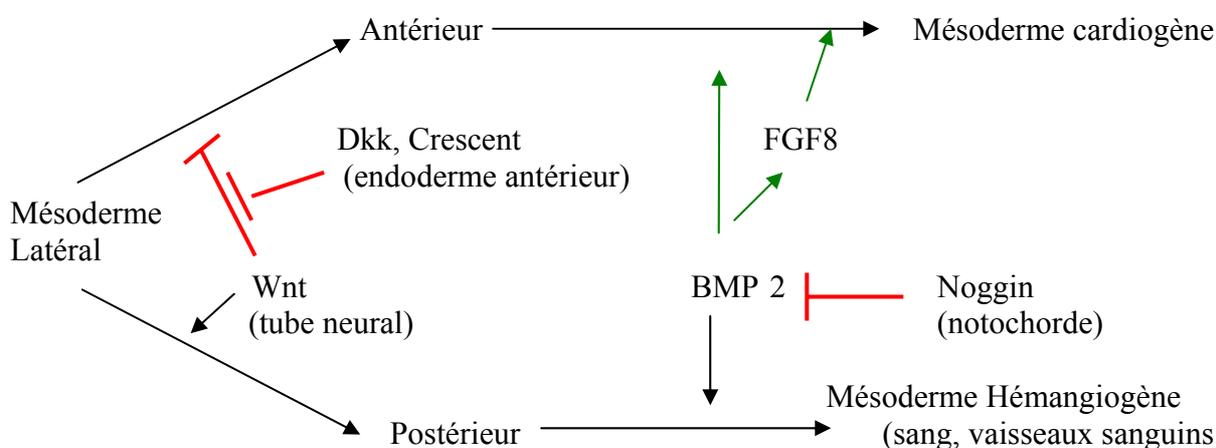
Différentes expériences tendent à montrer qu'il existe un deuxième champ cardiaque, dérivé d'une population de précurseurs cardiaques distincts de ceux décrits pour le champ cardiaque primaire (Kelly *et al.*, 2001 ; Waldo *et al.*, 2001). Ce deuxième champ a été identifié et est localisé dans le mésoderme antérieur ou mésoderme pharyngial et adjacent au champ cardiaque primaire. Il interviendrait au moment de la formation de la boucle. La présence de ces deux populations expliquerait la restriction de l'expression spatiale de certains gènes (Kelly et Buckingham, 2002). Ainsi, Tbx5 joue un rôle important dans la formation des oreillettes et du ventricule gauche, mais n'est pas requis pour la formation du ventricule droit ou du cône de sortie. Cependant, la plupart des gènes impliqués dans la différenciation cardiaque sont exprimés dans ces deux champs. Toutefois, l'équipe de Evans en 2003 a pu montrer qu'un gène codant pour ISL-1 (LIM-homeodomain transcription factor) joue un rôle important dans le développement de ce deuxième champ cardiaque (Cai *et al.*, 2003). Les souris déficientes pour ISL-1 présentent un cœur déformé avec une impossibilité de réaliser une boucle droite à 9,5 jours de développement. De plus, le ventricule droit et le cône de sortie sont absents dans ces embryons.

### **II.2.3 Aspect moléculaire de la cardiogénèse**

#### **II.2.3.1 Spécification du lignage cardiaque**

La spécification du mésoderme cardiaque est induite par l'endoderme adjacent. En l'absence de ce tissu, le cœur ne peut pas se former (Schultheiss *et al.*, 1995). L'action de l'endoderme passe par les voies de signalisation BMP et FGF. Les BMPs endodermiques favorisent à la fois le développement cardiaque et l'hématopoïèse et peuvent être bloqués par Noggin et Chordin issus de la notochorde. Ces BMPs

induisent la synthèse de FGF8 dans l'endoderme sous-jacent au mésoderme cardiogène. FGF8 serait essentiel à l'expression des protéines cardiaques (Alsan et Schultheiss, 2002). Les protéines Wnt du tube neural, particulièrement Wnt3 et 8 inhiberaient la cardiogénèse et favoriseraient l'hématopoïèse. Cependant, l'endoderme antérieur synthétise des inhibiteurs de Wnt tels que Cerberus, Dickkopf et Crescent qui empêchent la fixation des protéines Wnt sur leurs récepteurs. Les précurseurs cardiaques sont spécifiés là où la présence des BMPs libérés par le mésoderme latéral et l'endoderme ainsi que les inhibiteurs de Wnt synthétisés par l'endoderme antérieur coïncident (figure 17) (Marvin *et al.*, 2001, Tzahor et Lassar, 2001).



**Figure 17: Schéma général des interactions impliquant les voies Wnt et BMP induisant la formation du cœur et des vaisseaux à partir du mésoderme latéral (d'après Marvin *et al.*, 2001; Tzador *et al.*, 2001)**

La voie des BMPs induit la synthèse du premier facteur de transcription cardiaque Nkx2.5 dans le mésoderme cardiogène, et agit sur d'autres facteurs de la différenciation cardiaque tels que la famille GATA et MEF2. L'intervention de la voie BMP a été montrée dans les cellules cancéreuses P19CL6. Ces dernières, peuvent se différencier en présence de DMSO en cellules cardiaques, et expriment Nkx2.5. A l'inverse dans ces mêmes conditions, la lignée P19CL6 exprimant constitutivement un inhibiteur de la voie BMP (Noggin) ne peut se différencier, et l'expression de Nkx2.5 n'est pas activée. Néanmoins, la différenciation cardiaque peut être restaurée dans ces cellules en surexprimant BMP2 ou des intermédiaires de cette voie, tels que les smads (Monzen *et al.*, 1999, 2002).

## II.2.3.2 Différenciation cardiaque et migration des progéniteurs cardiaques

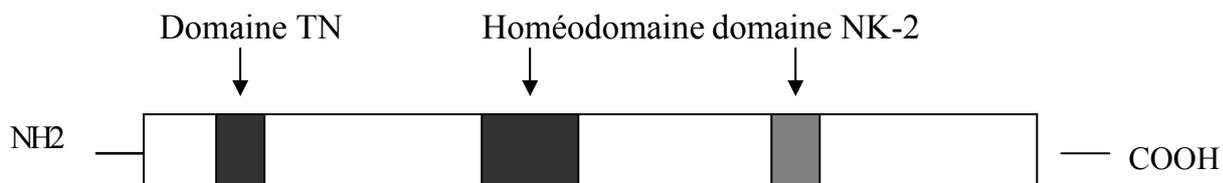
### II.2.3.1 Nkx2.5

- Localisation :

Csx/Nkx2.5 est l'un des marqueurs les plus précoces du développement cardiaque. Il appartient à la famille des gènes NK qui est conservée tout au long de l'évolution (Komura et Izumo, 1993). Chez les vertébrés, Csx/Nkx2.5 est fortement exprimé dans les champs cardiaques primaire et secondaire durant le développement, et il continue à être fortement exprimé à l'âge adulte (Komuro et Izumo, 1993 ; Stanley *et al.*, 2002). Ce gène intervient principalement dans la hiérarchisation et la régulation transcriptionnelle des gènes intervenant dans la différenciation cardiaque. Ce rôle prépondérant dans le développement cardiaque a pu être démontré en étudiant des souris déficientes pour ce gène. Ces dernières présentent un retard de croissance et une incapacité à former la boucle cardiaque (Lyons *et al.*, 1995). Dans ce modèle, l'expression de plusieurs gènes cardiaques est diminuée en particulier des facteurs de transcription impliqués dans la formation des chambres ventriculaires tels que eHAND/HAND1 et Irx4. Csx/Nkx2.5 pourrait aussi intervenir dans la naissance du système de conduction cardiaque. En effet, une augmentation transitoire de son expression est observée dans ces cellules durant cette période (Thomas *et al.*, 2001).

- Structure de la protéine et mode d'activation de son expression:

Les protéines de la famille NK présentent une structure hautement conservée et sont composées d'un domaine TN en N terminal dont la fonction n'a pas été établie, d'un homéodomaine et d'un domaine spécifique des protéines NK2 (NK2-SD) (figure 18) L'homéodomaine possède un motif de « hélice-boucle-hélice » qui se fixe sur une séquence d'ADN consensus spécifique (5'-T(C/T)AAGTG-3') (Cheng et Schwartz, 1995). Le domaine Nk-2 a un rôle de répresseur transcriptionnel et peut opérer comme une interface d'interaction avec d'autres protéines.



**Figure 18: Structure et domaine fonctionnel de la protéine Csx/Nkx2.5 (d'après d' Akazawa et Komura, 2005).**

Des études ont été réalisées pour décoder les mécanismes conduisant à l'activation de Nkx2.5 dans le mésoderme cardiaque (Searcy *et al.*, 1998, Lien *et al.*, 1999). Ces études ont montré qu'il existait à l'intérieur du locus murin de Nkx2.5 de multiples « enhancers » et répresseurs qui interviennent pour moduler l'expression de ce gène à différents stades du développement embryonnaire. Ainsi, trois « enhancers » ont été identifiés : AR1, AR2 et AR3. AR1 possède deux régions régulatrices positives et une négative. Il est actif au stade de formation de la boucle, puis son action se restreint au ventricule droit. AR2 est activé dans le croissant cardiaque, au stade du tube cardiaque primitif et au niveau du cône de sortie. AR3 n'est exprimé qu'au niveau du cône de sortie. Les deux « enhancers » AR1 et AR2 seraient nécessaires pour diriger l'expression de Nkx2.5 dans le croissant cardiaque. Cette induction fait intervenir d'autres facteurs de transcription dont GATA 4 et smad4 un intermédiaire de la voie BMP2. Néanmoins, l'activation de Nkx2.5 semble plus complexe et nécessiterait l'intervention d'autres facteurs de transcription.

- Activation de la protéine et cibles:

L'activité transcriptionnelle de Nkx2.5 est régulée par des modifications post-traductionnelles. Nkx 2.5 forme un homodimère sur son site de fixation à l'ADN, puis la phosphorylation d'une serine au niveau de son homéodomaine par une caseine kinase II permet sa stabilisation sur son site de fixation. Son action est modulée par des interactions avec d'autres facteurs de transcription tels que GATA 4, Tbx5, Tbx20 et Tbx2. D'autre part, le facteur de transcription COUP-TF1 s'oppose à la transcription induite par Nkx2.5 en supprimant son site de fixation. Ce facteur diminue notamment l'expression de la calréticule. Les cibles directes de Nkx2.5 sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Gènes	Produit du gène	Références
Nppa	Peptide natriurétique (ANP)	Durocher <i>et al.</i> , 1996
Act1	$\alpha$ -actine cardiaque Protéine contractile	Chen et Schwartz, 1996
MEF2C	Facteur de transcription	Von Both <i>et al.</i> , 2004
Calreticuline	Protéine fixant le calcium	Guo <i>et al.</i> , 2001
Slc8a1	Ncx1 Echangeur sodique/calciq	Muller <i>et al.</i> , 2002
Gja4	Connexine 40, Gap jonction	Bruneau <i>et al.</i> , 2001
Myocardine	Facteur de transcription, coactivateur	Ueyama <i>et al.</i> , 2003
CARP	Corépresseur transcriptionnel	Zou <i>et al.</i> , 1997

**Tableau II: Gènes-cibles directs de Nkx2.5**

### II.2.3.2 Myocardine

La myocardine peut être considérée comme un élément important de la différenciation précoce des cellules cardiaques (Wang *et al.*, 2001).

### II.2.3.3 Famille des facteurs de transcription GATA

#### - Localisation

Cette famille a d'abord été identifiée chez la drosophile sous le nom de panier. Les gènes codant pour GATA 4, 5 et 6 sont exprimés dans le mésoderme précardiaque, le cœur et l'épithélium intestinal (Arceci *et al.*, 1993 ; Charron *et al.*, 1999). Chacun d'eux est exprimé à un stade précis du développement embryonnaire. Ils sont activés dans le mésoderme précardiaque et le tube cardiaque primitif au moins 6 à 12h avant l'expression des gènes codant pour des protéines contractiles cardiaques, et sont présents au moins aussi précocement que Nkx2.5. GATA 4 et 6 sont exprimés dans l'endoderme viscéral, un tissu qui joue un rôle inductif dans la spécificité cardiaque du mésoderme latéral. Ces deux gènes continuent à être exprimés dans le myocardium et l'endocardium tout le long de la vie de l'individu ; à l'opposé l'expression du gène codant pour GATA 5 disparaît à 16,5 jours de développement.

- Structure :

Toutes les protéines GATA contiennent un domaine conservé en « doigt de zinc » qui reconnaît et se fixe sur une séquence d'ADN consensus (A/TGATAA /G) (Ko et Engel, 1993). GATA 4, GATA 5 et GATA 6 sont présents dans le cœur et possèdent deux « doigts de zinc » et un domaine de localisation nucléaire, comme illustré dans la figure 19.



**Figure 19: Structure de la protéine murine GATA 4.** Les domaines transactivateurs sont marqués en noir, les domaines conservés en « doigt de Zinc » en bleu, et le signal de localisation nucléaire en vert (d'après Pikkarainen *et al.*, 2004).

Un certain nombre de gènes-cibles sont activés par la famille GATA et sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Gènes	Produits des gènes	Références
Myh6	Chaîne lourde de la myosine de type $\alpha$ ( $\alpha$ -MHC)	Molkentin <i>et al.</i> , 1994
TNC	Troponines C et I	Di Iasi <i>et al.</i> , 1998
Nppa, Nppb	Protéines natriurétiques atriales et ventriculaires (ANF, BNP)	Thuerauf <i>et al.</i> , 1994
Slc8a1	Echangeur sodique/calciq (Ncx1)	Cheng <i>et al.</i> , 1999
	Récepteur m2 acétylcholine	Rosoff <i>et al.</i> , 1998
dHand	Facteur de transcription	Mac Fadden <i>et al.</i> , 2000
Nkx2.5	Facteur de transcription	Searcy <i>et al.</i> , 1998

**Tableau III: Quelques-uns des gènes-cibles de la famille GATA**

## - Rôles de GATA

Différentes études ont mis en évidence le rôle de la famille GATA dans la régulation directe ou indirecte des gènes impliqués dans la différenciation cardiaque. Ainsi, la surexpression de GATA 4 dans les cellules P19 accélère la cardiogénèse et augmente le nombre de cardiomyocytes durant la différenciation *in vitro*. A l'inverse, l'introduction dans ces cellules d'un antisens dirigé contre GATA 4 et 6 conduit à un arrêt de la différenciation et à l'enclenchement du programme apoptotique (Grepin *et al.*, 1995). Pour préciser le rôle des facteurs de transcription GATA dans le développement cardiovasculaire *in vivo*, des cellules ES possédant une ou plusieurs mutations au niveau de ces gènes ont été utilisées pour produire des souris transgéniques. Ces travaux ont montré que le facteur de transcription GATA 4 n'est pas requis pour la spécification du lignage cardiaque, mais intervient dans la migration des progéniteurs cardiaques pour constituer le tube cardiaque primitif. Des embryons déficients pour GATA 4 meurent entre 8 et 10 jours. Ces derniers présentent une ou deux structures cardiaques aberrantes dans les régions antérieures du mésoderme latéral sans migration pour constituer le tube cardiaque primitif. La différenciation dans ces embryons n'est pas diminuée ce qui suggère une compensation par GATA 6 dont l'expression dans ce système est fortement augmentée. L'utilisation de cellules ES déficientes pour GATA 4 exprimant la  $\beta$ -galactosidase et injectées dans un blastocyste pour constituer une souris chimérique, a démontré que l'absence de migration des progéniteurs est due à une absence de signal provenant des tissus adjacents au mésoderme cardiaque (Narita *et al.*, 1997). Par ailleurs, GATA 6 semble réguler l'expression de GATA 4 au cours de la différenciation. Dans les cellules ES *gata6*<sup>-/-</sup>, la différenciation cardiaque est anormale et est accompagnée d'une diminution d'expression de GATA 4 (Morrisey *et al.*, 1998). Les souris déficientes pour GATA 5 ne présentent pas d'anomalie cardiaque, suggérant une compensation par les autres membres de cette famille.

### II.2.3.4 Mesp1 et 2

Ce sont des facteurs de transcription à « hélice-boucle-hélice » qui interviennent dans la migration des progéniteurs cardiaques. Des souris ne possédant pas de gène codant pour Mesp1 fonctionnel présentent une *cardia bifida* et des souris déficientes pour ces

deux gènes, une absence de différenciation des dérivés mésodermiques (Kitajima *et al.*, 2000). L'étude de ces souris a montré que la formation des cellules ventriculaires a lieu en l'absence de ces facteurs, ce qui n'est pas le cas des cellules de type atrial. Ces observations suggèrent un lignage précoce des cellules cardiaques.

### **II.2.3.5 Crypto 1**

Le gène *crypto* code pour un facteur de transcription Cr1 qui appartient à la famille de l'« Epidermal Growth Factor » (EGF). Ce facteur est présent au niveau du blastocyste, des cellules épiblastiques, puis du mésoderme, avant de se restreindre au niveau cardiaque (Johnson *et al.*, 1994). Il est alors détecté dans le tube linéaire cardiaque, puis dans la région du cône de sortie lors de la formation des chambres, puis son expression s'éteint à 10,5 jours. Ce gène intervient d'une part, dans la formation de l'axe antéro-postérieur et d'autre part participe à la différenciation cardiaque et à la migration des progéniteurs cardiaques pour constituer le tube cardiaque. En effet, dans les souris Cr1<sup>-/-</sup>, l'axe antéro-postérieur n'est pas formé et le tube cardiaque primitif n'est pas initié. Ce gène agirait par une voie indépendante des facteurs de transcription GATA, et Nkx2.5, et permettrait l'activation de la transcription des myosines par la voie MAPK. Ainsi, dans les cellules ES Cr1<sup>-/-</sup>, la différenciation cardiaque est bloquée et les protéines contractiles, telles que la chaîne lourde de la myosine, sont absentes (Xu *et al.*, 1999, 1998).

### **II.2.4 Formation de la boucle**

La formation de la boucle cardiaque dépend de nombreux facteurs, dont les protéines impliquées dans celle de l'axe gauche/ droite de l'embryon. Nkx2.5 intervient en contrôlant l'expression de deux autres facteurs de transcription *e* et *dHand*. En l'absence de ces protéines, la boucle et les ventricules ne se forment pas normalement (Srivastava *et al.*, 1995 ; Biben et Harvey, 1997). *Pitx2*, un facteur de transcription activé du côté gauche du tube cardiaque est essentiel pour obtenir une boucle normale. Ce dernier semble réguler l'expression temporelle de protéines comme la flexine, une protéine de la matrice extracellulaire qui contrôle la tension physique des tissus cardiaques (Tsuda *et al.*, 1996 ; Linask *et al.*, 2002). Les facteurs de transcription Nkx2.5 et *Mef2c* activent l'expression du gène *Xin* dont la protéine peut induire les

changements du cytosquelette qui sont nécessaires à la formation de la boucle cardiaque (Wang *et al.*, 1999).

### II.2.3.5 Morphogénèse des chambres : spécification ventriculaire

Différents facteurs de transcription interviennent dans la spécification des chambres ventriculaires. Parmi eux, Mef2, e et dHand, Irx4, NKx2.5, Tbx5 sont les éléments participant à cette formation.

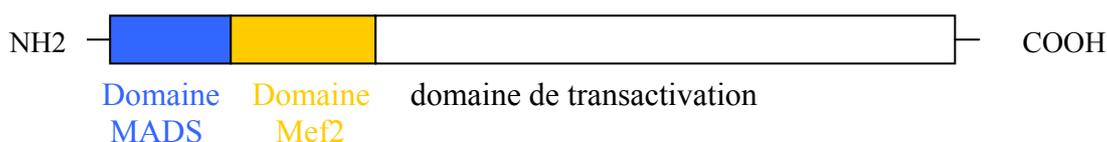
#### II.2.3.5.1 Mef2

##### - Localisation

Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul gène Mef2 ou D-MEF ; chez les vertébrés, il en existe 4 : Mef2 a à d. Ces derniers sont exprimés au cours du développement musculaire aussi bien que dans d'autres types cellulaires. Le facteur de transcription Mef2 n'agit pas seul, mais en coopération avec d'autres facteurs de transcription ce qui assure son expression dans un type cellulaire donné. Mef2b et c sont activés dans le mésoderme précardiaque à 7,75 jours chez la souris (Edmondson *et al.*, 1994 ; Molkenin *et al.*, 1996). A 8 jours, Mef2a et d sont détectés au niveau du tube cardiaque primitif (Edmonson *et al.*, 1994). Puis ces 4 gènes continuent à être exprimés tout au long du développement cardiaque. A l'âge adulte, Mef2 est exprimé dans tous les tissus.

##### - Structure du gène

Il appartient à la famille des facteurs de transcription MADS. Ces protéines possèdent un domaine MADS et un domaine MEF2 fortement conservés. Ces deux domaines permettent la fixation des facteurs de transcription sur une séquence d'ADN consensus C/TTA(A/T)<sub>4</sub>TAG/A, et assurent la dimérisation de ces facteurs. MEF2 se fixe sur sa séquence cible pour activer directement la machinerie transcriptionnelle via un domaine transactivateur présent dans leur domaine carboxyterminal (figure 20).



**Figure 20 : Représentation schématique des protéines Mef2.** Les 4 protéines de cette famille possèdent des domaines MADS et Mef2 fortement conservés. (Extraît de « heart development », Harvey *et al.*, 1999).

Des sites de fixation pour ce facteur de transcription ont été identifiés dans les promoteurs de la desmine, la chaîne légère de la myosine de type ventriculaire, et la chaîne lourde de la myosine de type  $\alpha$ , la troponine T et I, actine cardiaque et ANF. Les gènes Mef2 sont finement régulés par des modifications posttranscriptionnelles et posttraductionnelles. Des sites de phosphorylation pour la caséine kinase II ont été identifiés dans le domaine MEF et dans le domaine de transactivation. Ces phosphorylations permettent dans un cas de stabiliser le facteur de transcription sur son site de fixation, et dans l'autre d'augmenter le potentiel de transactivation.

Le domaine MADS de Mef2c est nécessaire pour la formation du ventricule droit et du cône de sortie, suggérant un rôle de Mef2c dans le développement du mésoderme antérieur. Un « enhancer » a été identifié au niveau du gène Mef2c et possède deux sites de fixation pour GATA, et ISL1, deux facteurs de transcription présents dans le mésoderme antérieur. Ces données suggèrent que Mef2c pourrait être la première cible directe de ISL1 dans le mésoderme antérieur et supporterait le modèle dans lequel GATA et ISL1 sont des régulateurs transcriptionnels précoces du cône de sortie et du ventricule droit (Dodou *et al.*, 2004).

- Rôle :

Parmi les gènes Mef2, Mef2c intervient plus particulièrement dans la spécification ventriculaire droite. Des embryons déficients pour Mef2c sont dépourvus au niveau du tube cardiaque de la région destinée à devenir le ventricule droit. Ceci suggère un rôle de Mef2c dans la régulation de cette région cardiaque. Le cofacteur possible intervenant dans cette régulation est le facteur de transcription dHand. En effet, les embryons déficients pour ce gène présentent les mêmes anomalies que les mutants Mef2c. Par ailleurs, Mef2c pourrait agir avec dHand pour donner la spécificité ventriculaire droite soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de GATA 4 (Fadden *et al.*, 2000). Par ailleurs, Il existe une compensation entre les différents membres de la famille Mef2. Dans les embryons déficients pour Mef2c, l'expression des gènes codant pour le facteur natriurétique (ANF),  $\alpha$  actine cardiaque, et chaîne lourde de la myosine de type  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC) est diminuée ; à l'inverse, les chaînes légères de la myosine de type atrial (MLC-2a) et ventriculaire (MLC-2v) ne sont pas modifiées. Or, le gène codant pour MLC-2v possède dans son promoteur un domaine

de fixation pour Mef2, ce qui suggère que d'autres membres de la famille de Mef2 peuvent assurer cette fonction.

#### **II.2.3.5.2 dhand et ehand**

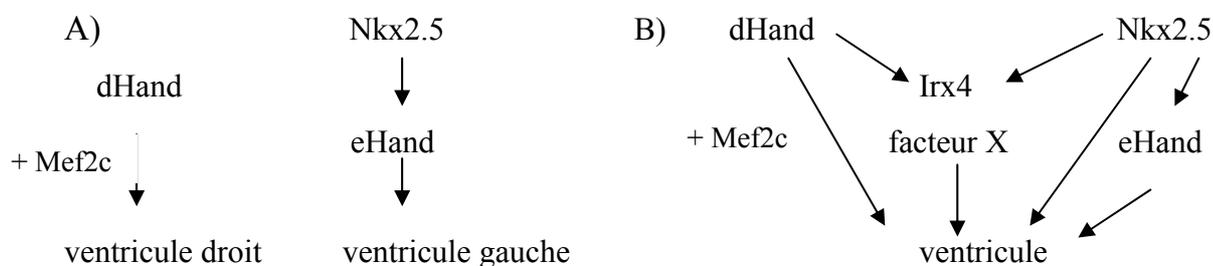
Ils appartiennent à la famille des facteurs de transcription à « hélice-boucle-hélice ». Ces deux gènes sont aussi appelés Thing-2/Hed pour dHAND et Thing-1/Hxt pour eHAND. Ces deux gènes sont exprimés dans le mésoderme précardiaque. Le facteur de transcription dHand est détecté au niveau du tube cardiaque primitif, puis devient restreint au futur compartiment ventriculaire droit, lors de la formation de la boucle. A l'inverse, eHand est présent dans les parties antérieures et postérieures du tube cardiaque linéaire qui donneront le ventricule gauche et le conotruncus (futures artères) (Thomas *et al.*, 1998 ; Riley *et al.*, 2000). Ces deux facteurs interviennent à plusieurs niveaux (1) Ce sont des candidats potentiels pour contrôler le développement du tube cardiaque en segment spécifique ventriculaire ou atrial, (2) Ils interviendraient dans la survie et la prolifération des cellules ventriculaires. En effet, la génération de souris Nkx2.5<sup>-/-</sup> ou dHand<sup>-/-</sup> a produit des embryons avec une chambre atriale et une chambre ventriculaire ; à l'inverse, la génération des doubles mutants a conduit à la formation d'une seule chambre atriale, confirmant le rôle de ces gènes dans la spécification des chambres ventriculaires (Yamagishi *et al.*, 2001). Nkx2.5 peut agir directement sur eHand permettant la formation d'une chambre ventriculaire. Dans les embryons déficients pour Nkx2.5, ce dernier ne peut activer eHand qui aurait pu permettre la formation d'une chambre ventriculaire gauche (Yamagishi *et al.*, 2001).

#### **II.2.3.5.3 Irx4**

Le gène iroquois 4 (Irx4) appartient à une famille de facteurs de transcription à homéodomaine. Son expression est restreinte aux ventricules. Ce gène participe à la spécification des chambres ventriculaires (Bao *et al.*, 1999). Dans les souris déficientes pour Nkx2.5 ou dHand, l'expression de Irx4 est diminuée et la différenciation ventriculaire est compromise (Bruneau *et al.*, 2000). A l'inverse son expression est inchangée dans les souris déficientes pour Mef2c. Ces données suggèrent que l'expression de Irx4 est régulée par les facteurs de transcription Nkx2.5 et dHand. Par ailleurs, Irx4 inhibe l'expression de la chaîne lourde de la myosine lente dans les cellules ventriculaires. En effet, les souris déficientes pour Irx4 présentent une

dérépression de la chaîne lourde de la myosine lente spécifique des cellules atriales, et une diminution de la fonction cardiaque (Bruneau *et al.*, 2001).

Ces données conduisent à l'élaboration de deux modèles possibles pour la formation de la chambre ventriculaire (figure 21).



**Figure 21 : Deux modèles de formation des chambres.** A) dhand via Mef2c permet le développement du ventricule droit. A l'inverse Nkx2.5 dirige celle du ventricule gauche via eHand. B) dHand et Nkx2.5 agissent comme dans le modèle A) et/ou activant Irx4 et un facteur X non encore identifié pour aboutir à la formation de la chambre ventriculaire (d'après Yamagishi *et al.*, 2001).

#### II.2.3.5.4 Tbx5

##### -Localisation

Tbx5 est exprimé initialement dans le mésoderme cardiaque, il va suivre un gradient antéro-postérieur au niveau du tube cardiaque linéaire, puis se restreindre à l'atrium et au ventricule gauche. Son niveau d'expression va ensuite diminuer pour être identique dans les deux ventricules à l'âge adulte (Bruneau *et al.*, 1999 ; Hatcher *et al.*, 2000).

##### -Rôle

Ce facteur de transcription intervient dans la spécification ventriculaire, et dans la régulation de Nkx2.5. Dans les embryons de souris déficients pour Tbx5, la différenciation ventriculaire est diminuée, associée à une diminution de l'expression des principaux gènes spécifiques du ventricule : MLC-2v, Irx4, ainsi que GATA 4 et Nkx2.5 (Bruneau *et al.*, 2001). Par ailleurs, Tbx5 a été montré pour augmenter la différenciation cardiaque dans les cellules P19CL6 associée à l'accroissement de l'expression de Nkx2.5 (Hiroi *et al.*, 2001). A l'inverse, une inhibition de Tbx5 dans l'embryon de xénope conduit à une hypoplasie et une diminution de Nkx2.5 (Horb *et al.*, 1999).

La spécification ventriculaire s'accompagne de l'expression et de la répression d'un certain nombre de gènes dont les chaînes lourdes et légères des myosines, et des facteurs spécifiques de chaque chambre.

#### **II.2.3.5.5 Les chaînes lourdes des myosines**

Il existe dans le cœur trois types de chaînes lourdes de la myosine : le type  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC) codé par le gène *Myh6*, le type  $\beta$  ( $\beta$ -MHC) codé par le gène *Myh7* et la chaîne lourde de la myosine lente (*SMyHC3*). Les transcrits de ces différentes formes sont exprimés différemment au cours du développement.

L'expression de  $\alpha$ -MHC et de  $\beta$ -MHC est détectée à 8,5 jours dans tout le tube cardiaque. Leur taux d'expression reste plus fort dans l'atrium pendant le développement et jusqu'au stade adulte. A 9,5 jours,  $\beta$ -MHC est exprimé dans le segment ventriculaire tandis que  $\alpha$ -MHC est diminué dans cette portion et est restreint au segment atrial (Rindt *et al.*, 1993). Enfin, l'expression de  $\alpha$ -MHC augmente dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux et remplace la  $\beta$ -MHC. A 10,5 jours, la région sino-atriale des embryons de souris exprime l'isoforme  $\alpha$ -MHC (Layton *et al.*, 1990). Par ailleurs, la chaîne lourde de la myosine lente (*SMyHC3*) est exprimée dans tout le tube cardiaque à 8 jours, puis est restreint à l'atrium (Wang *et al.*, 1996).

#### **II.2.3.5.6 Les chaînes légères des myosines**

Au cours de la spécification ventriculaire, les chaînes légères de la myosine de type atrial (MLC-2a) codée par *Myl7*, et ventriculaire MLC-2v codée par *Myl4* sont régulées différemment. MLC-2v est détectée à 8 jours dans la portion du tube cardiaque qui deviendra le ventricule, et est complètement absente dans celle qui donnera l'atrium (O'Brien *et al.*, 1993). A l'inverse, MLC-2a est exprimée dans les deux segments atriaux et ventriculaires, et diminuée au niveau ventriculaire entre 9,5 et 14 jours (Kubalak *et al.*, 1994). Dans les cellules ES, l'expression de MLC-2v est indépendante de la formation du tube cardiaque, suggérant que la spécificité ventriculaire a lieu précocement au cours de la cardiogénèse. Dans les EBs dérivés des cellules ES, MLC-2a est détectée à partir de 6 jours contre 9 jours pour MLC-2v (Miller-hance *et al.*, 1993).

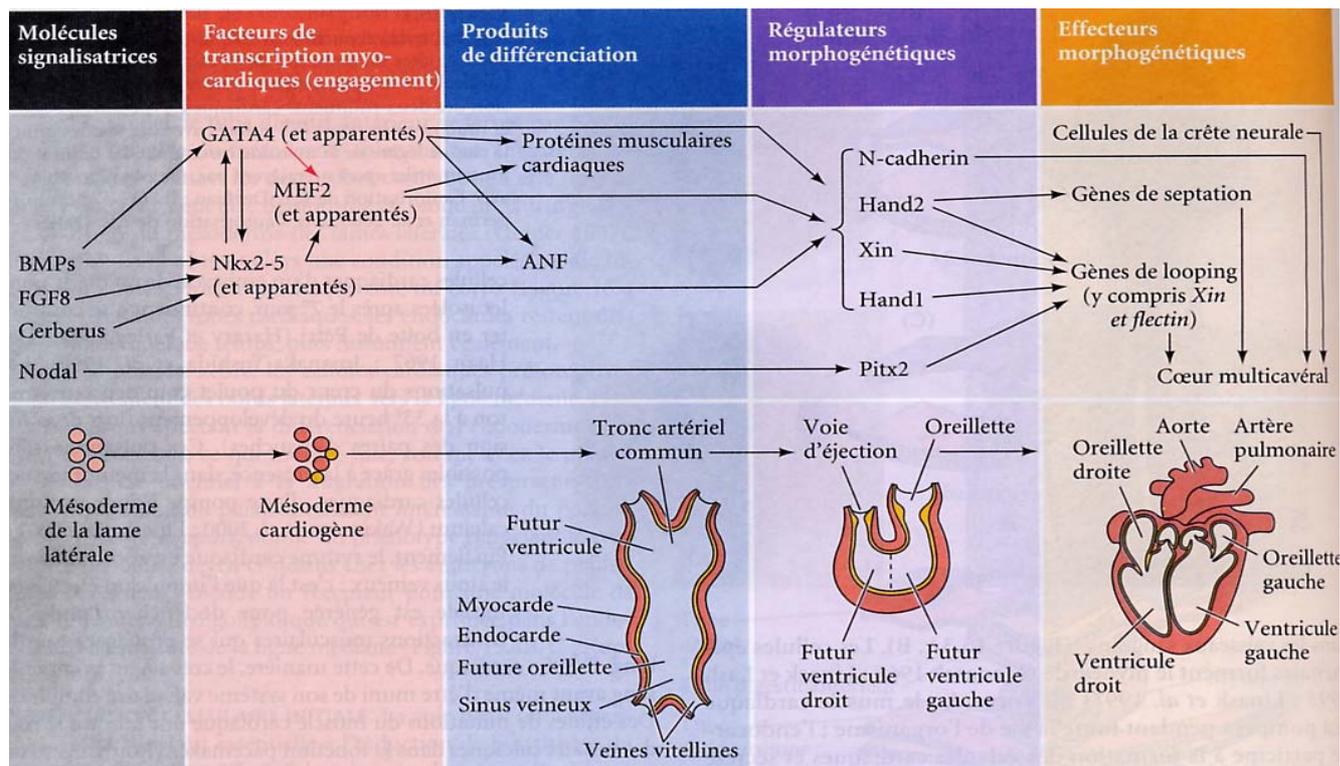
#### **II.2.3.5.7 Les facteurs natriurétiques atriaux et ventriculaires (ANF et BNP)**

L'ARNm de ANF est détecté dans une sous-population de cellules cardiaques à 8 jours dans les embryons de souris. Au cours du développement embryonnaire et foetal, ANF et BNP sont exprimés à la fois dans les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires. L'expression de ANF diminue à la naissance dans les cellules ventriculaires (Argentin *et al.*, 1994).

#### **II.2.3.6 Maturation des chambres et septation**

La séparation entre oreillettes et ventricules requiert l'intervention de nombreux facteurs. Nkx2.5 et Tbx5 sont les facteurs les plus importants intervenant dans la formation du septum. En effet, des mutations au niveau de Nkx2.5 conduisent à une anomalie du septum atrial et ventriculaire. De plus, la position de la chambre atriale est très importante pour l'alignement correct du septum, des valves et la connexion avec les veines cave et pulmonaire. Le facteur de transcription Pitx2 est un des facteurs intervenant à ce stade. Ainsi, l'absence de ce facteur conduit à une chambre atriale à morphologie droite avec des anomalies de connexion des vaisseaux. Les récepteurs à l'acide rétinoïque interviennent dans la maturation et la septation ventriculaire (Kastner *et al.*, 1994), (figure 22).

- Bilan des facteurs de transcription intervenant dans la morphologie cardiaque :



### Figure 22: Intervention des facteurs de transcription au cours du développement cardiaque.

Une corrélation peut être établie entre les stades morphologiques et les facteurs de transcription présents dans le noyau précardiaque. Après induction par l'endoderme, les cellules précardiaques expriment les facteurs de transcription spécifiques du muscle cardiaque. Les cardiomyocytes se rejoignent pour former le tube cardiaque. Sous l'influence des protéines Hand 1 (eHand) et 2 (dHand), Xin et Pitx2, le cœur effectue une boucle et débute son cloisonnement (d'après *Biologie du développement*, Gilbert, 2004).

La fonction cardiaque dépend du couplage excitation/contraction des différentes régions du cœur. L'acquisition de ce couplage nécessite la mise en place d'un tissu assurant la conduction de l'influx nerveux à travers ces différentes régions. Ce tissu conducteur va se mettre en place au cours du développement.

### II.3 Naissance du système de conduction cardiaque

L'origine de ce tissu conducteur a produit une controverse conduisant à la proposition de deux modèles. L'un est basé sur les connaissances acquises chez le poulet et conduirait au recrutement continu de cellules extérieures, l'autre considère que ces cellules proviennent de la différenciation d'un « pool » de cellules progénitrices. L'expression dans les cellules du tissu conducteur de gènes codant pour des protéines normalement associées aux structures neuronales, a suggéré que les cellules de la crête neurale pouvaient se différencier en cellules du tissu conducteur, tendant à renforcer le

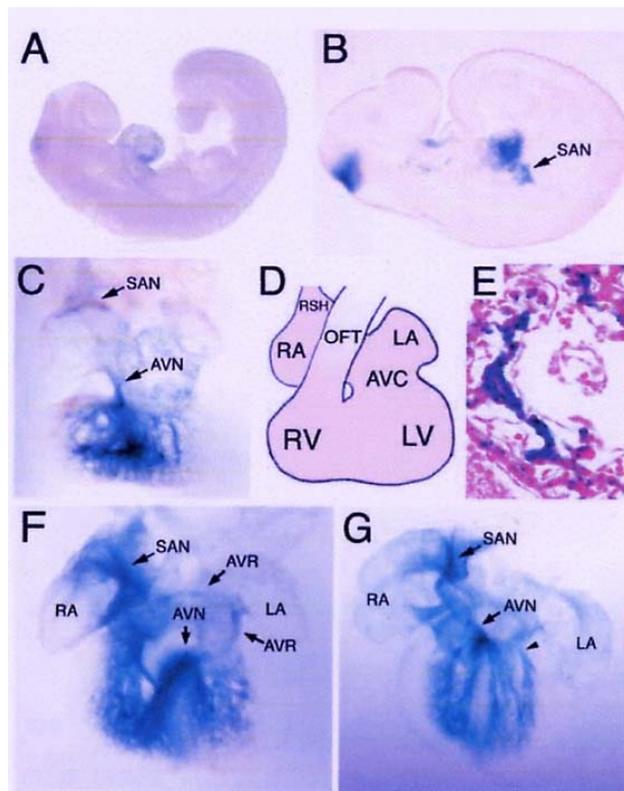
premier modèle (Gorza *et al.*, 1988). Cependant, Il existe peu de marqueurs permettant d'identifier clairement le système de conduction et de départager ainsi ces deux modèles (Moorman *et al.*, 1998). La plupart d'entre eux, sont, soit exprimés dans d'autres régions du cœur, soit se restreignent tardivement au système de conduction au cours du développement. Ceci a notamment été observé pour la connexine 40 (Miquerol *et al.*, 2004).

### **II.3.1 Etudes du développement du système de conduction**

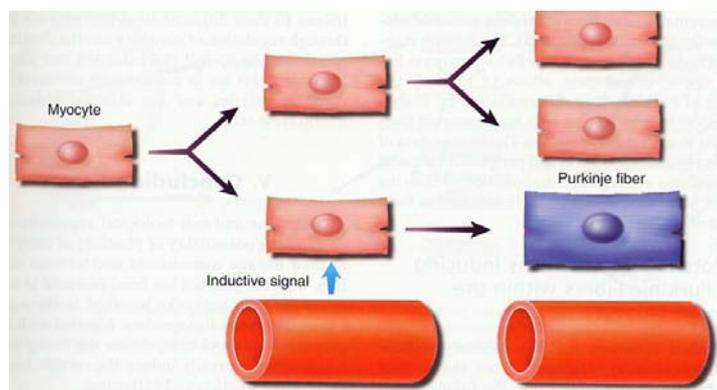
Les travaux de Viragh et Challice de 1977 à 1982 ont permis une première visualisation du développement du système de conduction en utilisant la microscopie électronique et l'acide périodique de schiff. Ainsi, 8 jours après le début du développement embryonnaire chez la souris, les premières contractions lentes péristaltiques apparaissent. Le jour suivant, l'activité électrique devient unidirectionnelle et se propage à partir d'une zone qui deviendra le futur nœud sinusal (NS) pour atteindre le canal atrio-ventriculaire, puis les ventricules. Ce canal joue le même rôle que le nœud atrio-ventriculaire (NAV) chez l'adulte en retardant la propagation de l'influx. A 11 jours, le nœud sinusal (NS) se différencie morphologiquement. Cependant, cette région est fonctionnelle avant que cette différenciation intervienne. A 13,5 jours, tout le système de conduction est identifiable par ces techniques à l'exception des fibres de Purkinjé.

Afin d'étudier plus précisément le développement du système de conduction, des modèles de souris transgéniques dans lesquels l'expression du gène lac Z est dirigée par différents promoteurs ou « enhancers », ont été établis. Deux premières constructions ont permis d'identifier certaines régions de ce système. Ainsi, l'« enhancer » spécifique cardiaque de poulet cGata6 et le promoteur de la troponine I ont permis de localiser la région du canal atrio-ventriculaire au stade embryonnaire, et celle du NAV et des faisceaux de His à des stades plus tardifs (Davis *et al.*, 2001 ; Di Lisi *et al.*, 2000). Dans la lignée mink-lacZ, l'activité  $\beta$  galactosidase a été observée à partir de 8,25 jours et jusqu'à 13,5 jours. A 10,5 jours, l'expression de mink-lacZ est retrouvée dans le nœud sinusal, une portion du canal atrio-ventriculaire, le septum interventriculaire et le cône de sortie (Kupersmidt *et al.*, 1999). Ces différentes

constructions n'ont pas permis de visualiser l'ensemble du système de conduction. Ainsi, l'équipe de Fishmann en 2001 a décrit une lignée abritant une insertion au



**Figure 23: L'expression du transgène engrailed2-lacZ délimite la maturation progressive du système conducteur dans les cœurs embryonnaires à différents stades.** A) L'initiation de l'expression se passe à 8,5 jours dans les précurseurs du système de conduction le long du mur dorsal du canal atrio-ventriculaire (AVC) B) A 9,5 jours, l'expression est observée dans les précurseurs du nœud sinusal (SAN), et dans ceux de la chambre ventriculaire. Dans les stades plus tardifs, les cœurs sont disséqués pour suivre la mise en place du système de conduction. C) A 10,5 jours, la situation est similaire à 9,5 jours, avec apparition de fibres dans la future chambre ventriculaire, et visualisation des cellules le long du canal atrio-ventriculaire ou le nœud atrio-ventriculaire (AVN) va se constituer E) Section colorée par l'éosine qui permet de révéler la localisation des trabécules à 10,5 jours F) A 12,5 jours, Le SAN, et AVN, le faisceau de His sont détectés et sont en continu G) A 13,5 jours, le système de conduction est complet avec les fibres de Purkinjé (LA oreillette gauche, RA oreillette droite d'après Rentschler *et al.*, 2001).



**Figure 24: Modèle proposé pour la différenciation des fibres de Purkinjé à partir des myocytes chez le poulet.** L'endothéline libérée par les vaisseaux induit la différenciation des myocytes adjacents en cellules du tissu conducteur (fibres de Purkinjé) (d'après Gourdie *et al.*, 1998).

hasard du transgène (« enhancer » engrailed2-lacZ), dans laquelle l'expression de la  $\beta$  galactosidase était observée uniquement dans le cœur et plus précisément dans le système de conduction (Rentschler *et al.*, 2001). Ce transgène est observé à 8,25 jours dans le tube cardiaque. Le jour suivant, il est détecté dans l'oreillette droite, dans la zone qui donnera le NS. A 9,5 jours, la région interventriculaire s'allume où se forme le faisceau de His. A 12,5 jours, tout le système de conduction est observable, y compris les fibres de Purkinjé (figure 23).

Cette lignée présente aussi l'avantage de constituer un bon modèle pour étudier les facteurs intervenant dans le développement de ce système de conduction. Des études chez le poulet ont montré que l'endothéline, sécrétée par les vaisseaux artériels est suffisante pour induire la différenciation des cardiomyocytes adjacents en cellules de Purkinjé (Gourdie *et al.*, 1998) (figure 24).

Néanmoins, peu d'informations semblent aller dans ce sens chez la souris. Les études se sont dirigées vers un autre candidat : la neuréguline 1. Cette protéine est exprimée à 8,5 jours dans l'endocardium ventriculaire et ses récepteurs ERB2 et 4 sont présents dans le myocarde. Cette localisation fait d'elle un excellent candidat pour la régulation de l'induction du système de conduction. En effet, les cœurs embryonnaires issus de souris de la lignée engrailed2-lacZ sont exposés à différents facteurs tels que la neuréguline, l'endothéline et l'angiotensine II. Cette étude a montré que seule la neuréguline entraîne une augmentation du marquage X-gal dans le cœur, suggérant une conversion des myocytes. De plus, cet effet est constaté dans une fenêtre de temps courte entre 8,25 et 10,5 jours et est dose dépendante (Rentschler *et al.*, 2002). Néanmoins, les souris neuréguline -/- ne présentent pas de trouble de conduction, mais un défaut de mise en place des trabéculations. Tous ces modèles vont dans le sens de la présence d'un « pool » de cellules cardiaques qui se différencie progressivement dans les différents types cellulaires, constituant le système de conduction.

Par ailleurs, les cellules de la crête neurale pourraient jouer un rôle dans l'induction de la différenciation finale de ces cellules. Ainsi, dans la lignée Wnt1cré x Rosa 26, deux

populations de cellules de la crête neurale ont été identifiées et sont localisées au niveau du NS et NAV aussi bien que dans les branches du faisceau de His (Poelmann *et al.*, 2004). Cette colocalisation entre le marqueur des cellules de la crête neurale (Wnt1) et celui du système de conduction (engrailed2) suggère bien un rôle inductif pour les cellules de la crête neurale.

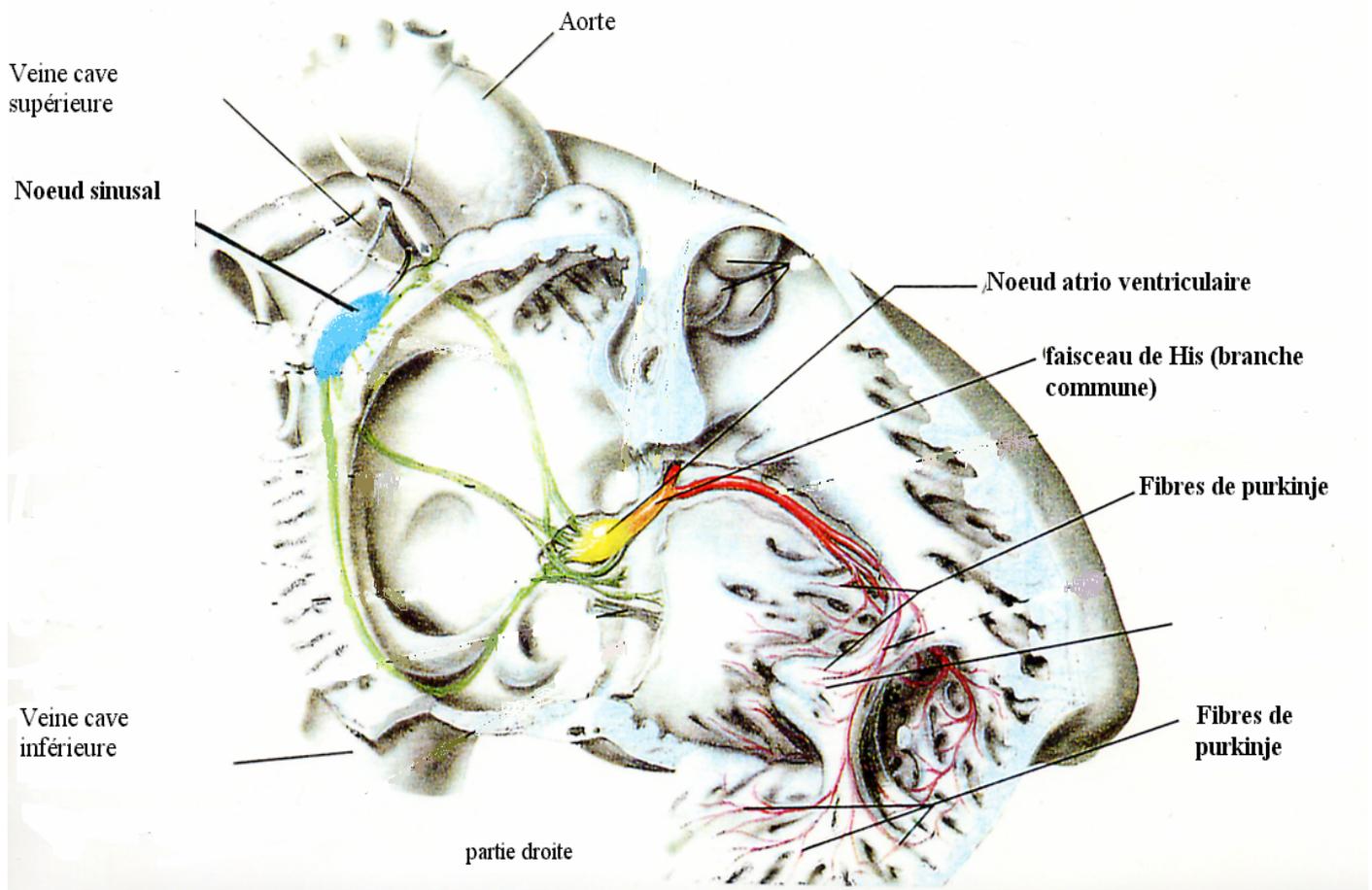
### **II.3.2 Aspect moléculaire de ce développement**

De nombreux déterminants moléculaires intervenant dans la différenciation des cellules du système de conduction ont été identifiés. Parmi eux, les facteurs de transcription Nkx2.5 et Tbx5 jouent un rôle important. Lors d'une mutation de Nkx2.5, des troubles du système de conduction ont été décrits chez la souris (Biben *et al.*, 2000) et chez l'homme (Schott *et al.*, 1998). Nkx2.5 pourrait agir via un autre facteur de transcription, Hop (Ismat *et al.*, 2005). De même, une mutation de Tbx5 entraîne des troubles du système de conduction. Néanmoins, son rôle serait plus central en agissant au niveau du NAV et du faisceau de His (Moskowitz *et al.*, 2004). Les autres membres de la famille Tbx pourraient intervenir dans la différenciation de ces cellules. Ainsi, Tbx 3 et 2 inhiberaient l'expression des gènes spécifiques des chambres atriales et ventriculaires (Hoogars *et al.*, 2004). Tbx3 est retrouvé du NS au faisceau de His, et est détecté à partir de 8,5 jours au niveau du tube cardiaque. Cette action serait plus ciblée pour Tbx2 et ne concernerait que le NAV.

- **Conduction de l'influx nerveux dans le cœur adulte**

L'influx électrique naît dans le nœud sino-auriculaire (NSA) et se propage par conduction de proche en proche à l'ensemble des oreillettes et au nœud atrio-ventriculaire (NAV) ou nœud d'Aschoff-Tawara. A ce niveau, la contraction se ralentit, permettant ainsi de synchroniser les contractions des oreillettes et des ventricules. Ainsi, le ralentissement de la conduction dans le NAV permet à la systole auriculaire de s'achever et de remplir les cavités ventriculaires, avant la transmission de la conduction aux ventricules. L'influx électrique se propage au travers du faisceau de His et de ses branches et atteint l'apex des ventricules qui se contracte. L'activité électrique remonte ensuite vers la base des ventricules et se transmet à l'ensemble des parois ventriculaires de l'endocarde vers l'épicarde, par le biais du réseau de Purkinje.

La systole ventriculaire se produit alors et permet de chasser le sang des ventricules vers l'artère pulmonaire et l'aorte (figure 25).



**Figure 25: Anatomie du système de conduction**

Les cardiomyocytes dérivés des cellules ES terminalement différenciés présentent les caractéristiques génomiques et fonctionnelles des cellules de type pacemaker, atrial et ventriculaire (Boheler *et al.*, 2002). Au cours de cette différenciation, les protéines spécifiques du cœur, les récepteurs et les canaux ioniques sont exprimés de la même façon que lors de la cardiogénèse (Boheler *et al.*, 2002). Les aspects fonctionnels et génomiques seront abordés dans le paragraphe suivant.

### **III. Le couplage excitation/contraction**

#### **III.1 Activité électrique des différentes régions du cœur**

Seules les régions sinusales, auriculaires et ventriculaires seront abordées dans le paragraphe suivant.

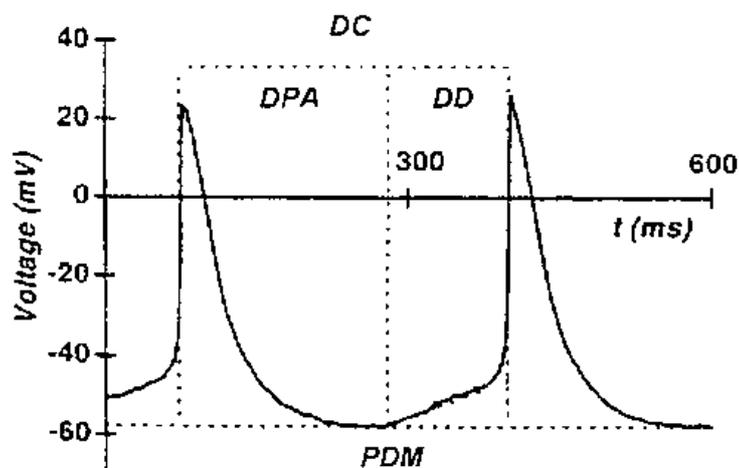
### III.1.1 Le nœud sinusal

Le nœud sinusal est localisé dans l'oreillette droite à la jonction du crista terminalis et du tissu veineux constitué des veines caves supérieure et inférieure et du septum interatrial (Boyett *et al.*, 2000). Il possède une fréquence d'excitation élevée et l'impose à l'ensemble du myocarde. En cas de défaillance du nœud sinusal, les cellules du NAV ou du système His-Purkinje peuvent imposer leur fréquence.

Le nœud sinusal est constitué d'une population hétérogène de cellules du centre vers la périphérie. Les cellules situées au centre du nœud contiennent peu de myofilaments, ne s'organisant pas en myofibrilles. Vers la périphérie, la structure cellulaire devient progressivement plus régulière, avec des myofilaments plus nombreux et de mieux en mieux organisés (Boyett *et al.*, 2000). Plusieurs types de cellules sinusales capables de battre spontanément ont été isolées: en fuseau (« spindle cell ») et en araignée (« spider cell »). Un troisième type a été décrit chez le lapin : les « elongated spindle cells ». Ces trois types de cellules sont faiblement striés, distribués aléatoirement du centre vers la périphérie du sinus et présentent une activité électrique spontanée aux propriétés indistinctes (Verheijck *et al.*, 2001).

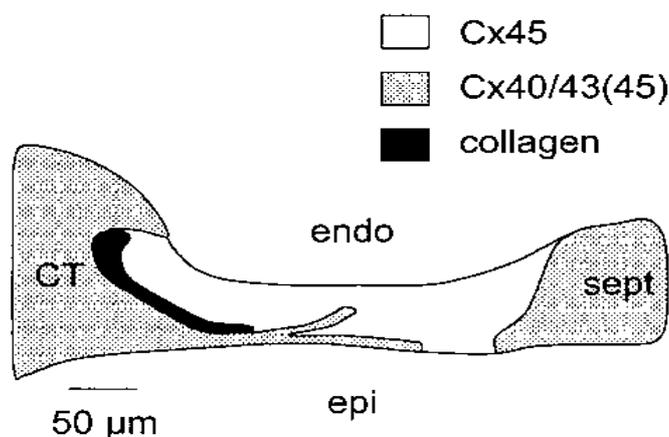
Les cellules sinusales ne présentent pas de potentiel de repos. A partir de la valeur la plus négative du potentiel membranaire appelé potentiel diastolique maximal (PDM), la membrane cellulaire se dépolarise lentement jusqu'au seuil de déclenchement du potentiel d'action (PA). Cette phase nommée dépolarisation diastolique lente ou phase 4 est à la base de l'automatisme de l'activité électrique du tissu nodal. Cette activité spontanée varie du centre vers la périphérie, ce qui est probablement due à l'hétérogénéité cellulaire. Au centre où la densité des cellules de type araignée serait la plus forte, l'amplitude du potentiel d'action est plus faible, le PDM a une valeur moins négative et la pente de dépolarisation diastolique est plus prononcée qu'à la périphérie. Le PA est spontanément généré dans le centre du NSA au niveau du foyer pacemaker principal composé de cellules dites pacemakers primaires. A partir de ce foyer, le PA se propage dans les cellules transitoires, puis dans les cellules périphériques sinusales pour atteindre la crista terminalis et le tissu auriculaire. Le potentiel d'action (PA) des cellules sinusales est donc caractérisé par trois propriétés principales (Cho *et al.*, 2003) : (1) un potentiel diastolique maximal faible (PDM = -50 à -60 mV), (2) une dépolarisation diastolique lente et spontanée en

phase 4 et (3) un PA dont la phase de dépolarisation (phase 0) est lente, l'amplitude est faible et la durée est longue (figure 26).



**Figure 26: Potentiel d'action enregistré dans les cellules du nœud sinusal chez la souris adulte (d'après Mangoni *et al.*, 2001).** (PDM potentiel diastolique maximal, DC durée du cycle, DPA durée du potentiel d'action, DD dépolarisation diastolique)

La distribution des connexines assurant la propagation de l'influx entre les différents types cellulaires a été étudiée dans le NS. La Connexine 45 est localisée au centre du NS des souris adultes ; à l'inverse, les connexines 43 et 40 sont retrouvées à la périphérie et dans les cellules de type atrial. Il ne semble pas exister de gradient d'expression pour la Connexine 45 à travers le NS. De plus, la zone pacemaker primaire est séparée de l'atrium par une bande de tissu conjonctif composée de collagène qui protège le NS d'une influence hyperpolarisante de l'atrium (Verheijck *et al.*, 2001) (Figure 27)



**Figure 27: Diagramme de distribution des Cx 40, 43 et 45 dans la zone pacemaker primaire du NS.** Cette distribution a été déterminée par électrophysiologie. (CT crista terminalis) (d'après Verheijck *et al.*, 2001).

### III.1.1.1 Les courants dépolarisants

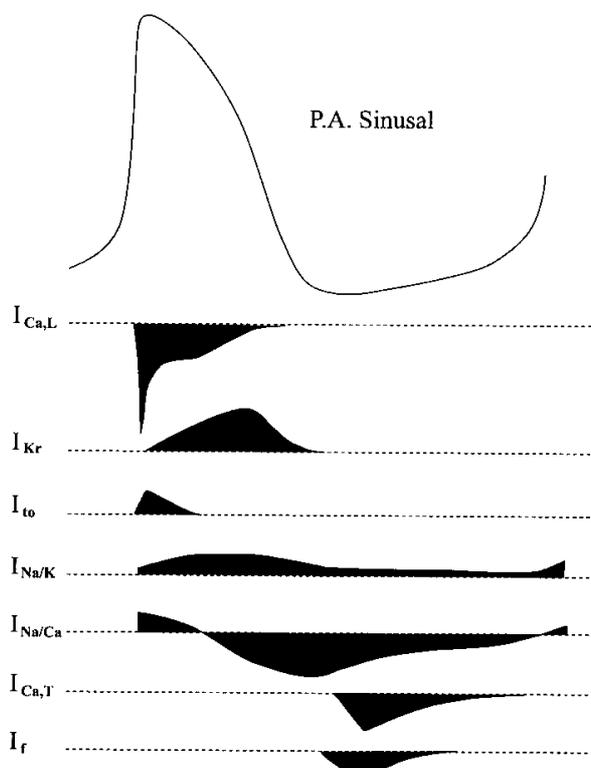
Cinq courants dépolarisants ont été détectés chez la souris adulte: le courant de pacemaker  $I_f$ , les courants calciques  $I_{Ca,T}$  et  $I_{Ca,L}$  et les courants sodiques  $I_{Na}$  et  $I_{st}$  (st, sustained). A la fin de la phase de repolarisation d'un PA induite par le courant  $I_{Kr}$ , ce courant se désactive en démasquant progressivement un courant de fond entrant qui est la résultante d'un flux entrant  $I_{Na/Ca}$  et d'un flux sortant  $I_{Na/K}$ ; parallèlement les canaux HCN responsables du courant  $I_f$  sont activés (à partir de  $-50$  mV; Mangoni *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2003). Ces deux mécanismes sont à l'origine du déclenchement de la phase de dépolarisation diastolique. A mesure que cette phase évolue, les canaux calciques de type T, activés à partir de  $-50$  mv, maintiennent la dépolarisation jusqu'à une valeur seuil de  $-30$  mv qui est le seuil d'activation du courant calcique de type L,  $I_{Ca,L}$  (Mangoni *et al.*, 2003). Ce dernier sera responsable de la phase ascendante du PA.

Deux courants sodiques  $I_{Na}$  transitoires distincts, TTX-sensible et TTX-résistant, ont récemment été décrits dans les cellules sinusales murines adultes (Lei *et al.*, 2004). Ces courants s'activent à  $-70$  mv et atteignent leur pic pendant la phase de dépolarisation du PA à  $-10$  mv. Le courant TTX-sensible a été mesuré dans les cellules de petite taille (supposées centrales) et dans les cellules de grande taille (supposées périphériques). A l'inverse la densité du courant TTX-résistant décline de la périphérie au centre du noeud. De faibles concentrations de TTX de 10 ou 100 nM bloquent le courant TTX-sensible, conduisant à une diminution de la pente de la dépolarisation diastolique (Maier *et al.*, 2002). Aucun effet n'a été observé sur la conduction du noeud sinusal. A l'inverse, des concentrations fortes de TTX (1-30  $\mu$ M) inhibant ces deux types de courant aboutissent à un ralentissement de la vitesse de conduction et à une diminution de la pente diastolique dans les cellules nodales isolées et dans le NS intact. Ainsi, il semble que le courant TTX-sensible puisse être impliqué dans la phase 4 du PA et le courant TTX-résistant dans la propagation du PA du NS vers le tissu atrial (Lei *et al.*, 2004). Le courant sodique entrant  $I_{st}$  a été observé uniquement dans les cellules sinusales isolées qui battent spontanément.

### III.1.1.2 Les courants repolarisants

Parmi les courants enregistrés chez la souris adulte, les courants  $I_{K,slow}$ ,  $I_{ss}$  (ss, steady-state)  $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{K,Ach}$  et  $I_{KATP}$  ont été détectés. Le courant  $I_{K,slow}$  semble être le courant

majoritaire (Cho *et al.*, 2003). Néanmoins, le courant  $I_{Kr}$  malgré sa densité plus faible joue un rôle important dans la repolarisation du PA, mais aussi dans la phase de dépolarisation diastolique. Un blocage même partiel du courant  $I_{Kr}$  par E-4031 dans les cellules sinusales isolées et le NS intact, conduit à un allongement de la phase de repolarisation, une diminution de la phase 4 du NS, et dans certaines cellules isolées à un arrêt de l'activité contractile (Clark *et al.*, 2004). Cette différence d'effet sur les cellules du NS pourrait résulter d'une hétérogénéité d'expression de  $I_{Kr}$  à travers le NS du centre vers la périphérie. L'E-4031 en bloquant le courant  $I_{Kr}$  pourrait modifier le recrutement des courants ioniques impliqués dans la phase 4 du PA dans ces cellules. Après la phase ascendante, les canaux potassiques sont activés et le courant  $I_{Kr}$  provoque la repolarisation du potentiel d'action en liaison avec un courant de fond sortant, constitué principalement de  $I_{Na/Ca}$  et de  $I_{Na/K}$ . Le processus d'automatisme est déclenché à nouveau par l'activation du courant  $I_f$  et l'inactivation du courant  $I_{Kr}$ . Le courant  $I_{K1}$  enregistré dans les cellules sinusales murines est présent avec une densité faible, concordant avec le faible potentiel de membrane de ces cellules. De plus,  $I_{K,Ach}$  contribuerait à l'effet chronotrope négatif de l'acétylcholine (Lomax *et al.*, 2003) (figure 28).



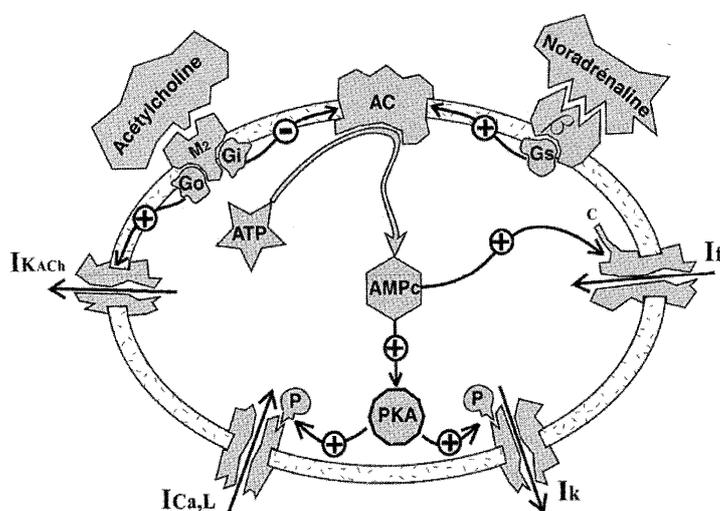
**Figure 28:** Schéma illustrant l'évolution en fonction du temps des principaux courants ioniques impliqués dans l'activité spontanée sinusale. Les flux ioniques entrants

dépolarisants et sortants repolarisants sont respectivement en dessous et au-dessus des lignes en pointillé.

### III.1.1.3 Contrôle de l'automatisme cardiaque par les neurotransmetteurs

La modulation du rythme cardiaque est assurée par le système nerveux autonome via les récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-adrénergiques et muscariniques M2 (Hardouin *et al.*, 1998). Ces mêmes récepteurs sont détectés dans les cardiomyocytes dérivés des cellules ES murines et humaines (Maltsev *et al.*, 1994 ; Kehat *et al.*, 2004).

Une faible stimulation des récepteurs  $\beta$  entraîne une accélération de la phase de dépolarisation diastolique et un raccourcissement de la période diastolique. Les courants  $I_f$ ,  $I_{Ca,L}$  et  $I_{K_r}$  sont accrus. Cette augmentation passe par la voie de l'AMPC. A l'inverse, la stimulation muscarinique conduit à une diminution de la voie de l'AMPC, une réduction des courants cités plus haut et une activation du courant  $I_{K_{ACh}}$ . La conséquence est une hyperpolarisation des cellules nodales, ralentissant fortement et parfois même bloquant leur activité rythmique (Difrancesco *et al.*, 1991) (figure 29).



**Figure 29: Illustration schématique du mode d'action des neurotransmetteurs sur les principaux canaux ioniques d'une cellule sinusale**

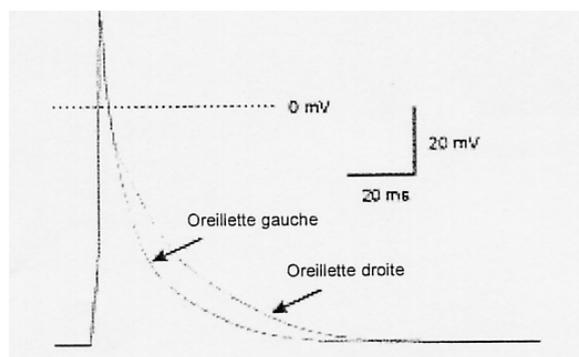
L'étude de la régulation muscarinique du courant  $I_{Ca,L}$  a été étudiée dans des cellules cardiaques issues d'embryons de souris à différents stades du développement. Dans les stades les plus précoces (de 9,5 à 12,5 jours), l'action inhibitrice des récepteurs muscariniques passe par une stimulation des phosphodiesterases (PDE) ; à l'inverse, pour les stades plus tardifs (de 16,5 à 18,5 jours) cette régulation dépend de

l'inactivation de l'adénylate cyclase (AC) par la protéine Gi (Liang *et al.*, 2004). De plus, la régulation  $\beta$ -adrénergique de ce courant dans les cellules cardiaques dérivées des cellules ES à différents stades du développement, a été étudiée. Ainsi, dans les stades précoces (de 8 à 10 jours), les cardiomyocytes sont insensibles à la stimulation  $\beta$ -adrénergique due à une absence de couplage et/ou à une faible expression de la protéine  $G_s$ . A l'inverse, pour les stades suivants (11 à 15 jours), la réponse  $\beta$ -adrénergique est réduite, ce qui est due en partie à l'activité importante des PDE et des phosphatases (Maltsev *et al.*, 1999). La régulation de  $I_{Ca,L}$  est complète dans les stades les plus tardifs (16 à 19 jours).

D'autres facteurs peuvent réguler le rythme cardiaque (hormones, neuropeptides...). Ces différents agents ne seront pas abordés ici.

### III.1.2 Les oreillettes

Le potentiel de repos des cellules auriculaires est environ 5 à 10 mV moins négatif que celui des cellules ventriculaires (-70 à -80 mV) (Schram, 2002), (figure 30). Leur PA est caractérisé par des phases de dépolarisation et de repolarisation précoce rapide, une phase de repolarisation tardive lente par rapport au ventricule et une phase de dépolarisation diastolique spontanée absente ou faible en fonction des espèces.



**Figure 30: Potentiels d'action enregistrés dans les oreillettes droite et gauche chez la souris adulte (Lomax *et al.*, 2003)**

#### III.1.2.1 Les courants dépolarisants

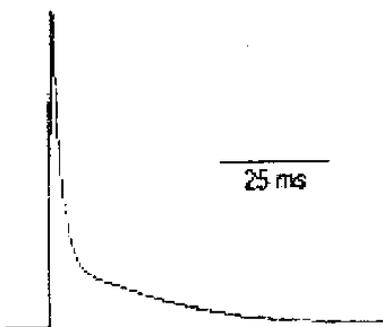
Les courants  $I_f$  et  $I_{Ca,T}$  n'ont pas été détectés. La dépolarisation et la conduction rapide dans les oreillettes impliquent un courant sodique de forte amplitude.

#### III.1.2.2 Les courants repolarisants

Trois courants potassiques distincts, calcium indépendant, et activés par la dépolarisation ont été caractérisés dans les oreillettes chez la souris : (1) un courant transitoire rapide  $I_{to,f}$  de faible amplitude, (2) un courant  $I_{Kslow}$  dont l'activation est rapide et l'inactivation très lente, et (3) un courant  $I_{ss}$  qui s'active lentement et ne s'inactive pas (Bou-Abboud *et al.*, 2000).  $I_{Kslow}$  comporte deux composantes distinctes,  $I_{Kslow1}$  (4-AP sensible) et  $I_{Kslow2}$  (TEA-sensible). Le courant  $I_{Kr}$  est absent dans les cellules atriales murines (Lomax *et al.*, 2003). Le courant  $I_{K1}$  a été détecté dans les oreillettes (Bou-abboud *et al.*, 2000). L'activation parasympathique du courant  $I_{KAch}$  est responsable du raccourcissement du PA et de l'hyperpolarisation du potentiel de membrane dans les oreillettes (Lomax *et al.*, 2003). Une étude a par ailleurs décrit le rôle du courant  $I_{K/Ca}$  dans la repolarisation du PA des oreillettes chez l'homme et la souris (Xu *et al.*, 2003).

### III.1.5 Les ventricules

L'activité électrique du ventricule chez la souris est caractérisée par un potentiel de membrane négatif (-85 mV), une phase de dépolarisation rapide, une phase de repolarisation précoce prononcée, une absence de plateau et une phase de repolarisation tardive rapide. Il n'y a pas de phase de dépolarisation diastolique spontanée (figure 31).



**Figure 31 : Potentiel d'action ventriculaire chez la souris (Nerbonne *et al.*, 2001)**

#### III.1.5.1 Les courants dépolarisants

Le courant  $I_{Na}$  rapide est présent. Le courant  $I_{Ca,T}$  est faible ou absent dans les ventricules à l'âge adulte (Niwa *et al.*, 2004). Quelques travaux ont révélé leur réapparition dans les processus pathologiques associés à l'hypertrophie ventriculaire (Nuss *et al.*, 1993) et au post-infarctus du myocarde (Huang *et al.*, 2001).

### III.1.5.2 Les courants repolarisants

L'ensemble des courants repolarisants ventriculaires détermine l'amplitude et la durée de son PA. Quatre courants  $K^+$  distincts, calcium indépendant, activés par la dépolarisation ont été caractérisés dans le ventricule de souris : (1) un courant transitoire rapide  $I_{tof}$  dont l'activation et l'inactivation sont rapides, (2) un courant transitoire lent  $I_{to,s}$  dont l'activation est rapide et l'inactivation lente, (3) un courant  $I_{Kslow}$  dont l'activation est rapide, l'inactivation très lente, et bloqué par une faible concentration de 4-AP (4) un courant  $I_{ss}$  qui s'active lentement, ne s'inactive pas, et bloqué par TEA (Xu *et al.*, 1999). Comme dans l'oreillette,  $I_{Kslow}$  possède deux composantes  $I_{K,slow1}$  et  $I_{K,slow2}$ . Le courant  $I_{Kr}$  est détecté et présente une amplitude très faible chez la souris adulte (Lees-Miller *et al.*, 2003). Le courant  $I_{Ks}$  n'est enregistré que dans les cellules ventriculaires fœtales, et il est rarement détecté dans les ventricules adultes (Kupersmidt *et al.*, 1999). Les courants  $I_{KATP}$  et  $I_{K1}$  sont aussi présents.

## III.2 Le répertoire des canaux ioniques

L'activité électrique cardiaque des mammifères est sous la dépendance de plus de 30 courants ioniques différents (Boyett *et al.*, 1996). Ces courants sont générés par des canaux ioniques formés par l'association de sous-unités  $\alpha$  dites sous-unités canaux et de sous-unités auxiliaires qualifiées de régulatrices.

### III.2.1 Les canaux sodiques

Il existe deux grandes familles de canaux sodiques : les canaux dépendant du potentiel et les canaux dits épithéliaux. Ces derniers ne semblent pas être exprimés dans le cœur. Les canaux dépendant du potentiel sont constitués de plusieurs sous-unités. La sous-unité canal dite  $\alpha$  comprend 4 domaines (DI-DIV) constitués chacun de 6 segments transmembranaires (S1-S6), S4 donnant la sensibilité au potentiel. Il comprend aussi une boucle intramembranaire H5 participant à la formation du pore.

Douze gènes codant pour ces sous-unités ont été clonés (SCN1-SCN12A ; S pour sodium, CN pour channel et A pour  $\alpha$ ). Les cellules cardiaques expriment principalement le canal Nav 1.5 codé par le gène SCN5A. A l'âge adulte, ce canal est exclusivement exprimé dans le cœur. Au stade embryonnaire, il est présent dans le muscle squelettique. Des mutations de SCN5A sont responsables de différentes

anomalies du trouble du rythme telles que le syndrome du QT long congénital, le syndrome de Brugada ou le bloc auriculo-ventriculaire. D'autres canaux exprimés dans le cerveau ont été détectés dans le cœur, notamment dans le NS et dans les cellules ventriculaires. Le blocage des canaux Nav 1.1, Nav 1.3 et 1.6 par de faibles concentrations de TTX dans les cellules ventriculaires, réduit la synchronie ventriculaire et l'efficacité du couplage excitation/contraction (Maier *et al.*, 2002). Dans le NS, Nav 1.5 est absent du centre du nœud ; à l'inverse, Nav 1.1 est présent dans tout le NS et dans le muscle atrial environnant. Les rôles de Nav1.1 portant le courant TTX-sensible et Nav 1.5 responsable du courant TTX-résistant, ont été identifiés respectivement dans la phase 4 du PA du NS et dans la propagation de la conduction à travers le NS (Lei *et al.*, 2004). Par ailleurs, le gène SCN4A a été détecté dans le muscle cardiaque murin adulte, sa protéine Nav 1.4 est présente principalement dans le muscle squelettique (Zimmer *et al.*, 2002).

Les sous-unités  $\alpha$  des canaux sodiques sont associées avec une ou deux sous-unités  $\beta$  auxiliaires, nommées  $\beta 1$  à  $\beta 4$ . Ces dernières sont codées par les gènes *Scn1b*, *2b*, *3b* et *4b*. Ces sous-unités modulent les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux, interagissent avec la matrice extracellulaire et fonctionnent comme des molécules d'adhésion et d'adressage du canal à la membrane (Isom *et al.*, 2001). La sous-unité  $\beta 1$  a été décrite dans le NS de souris adultes et dans les cellules ventriculaires de souris adultes (Maier *et al.*, 2003). Néanmoins, aucun lien n'a pu être déterminé entre Nav 1.5 et la sous-unité  $\beta 1$  par immunoprécipitation. Les sous-unités  $\beta 2$  et  $3$  sont faiblement exprimées dans le cœur de souris (Maier *et al.*, 2004). Nav  $\beta 4$  est retrouvé dans de nombreux tissus dont le cœur (Yu *et al.*, 2003).

### **- Au cours du développement**

La sous-unité  $\beta 1$  a été identifiée au cours du développement embryonnaire. Son ARNm et sa protéine ont été détectés à 9, 5 jours du développement embryonnaire. Dans les stades plus tardifs, leurs expressions sont augmentées dans les branches du faisceau de His, les fibres de Purkinjé et dans le ventricule (Dominguez *et al.*, 2005). Après la septation, la sous-unité  $\beta 1$  est fortement détectée dans la périphérie du NS, et colocalise avec Nav 1.5. Son expression est diminuée dans le NAV et le faisceau de His en comparaison avec les fibres de Purkinjé et le ventricule. Cette observation va

dans le même sens que ce qui est décrit pour Nav 1.5 qui est absent du NAV et présent dans les fibres de Purkinjé (Schram *et al.*, 2002). La sous-unité  $\beta 1$  pourrait avoir un rôle dans l'établissement de la maturation du système de conduction ventriculaire durant le développement. Cette sous-unité a été détectée dans le cytoplasme et à la surface des cardiomyocytes naissants au stade embryonnaire, puis dans les tubules T et dans les disques interscalaires dans le cœur embryonnaire à des stades tardifs et dans le cœur néonatal. La colocalisation des canaux sodiques et de cette sous-unité au niveau des tubules T suggère une modulation de la sous-unité  $\beta 1$  dans le couplage excitation/contraction des cellules cardiaques et dans la propagation du PA de cellule à cellule.

### **III.2.2 Les canaux calciques**

Les canaux calciques sont classés en 6 sous-classes en fonction de leur expression tissulaire, de leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques : Les canaux de type L (long-lasting) intervenant dans l'entrée de calcium qui déclenche la contraction, et les canaux de type T (transient) présents au niveau des cellules nodales et du système de conduction et participent à l'automatisme cardiaque, B (brain), N (neuronal), P/Q (Purkinjé cells) et R (toxin resistant) (Lehmann-Horn *et al.*, 1999). Les canaux de type T sont activés pour de faibles dépolarisations membranaires (canaux « bas seuil » ou LVA, low-voltage activated) ; à l'inverse, les autres canaux ont un seuil d'activation plus élevé (canaux « haut seuil » ou HVA, high-voltage activated). Dix gènes codant pour des sous-unités  $\alpha$  des canaux calciques dépendant du potentiel ont été identifiés (CaCN1A-CaCN10A, CA pour calcium, et CN pour channel). L'organisation structurale de ces sous-unités est identique à celle décrite pour les canaux sodiques. Ces canaux sont modulés par des sous-unités régulatrices  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$ , et  $\gamma$ , soit au moins 22 gènes.

#### **III.2.2.1 Les canaux calciques de type L**

Quatre des 10 sous-unités  $\alpha$  sont des canaux de type L et sont sensibles aux dihydropyridines : Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 et Cav1.4. La sous-unité Cav1.1 est présente au niveau cardiaque au stade embryonnaire (Xu *et al.*, 2003). Les sous-unités  $\alpha_{1C}$  ou Cav1.2 et  $\alpha_{1D}$  Cav1.3 sont détectées au niveau cardiaque, au niveau du cerveau

et des cellules neuroendocrines (Catterall, 2000). Cav1.3 est exprimé dans l'atrium, le NS et NAV (Bohn *et al.*, 2000, Marionneau *et al.*, 2005). Ces derniers canaux calciques ont été proposés pour contribuer à la phase de dépolarisation diastolique. Les souris homozygotes dans lesquelles le gène codant pour Cav1.3 a été inactivé, montrent un important dysfonctionnement sinusal : une bradychardie et des arythmies sino-atriales et des défauts de la conduction atrio-ventriculaire. Ces données suggèrent que l'inactivation de ce gène affecte l'activité pacemaker des cellules du NS et la conduction du NAV (Platzer *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002). L'étude pharmacologique des cellules sinusales isolées à partir de ces souris (Cav1.3 -/-), a montré que les altérations de l'activité pacemaker sont liées à l'abolition de la composante du courant  $I_{Ca,L}$  s'activant à des voltages négatifs. Ces derniers correspondent à ceux de la phase 4 du PA. Ces données permettent d'impliquer le canal Cav1.3 dans la génération de l'activité pacemaker en contribuant à la dépolarisation diastolique. De plus, cette étude montre que l'absence de canaux Cav1.3 ne stoppe pas l'activité pacemaker et que cette activité dépend donc de l'intervention d'autres canaux ioniques (Mangoni *et al.*, 2003). Cav1.2 contribuerait à la phase ascendante du PA plutôt qu'à la phase 4 du PA. Les souris Cav1.2-/- meurent avant 14,5 jours en l'absence de canaux Cav1.2 fonctionnels.

### III2.2.2 Les canaux calciques de type T

Trois sous-unités  $\alpha$  sont des canaux calciques de type T : Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3. Parmi elles,  $\alpha_{1G}$  ou Cav3.1 et  $\alpha_{1H}$  ou Cav3.2 sont exprimées dans le cœur. Dans le NS de souris adultes, Cav3.1 est plus exprimée que Cav3.2 (Bohn *et al.*, 2000). La contribution de ces deux isoformes au courant  $I_{Ca,T}$  peut être discriminée sur la base de leurs sensibilités différentielles au nickel. Ainsi, Cav3.2 est plus sensible que Cav3.1, les concentrations pour une inhibition de 50% ( $EC_{50}$ ) étant respectivement de 5 et 150  $\mu$ M pour Cav3.2 et Cav3.1 (Lacinova *et al.*, 2000).

La présence de  $I_{Ca,T}$  et l'identification de l'isoforme responsable de ce courant dans les cellules ventriculaires embryonnaires de souris, ont été sujettes à controverse (Nuss et Marban, 1994 ; Cribbst *et al.*, 2001 ; Niwa *et al.*, 2004). L'équipe de Cribbs a décrit un variant d'épissage de l'isoforme Cav3.1 nommée Cav3.1d présente entre 13,5 et 14,5 jours et démontre que cette isoforme est dominante à ce stade. De plus, seule

Cav3.1 a été détectée à la membrane des cellules ventriculaires de 14 jours par immunomarquage. Pour Niwa *et al.*, Cav3.2 est l'isoforme principale au cours du développement embryonnaire. A l'âge adulte, l'ARNm de Cav3.2 disparaît au profit de l'ARNm de Cav3.1. Ainsi, Cav3.1 devient l'isoforme dominante après la naissance et à l'âge adulte (Niwa *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'isoforme Cav3.1 a été détectée à partir de 11 jours de différenciation, dans les cellules cardiaques dérivées des cellules ES murines R1 transfectées avec un plasmide MLC2v-GFP. A ce stade l'expression de Cav3.1 est faible dans les cardiomyocytes de type ventriculaire, augmente régulièrement au cours de la différenciation pour atteindre un maximum à 23 jours, puis diminue. Ces données suggèrent que cette isoforme est régulée durant le développement embryonnaire (Zhang *et al.*, 2003).

### III.2.2.3 Les sous-unités régulatrices

Quatre gènes (CACNB1-CACNB4) codent pour des sous-unités  $\beta$  intracytoplasmiques : Cav $\beta$ 1 à 4. Ces sous-unités agissent comme des protéines chaperones en facilitant l'accès à la membrane des sous-unités  $\alpha$ , conduisant ainsi à une augmentation du nombre de canaux fonctionnels. Leurs rôles dans la régulation des propriétés électrophysiologiques des courants calciques ont été décrits, telles que leurs cinétiques, leurs propriétés de dépendance au voltage. Dans les cellules cardiaques, les sous-unités Cav $\beta$ 2 et Cav $\beta$ 3 sont présentes avec une prédominance de la sous-unité Cav $\beta$ 2. La sous-unité Cav $\beta$ 1 est majoritairement exprimée dans le cerveau et le muscle squelettique (Freise *et al.*, 1999). Les cellules cardiaques expriment aussi la sous-unité  $\alpha_2\delta_2$  et  $\alpha_2\delta_1$  en particulier ses formes épissées. La coexpression de cette sous-unité avec les sous-unités Cav1.2 et Cav $\beta$ 2 conduit à une augmentation du courant. Cav $\alpha_2\delta_2$  augmente la densité du courant calcique générée par Cav1.2 et Cav3.1 (Gao *et al.*, 2000). Huit autres gènes codant pour les sous-unités  $\gamma$  transmembranaires ont été décrits (Chu *et al.*, 2001) : Cav $\gamma$ 1 à 8. La distribution tissulaire de Cav $\gamma$  4,  $\gamma$ 6 et  $\gamma$ 7 est large. Ces sous-unités sont retrouvées dans le cœur (oreillettes et ventricules), les poumons et le cerveau. Le rôle de ces sous-unités dans le cœur n'est pas clair.

### III.2.3 Les canaux potassiques

De nombreux courants potassiques différenciés selon leurs propriétés fonctionnelles et pharmacologiques ont été enregistrés dans les cellules cardiaques. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories :

- Les courants dépendant du potentiel ( $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ , ...) impliqués dans les différentes phases du PA.
- Les conductances de base (ou courants de fond) qui stabilisent le potentiel de repos et régulent la durée du PA dans les conditions physiologiques ( $I_{K1}$ ,  $I_{K,Ach}$ , ...) ou pathologiques ( $I_{K,ATP}$ ...)

Les canaux potassiques peuvent être divisés en trois classes : La première, la plus grande, comprend des canaux formés de 6 segments transmembranaires et d'un pore (H5), la seconde est formée de sous-unités ne comprenant que deux segments transmembranaires et un pore, la dernière est constituée de protéines comprenant 4 segments transmembranaires et 2 pores.

#### III.2.3.1 Les canaux potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 pore

Les sous-unités  $\alpha$  de cette classe présentent la même structure que celle décrite pour les canaux sodiques. Ces sous-unités s'associent en tétramères (homo ou hétérotétramères) pour former des canaux fonctionnels. Ces derniers ont été d'abord classés en 5 groupes sur la base de leur homologie de séquence avec les canaux potassiques clonés chez la drosophile, à savoir shaker (gènes  $KCNAX$  ou  $Kv1.x$ ), shab ( $KCNBx$  ou  $Kv2.x$ ), shaw ( $KCNCx$  ou  $Kv3.x$ ), shal ( $KCNDx$  ou  $Kv4.x$ ), et eag (ether -à gogo ou  $KCNHx$ ). Tous les canaux de cette classe sont sensibles au potentiel tandis que certains d'entre eux,  $KCNA10$  et les canaux codés par les gènes  $KCNHx$  sont également sensibles aux nucléotides cycliques. Une expression cardiaque a pu être démontrée pour au moins 15 canaux de cette classe. 9 d'entre eux participent à la genèse des courants responsables des phases de repolarisation précoce et finale des PA.

A l'âge adulte, le courant potassique dominant est le courant sortant  $I_{to1}$  qui comprend deux composantes présentes, séparément ou ensemble, selon les types de cellules

myocardiques. La composante rapide  $I_{to,f}$  est dépendante de Kv4.2 codée par le gène KCND2, tandis que  $I_{to,s}$ , la composante lente est générée par Kv1.4 codée par KCNA4. Chez la souris, l'expression de Kv1.4 semble limitée au septum interventriculaire. Le courant sortant retardé, essentiel à la repolarisation chez la souris est  $I_{K,slow}$ . Celui-ci comporte deux composantes : l'une est générée par Kv1.5 (gène KCNA5), et sensible à la 4-aminopyridine. L'autre, dépendante de Kv2.1 (gène KCNB2), est insensible à la 4-aminopyridine. Chez les mammifères, dont la repolarisation est tardive, la durée du PA ventriculaire est plutôt contrôlée par  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ . Ces courants, quelque soit l'espèce, sont transportés par les canaux respectivement constitués du canal erg (mERG pour la souris, codé par le gène KCNH2) associé à la sous-unité régulatrice MiRP1 (Mink-Related Peptide, codé par KCNE2), et du canal KvLQT1 (codé par KCNQ1) associé à minK (minimal K channel ou IsK, codé par le gène KCNE1). Des mutations dans ces 4 gènes sont responsables du QT long. Enfin, une expression cardiaque des gènes KCNA1 (Kv1.1), KCNB2 (Kv2.2) a également été observée. Dans le NS de souris, trois isoformes de mERG ont été identifiées: mERG1a, mERG1a, mERG1b (Clark *et al.*, 2004). L'inactivation sélective de cette dernière isoforme conduit à une diminution du courant  $I_{Kr}$  dans les myocytes foetaux et induit des épisodes de bradycardie sinusale (Lees-Miller *et al.*, 2003). Ces données indiquent une contribution spécifique de cette isoforme dans l'activité pacemaker *in vivo* et dans la formation du courant  $I_{Kr}$  dans le NS de souris.

Les canaux potassiques dépendant du potentiel, peuvent être régulés par trois types de sous-unités auxiliaires :

- Les sous-unités  $\beta$  cytoplasmiques ou  $Kv\beta$  codées par les gènes KCNAB1-4.  $Kv\beta 2$  ne modifie pas les propriétés de Kv1.5, mais peuvent cependant accélérer l'inactivation du courant généré par Kv1.4 et favoriser la présence de Kv1.2 à la membrane.
- Les sous-unités  $\beta$  à 1 domaine transmembranaire minK et autres protéines de la même famille (MiRP1-3) codées par les gènes KCNE1-4. MiRP1 régule l'activité du canal erg, mais peut aussi réguler Kv4.2 (Zhang *et al.*, 2001), HCN1 et HCN2 (Yu *et al.*, 2001). Des mutations dans ce gène sont responsables de formes de QT long acquis.

- Les KChIPs (Kv Channel-Interacting Protein) et KchAPs (Kv Channel-Associated Protein). Trois gènes ont été identifiés chez la souris. KChIP interagit avec Kv4.2 et Kv4.3. Elles modulent la densité des canaux à la membrane plasmique, modifient leur cinétique d'inactivation et facilitent leur retour à l'état activable. Les KchAPs appartiennent à la famille des protéines chaperones. Elles augmentent le nombre de canaux fonctionnels à la membrane. Elles interagissent avec les canaux Kv1.3, Kv2.1 et Kv4.3.

#### **- Au cours du développement**

L'expression des gènes KCNQ1, KCNH2 est détectée à 9,5 jours et ne présente pas de différence d'expression entre les chambres atriale et ventriculaire durant la période embryonnaire et foetale. Néanmoins, le produit de KCNQ1 est augmenté dans le tissu ventriculaire foetal et adulte suggérant un contrôle post-transcriptionnel important. La répartition est différente pour les sous-unités  $\beta$ . Ainsi, KCNE1 est observé à 9,5 jours dans tout le myocardium, puis son expression se limite au myocardium ventriculaire à 16,5 jours. Le transcrit de KCNE2 est détecté à 9,5 jours, puis se restreint au myocardium atrial. De même, KCNE3 est détecté à 8,5 jours, puis se limite à l'atrium. Ainsi, la répartition hétérogène des canaux potassiques entre les deux chambres dépend de la distribution des sous-unités régulatrices (Franco *et al.*, 2001). Ces données vont dans le même sens que les études électrophysiologiques des embryons de souris. Dans les stades les plus précoces,  $I_{Kr}$  est enregistré dans l'atrium, concordant avec la restriction de KCNE2 (Davies *et al.*, 1996).

#### **III.2.3.2 Les canaux potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 pore**

Ces protéines codées par les gènes KCNJ1-16 s'associent en tétramères pour former des canaux à rectification entrante, Kir (inward rectifier). Ces canaux conduisent mieux les ions potassiques dans le sens entrant que sortant, cette rectification étant attribuée à des mécanismes d'occlusion du pore par le  $Mg^{2+}$  et des polyamines intracellulaires lors de la dépolarisation membranaire. Ces canaux peuvent être divisés en sous-familles selon leurs propriétés biophysiques et leurs modes de régulation. On distingue des canaux à rectification entrante classique (Kir2.x), des canaux activés par les protéines G (Kir3.x) et des canaux sensibles à l'ATP (Kir6.x).

### - Sous-famille Kir2.x

Deux de ces canaux (Kir2.1 et Kir2.2) présentent une expression cardiaque forte, excepté dans les tissus nodaux où elle est très faible (Wible *et al.*, 1995 ; Marionneau *et al.*, 2005). Ces canaux sont responsables du courant  $I_{K1}$  essentiel au maintien du potentiel de repos, et participent à la fin de la phase de repolarisation du PA. Des résultats obtenus dans des souris invalidées pour Kir2.1 et Kir2.2 montrent que Kir2.1 génère la composante principale du courant  $I_{K1}$  (Zaritsky *et al.*, 2001). Des mutations de Kir2.1 peuvent être responsables du syndrome d'Anderson caractérisé entre autre par l'apparition de troubles du rythme cardiaque chez l'homme (Plaster *et al.*, 2001).

### - Sous -famille Kir3.x

Parmi ces canaux, deux sont exprimés dans le cœur et plus particulièrement dans les oreillettes (Kir3.1 et Kir3.4) (Dobrzynski *et al.*, 2001). Ces sous-unités s'associent en hétérotétramères pour constituer des canaux générant le courant potassique activé par l'acétylcholine ou l'adénosine,  $I_{K,Ach}$ , lesquels sont activés par les récepteurs muscariniques. La première démonstration de la participation de ces canaux à la régulation de l'automatisme cardiaque a été établie avec des souris invalidées pour Kir3.4. Les myocytes atriaux de ces souris ne présentent pas de courant  $I_{K,Ach}$  et la quantité de protéines Kir3.1 est fortement diminuée, suggérant que Kir3.4 contrôlerait l'expression de Kir3.1 ainsi que l'assemblage et le trafic intracellulaire du complexe Kir3.1/Kir3.4 (Wickman *et al.*, 1998).

### - Sous-famille Kir6.x

Les deux membres de cette famille : les protéines Kir6.1 codées par KCNJ8 et Kir6.2 codées par KCJ11 sont exprimées dans le cœur. Pour être fonctionnelles, ces protéines doivent s'associer à des protéines ABC, les récepteurs aux sulfonylurées (Sulfonylurea Receptor). Trois protéines SUR ont été identifiées : SUR1 codée par ABCC8, ainsi que SUR2A et SUR2B, 2 isoformes résultant d'un épissage alternatif de ABCC9. Des études de reconstitution ont montré que différentes combinaisons entre Kir6.x et SUR forment des canaux à rectification entrante faible, qui ont la propriété d'être inhibées par l'ATP intracellulaire, avec des sensibilités diverses et des profils

pharmacologiques différents (Seino *et al.*, 1999). Les canaux  $I_{K_{ATP}}$  sont formés de 4 sous-unités  $\alpha$  et 4 sous-unités  $\beta$ . Les 3 protéines SUR sont exprimées dans le cœur, SUR2A étant la forme majoritaire. Le canal  $K_{ATP}$  membranaire des cellules cardiaques serait formé par l'association de Kir6.2 et SUR2A. Ce courant joue un rôle important de protection du myocarde lors d'épisodes ischémiques. Son activation, par une diminution importante du rapport ATP/ADP, conduit à un raccourcissement marqué du PA, ce qui permettrait de réduire la contraction et donc de diminuer la consommation d'ATP.

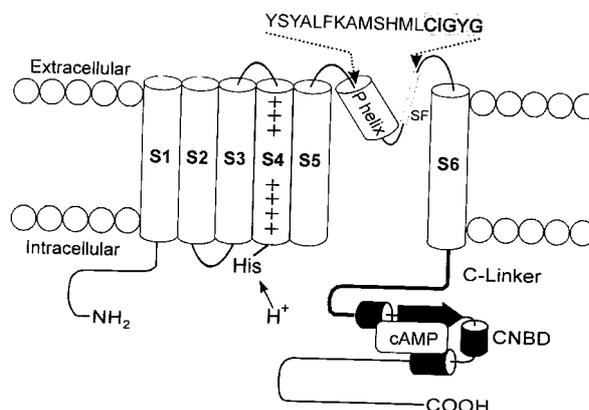
### **III.2.3.3 Les canaux potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 pores**

Au moins 15 gènes ont été clonés, mais seuls quelques-uns sont parfaitement caractérisés. Cette famille se répartit en 4 sous-classes dont celle des TWIK « Tandem of P-domains in Weak Inward rectifier K channel » qui est la mieux étudiée. Elle comprend TWIK-1 codé par KCNK1, TWIK-2 codé par le gène KCNK6/8 et TWIK-3 codé par le gène KCNK7. Ce dernier n'est pas exprimé dans le cœur de souris. Ces canaux sont inhibés par une acidification intracellulaire. TWIK-1 est exprimé faiblement dans le cœur de souris (Arrighi *et al.*, 1998). Le rôle de ces canaux n'est pas complètement élucidé, mais ils interviendraient dans le maintien du potentiel de repos, de même que la seconde sous-famille TASK (TWIK-related Acid Sensitive K channel) (Decher *et al.*, 2001 ; Duprat *et al.*, 1997). Cette sous-famille comprend TASK-1 codé par KCNK3 et TASK-3 codé par KCNK9. Ces deux membres sont exprimés dans le cœur (Kim *et al.*, 1999 ; 2000). La troisième sous-famille comprend 3 canaux sensibles au PH : TASK-2 codé par KCNK5, TASK-4 codé par KCNK17, et TALK-1 codé par KCNK16. La quatrième sous-famille comprend des canaux activés par l'étirement membranaire ou les acides gras polyinsaturés.

### **III.2.4 Les canaux activés par l'hyperpolarisation (HCN)**

L'activité automatique des cellules cardiaques est contrôlée par un courant mixte  $Na^+/K^+$  appelé  $I_f$  (f pour funny). Ce courant est activé par l'hyperpolarisation de la membrane plasmique. Il est également observé dans les neurones où il est appelé  $I_h$ . A ce jour, 4 gènes (HCN1-4 : Hyperpolarization-activated Channel) ont été identifiés.

Sur le plan structural, les canaux HCN se rapprochent des canaux CNG « Cyclic Nucleotide Gated ». Les canaux HCN comportent en effet les 6 hélices transmembranaires (S1-S6) des canaux potassiques dépendant du potentiel, ainsi qu'un domaine intracytoplasmique de liaison des nucléotides cycliques (CNBD) dans la région C-terminale (figure 32)



**Figure 32: Structure d'une sous-unité du canal HCN**

Ces canaux peuvent être activés par une hyperpolarisation et par les nucléotides (AMPc) après fixation directe sur le site CNBD. Les canaux HCN forment des tétramères. Parmi les 4 gènes clonés, 3 sont exprimés dans le cœur (HCN1, HCN2 et HCN4) à des niveaux variables selon les espèces, la région tissulaire, et l'âge. Les formes majoritaires sont HCN2 (BCNG-1 ou HAC-2) et HCN4 (BCNG-3 ou HAC-4). Dans le NS de souris, HCN4 est majoritaire, et est coexprimé avec HCN1 et HCN2 dont les niveaux sont extrêmement faibles (Moorman *et al.*, 2001). HCN1 n'est retrouvé dans aucun autre tissu cardiaque. A l'inverse HCN4 et 2 sont exprimés dans les tissus ventriculaires et auriculaires. Ces gènes sont régulés en fonction du développement. L'ARNm de HCN4 est détecté dans le croissant cardiaque (Garcia-frigola *et al.*, 2003). Les souris dont le gène HCN4 est inactivé, meurent entre 9,5 et 11,5 jours. Néanmoins, en dépit d'une réduction de 90% du courant  $I_f$ , ces embryons présentent une contraction régulière. Ceci indique qu'un niveau basal de contraction peut être maintenu en l'absence de HCN4. Les potentiels de pacemakers matures dans les embryons de type sauvage démarrent à 9 jours, ce qui n'était pas le cas des embryons déficients pour HCN4. Ainsi, les canaux HCN sont essentiels pour la génération de l'activité pacemaker dans le NS émergent (Stieber *et al.*, 2003).

### III.2.5 Les connexines (Cx)

Une vingtaine de gènes codant pour ces protéines formant des canaux jonctionnels intercellulaires ont été identifiés chez la souris. A cette diversité génique s'ajoute le fait qu'une même cellule peut exprimer plusieurs types de connexines. Deux classifications existent, qui les distribuent selon leur poids moléculaire (Cx 40 par exemple, Cx pour connexine) ou leur homologie de séquence. Les connexines s'assemblent en hexamères pour former des canaux transmembranaires appelés connexons. Deux connexons de cellules adjacentes forment un canal jonctionnel. La capacité d'un connexon à former ce canal avec un autre connexon est sélective et dépend des connexines qui le constituent. Les connexines, à l'exception de la Cx26 sont des phosphoprotéines. Tous les myocytes cardiaques sont connectés les uns aux autres par des jonctions communicantes localisées au niveau des disques interscalaires (Severs *et al.*, 1990). Trois connexines sont synthétisées respectivement par les myocytes : Cx40, 43 et 45 codées par les gènes GJA5, GJA1 et GJA7.

#### III.2.5.1 Connexine 43

La Cx 43 est la plus abondante dans le myocarde de souris adultes. Elle est associée à tous les myocytes auriculaires et ventriculaires adultes, contractiles et conducteurs. Néanmoins, elle n'est détectée ni dans NS et NAV, ni dans le faisceau de His (Kaba *et al.*, 2001 ; Coppen *et al.*, 2003). Son expression est soumise à une régulation spatio-temporelle au cours de la cardiogénèse. Elle est présente dans le tube cardiaque à 8,5 jours (Duncan *et al.*, 2002). A 10,5 jours, elle est observée dans les ventricules et un jour plus tard dans les oreillettes. Ultérieurement et jusqu'au stade adulte, l'abondance de la protéine augmentera dans les myocytes. Aux stades fœtaux et néonataux, un gradient d'expression de Cx43 est détecté dans la paroi des ventricules. Il augmente des couches sous-épicrodiques vers les couches sous-endocardiques, et peut être corrélé à l'état de différenciation des myocytes. De plus, il existe une régulation de cette protéine par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) dans les cœurs embryonnaires à 8,5 et 9,5 jours (Duncan *et al.*, 2002). La génération de lignées de souris dans lesquelles le gène de la Cx 43 est inactivé au niveau des cellules

cardiaques montre une activité contractile cardiaque normale, malgré une diminution d'expression de la Cx43 de 90%. Un taux d'expression faible de la Cx43 suffit à une propagation normale de l'influx nerveux (Gutstein *et al.*, 2001).

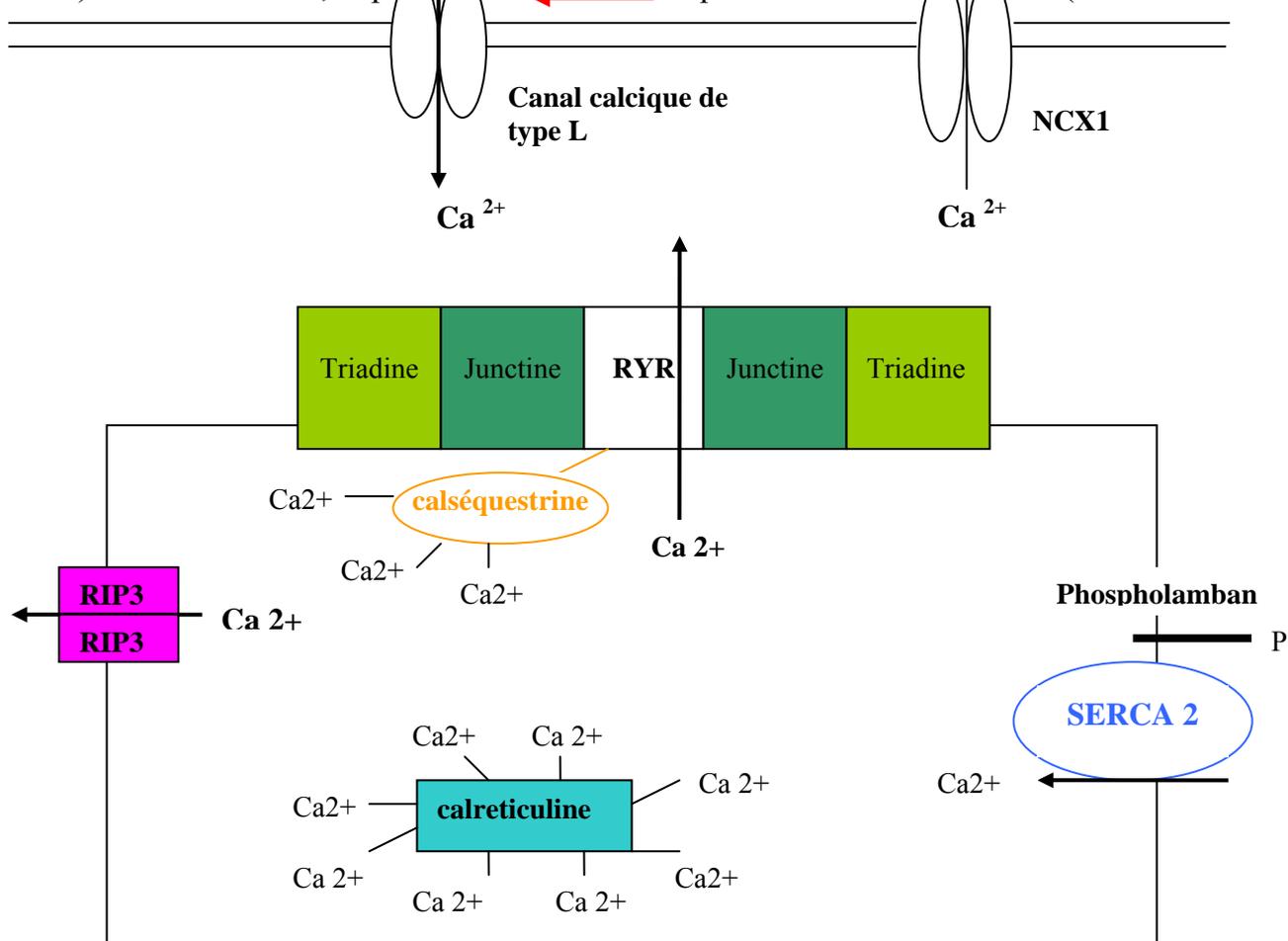
### **III.2.5.2 Connexine 40**

Les myocytes auriculaires et du tissu conducteur ventriculaire synthétisent en abondance cette protéine. Cette dernière est absente des cellules ventriculaires et est faiblement exprimée dans le NAV. Ce profil d'expression particulier est lié à la régulation négative qui affecte l'expression de ce gène au cours du développement embryonnaire. Le gène de la Cx40 est activé à partir de 9,5 jours. La protéine est détectée à 9,5 jours dans l'oreillette primitive, puis dans le ventricule gauche, et dans le ventricule droit. Au 14<sup>ème</sup> jour, la Cx40 est retrouvée dans tout le myocarde, à l'exception du sinus veineux, du canal atrio-ventriculaire, du bulbe artériel et du septum interventriculaire. Le gradient dans les parois ventriculaires est le même que celui décrit pour la connexine 43. Jusqu'au stade adulte, l'expression de cette connexine sera maintenue dans les myocytes auriculaires. A partir du 14<sup>ème</sup> jour, elle subira une régulation négative dans les cellules ventriculaires. Au stade ultérieur, elle ne sera détectée que dans les fibres de Purkinjé, et les coronaires. La délétion du gène Cx40 dans les souris, entraîne une létalité embryonnaire importante, de l'ordre de 50% entre les stades 12,5 et 13,5 jours, et une faible mortalité à la naissance et chez les jeunes adultes. Le myocarde de ces souris présente des perturbations de la conduction sino-auriculaire, un ralentissement d'environ 30% de la conduction dans les oreillettes, un retard de propagation de l'influx dans le faisceau de His, et une forte tendance au déclenchement de fibrillations auriculaires provoquées. Ces résultats mettent en évidence l'implication de la Cx40 dans les phénomènes de conduction auriculaire et atrio-auriculaire et sont en accord avec son profil d'expression.

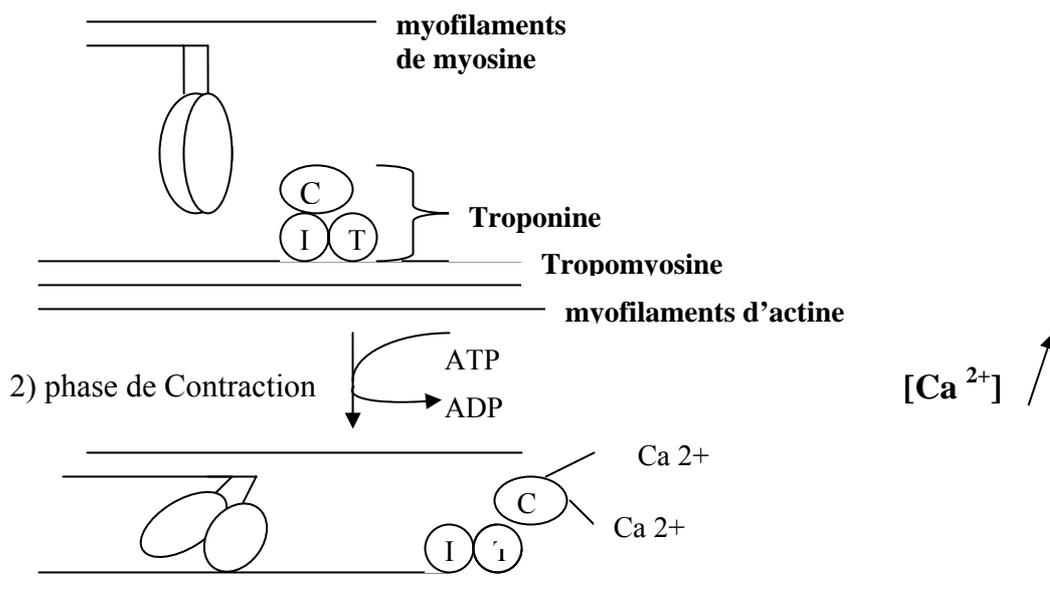
### **III.2.5.3 Connexine 45**

Le gène de la Cx 45 est activé dans tous les compartiments du myocarde dès le stade des premières contractions (8,5 jours). Son expression, toujours très faible comparée à celle des Cx 40 et 43, sera maintenue jusqu'au stade adulte en subissant une régulation spatiotemporelle. En effet, dès le 11<sup>ème</sup> jour, l'expression de la Cx45 s'atténue

fortement dans les oreillettes, puis ultérieurement dans les ventricules (Alcoléa *et al.*, 1999). Au stade adulte, la protéine n'est détectée que dans les tissus non ciliaux (NS et



### 1) Phase de repos



**Figure 33 : Schéma des différentes phases de la contraction.** La dépolarisation membranaire entraîne l'ouverture des canaux calciques de type L, puis la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) par les récepteurs ryanodines (RYR) et RIP3. Cette libération permet

l'augmentation de calcium intracellulaire. Le calcium libéré se lie à la troponine C entraînant un changement de conformation de la tropomyosine, et permettant une libération des myofilaments d'actine. L'hydrolyse de l'ATP par les têtes de myosines permet la contraction cardiaque. NAV), le système de conduction ventriculaire et la région proximale du septum interventriculaire. L'inactivation du gène de cette connexine est létale entre les stades 9,5 et 10,5 jours, due à des anomalies cardiaques et des défauts du placenta. Au stade 8,5 jours, les premières contractions cardiaques apparaissent dans les embryons Cx45<sup>-/-</sup>. Un bloc de conduction apparaît à 9,5 jours et une absence de coordination entre les contractions du ventricule primitif et le bulbe artériel. Ces résultats sont en accord avec le fait que la Cx 45 serait la seule connexine exprimée dans le canal auriculo-ventriculaire et le bulbe artériel. En revanche, les contractions dépendent de une ou plusieurs autres connexines.

### **III.3 La contraction cardiaque**

#### **III.3.1 Différentes phases de la contraction**

Le calcium joue un rôle central dans la contraction cardiaque. Celle-ci se déroule en plusieurs étapes : (1) La dépolarisation membranaire permet l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques de type L. (2) La quantité de calcium qui entre dans la cellule est insuffisante pour déclencher la contraction, mais elle entraîne une libération du stock de calcium intracellulaire par le mécanisme de « calcium induced-calcium released » décrit par Fabiato. Cette libération est réalisée par les canaux Ryanodine et RIP3 (Récepteur à l'Inositol 1, 4, 5 triphosphate) présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). (3) Le calcium, ainsi libéré dans le cytoplasme, va se fixer sur la troponine C entraînant un changement de conformation du couple tropomyosine-troponine I et libérant les sites ATPasiques de la myosine. (4) Le clivage de l'ATP et la formation des ponts entre l'actine et la myosine permettent la contraction cardiaque. (5) La relaxation se produit lorsque le calcium est libéré par la troponine C, puis récupéré par la pompe calcique du réticulum (SERCA) dont l'activité est contrôlée par le phospholamban (figure 33).

#### **III.3.2 Les partenaires de la régulation calcique**

Les canaux calciques de type L ayant été abordés au paragraphe III, ils ne seront pas décrits ici.

### III.3.2.1 Ryanodine (RyR)

Il existe trois formes de canaux ryanodines : RyR1, RyR2 et RyR3. RyR1 est présent essentiellement dans les muscles squelettiques, RyR2 dans le cœur et RyR3 dans le cerveau, le muscle squelettique, certains muscles lisses et des cellules non musculaires. Cette dernière isoforme a aussi été identifiée dans le cœur et plus précisément dans le NS et l'oreillette droite de souris adultes (Masumiya *et al.*, 2003). Le récepteur à la ryanodine est un tétramère de 4 sous-unités de 565 kDa. C'est en fait un complexe composé de protéines impliquées dans la signalisation et de protéines d'ancrage. Ainsi, sur chaque sous-unité du RyR2 sont fixées respectivement une molécule de FKBP12.6, une molécule de protéine kinase A (PKA) et ses sous-unités régulatrices, une molécule de protéine d'ancrage (mAKAP), une molécule de protéine phosphatase 1 (PP1) et une de type 2A (PP2A) (Marx *et al.*, 2000). Ce récepteur est activé par des concentrations  $\mu\text{M}$  de calcium, mM de caféine, et nM de ryanodine, et est inhibé par des concentrations  $\mu\text{M}$  de ryanodine et de rouge de ruthénium. L'activité de RyR2 est régulée *in vitro* par des kinases A, C, G et la protéine kinase calmoduline-dépendante (CamKII), ainsi que par FKBP12.6.

Au cours du développement précoce, l'expression des récepteurs à la ryanodine est faible et participerait plutôt à l'homéostasie calcique. L'expression de ces récepteurs va ensuite augmenter au cours du temps (Gorza *et al.*, 1997).

### III.3.2.2 Le récepteur à l'IP3 (RIP3)

Il existe 3 types de RIP3 : RIP3-1, forme ubiquitaire ; RIP3-2 présent dans les cellules cardiaques et les cellules non musculaires et RIP3-3 dans les cellules non musculaires. RIP3 est un tétramère formé de 4 sous-unités de 300kDa chacune. RIP3 est présent dans les tissus embryonnaires et persiste à l'âge adulte.

### III.3.2.3 Pompes calciques (SERCA)

Le remplissage du RS lors de la relaxation s'effectue contre un gradient de concentration, puisque la concentration dans le cytosol est de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M, alors que celle du RS est de l'ordre de  $10^{-3}$  M. Le transport de deux ions calcium dans le RS aux

dépens d'une molécule d'ATP et d'un contre-transport de  $H^+$  s'effectue par les ATPases de type SERCA. Ces pompes appartiennent à la famille des ATPases de type P (Moller *et al.*, 1996). Il existe 7 isoformes de cette protéine codée par 3 gènes : le gène SERCA1 (ATP2A1), SERCA2 (ATP2A2) et SERCA3 (ATP2A3). Le gène SERCA2 code pour 2 isoformes 2a et 2b. SERCA2a est présente dans le cœur, le muscle squelettique lent et les muscles lisses, SERCA2b est ubiquitaire. Dans le cœur, SERCA2a est retrouvée dans les cellules cardiaques, SERCA2b au niveau des cellules musculaires lisses des coronaires et SERCA3 dans les cellules endothéliales (Anger *et al.*, 1998). Ces isoformes présentent une affinité différente pour le calcium ( $2b > 2a = 1 \gg 3$ ). L'invalidation du gène SERCA2 chez la souris est létale. Les souris hétérozygotes pour ce gène développent une hypertrophie cardiaque, ainsi que des cancers multiples de la voie digestive et orale (Periasamy *et al.*, 1999). Ces résultats montrent l'importance de la SERCA2 dans la signalisation conduisant à l'hypertrophie. Dans le cœur, ces pompes sont régulées par le phospholamban. Des souris déficientes ou surexprimant ce régulateur ont permis de démontrer le rôle essentiel de cette protéine dans la contraction musculaire (Kiriazis *et al.*, 2000). Le phospholamban est un homopentamère de 52 AA qui se lie aux pompes ATPasiques lorsqu'il est déphosphorylé (James *et al.*, 1989). Dans le cœur, le phospholamban est exprimé majoritairement dans les ventricules et la sarcolipine dans les cellules atriales. Cette prédominance de l'un ou l'autre de ces régulateurs peut expliquer les différences de contractilité entre ces deux chambres cardiaques (Koss *et al.*, 1995). L'ARNm de la sarcolipine est augmenté au cours du développement et n'est présent que dans les cellules atriales (Minamisawa *et al.*, 2003).

### III.3.2.4 Séquestration du calcium dans le RS

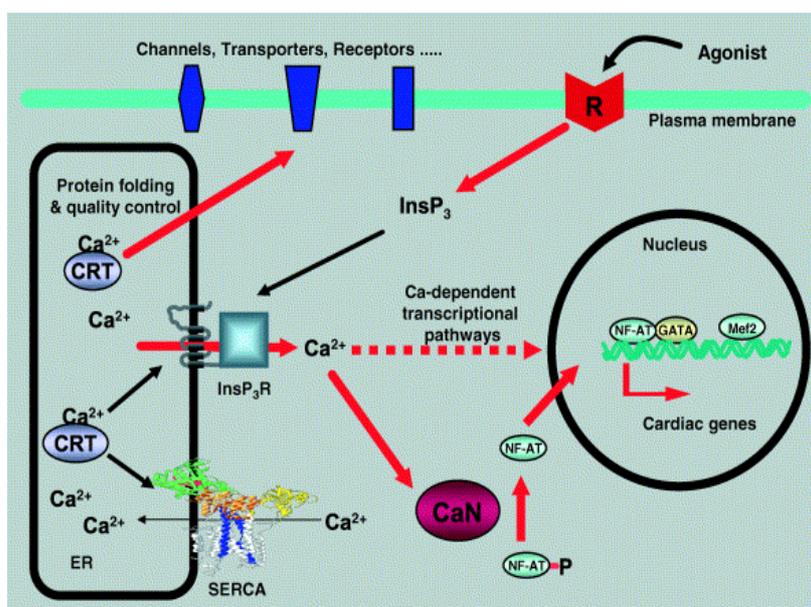
#### - Calséquestrine

La calséquestrine est une protéine de 45kDa qui fixe le calcium au niveau de sa partie C-terminale, très riche en résidus acides. Elle fixe le calcium avec une faible affinité, mais une très forte capacité. Il existe deux gènes codant pour la calséquestrine, l'un est exprimé dans le muscle squelettique, et l'autre dans le cœur. Différents travaux ont montré que la calséquestrine était connectée physiquement au récepteur de la ryanodine (Franzini-Armstrong *et al.*, 1997). La formation d'un complexe stable entre

calvésquestrine, récepteur ryanodine, jonctine et triadine à la membrane du RS est nécessaire pour que le calcium soit libéré du RS lors du couplage excitation–contraction.

### - Calréticuline

Cette protéine a de multiples fonctions (pour revue, Michalak *et al.*, 1999). Outre sa capacité à fixer le calcium avec une forte affinité et une forte capacité, elle interagit avec le récepteur à l'IP<sub>3</sub>, et SERCA2b. Elle diminue la capacité de transport de cette dernière (John *et al.*, 1998). La calréticuline intervient dans l'attachement cellulaire, et les voies apoptotiques. De plus, c'est une protéine chaperone qui joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et dans le développement cardiaque (Masaeli *et al.*, 1999). Les souris inactivées pour le gène de la calréticuline présentent une inhibition du relargage du calcium par les RIP3, et une diminution de l'import nucléaire du facteur de transcription NFAT. Ce dernier peut former un hétérodimère avec GATA 4 et augmenter son activité. Néanmoins, la translocation de ce cofacteur nécessite sa déphosphorylation par la calcineurine. L'activation de celle-ci et le transport de NFAT dépendent du relargage du calcium par les RIP3 (Timmerman *et al.*, 1996). Ainsi, un modèle d'action de la voie impliquant la calréticuline a été proposé (figure 34).



**Figure 34: Modèle proposé pour la régulation du développement cardiaque**

Le calcium retenu par la calréticuline (CRT) est libéré du réticulum sarcoplasmique (RS). Ce dernier se fixe sur la calmoduline (CaM) et active la calcineurine (CaN). Cette phosphatase va agir sur le facteur de transcription NFAT. Celui-ci une fois déphosphorylé va être transloqué dans

le noyau et permettre la transcription des gènes impliqués dans le développement cardiaque (extrait de Michalak *et al.*, 2002)

Le facteur de transcription NFAT représente un point important dans le développement cardiaque. Les souris inactivées pour ce gène meurent de malformations cardiaques (Ranger *et al.*, 1998). Les souris calréticuline  $\gamma$  décèdent entre 14,5 et 16,5 jours de développement. Pour surmonter cet obstacle, des cellules ES déficientes pour la calréticuline (Crt  $\gamma$ ) ont été créées. Les EBs dérivés de ces cellules présentent une faible contractilité, une diminution d'expression et de phosphorylation de MLC2v. Ceci conduit à une diminution de l'organisation myofibrillaire. Ces observations peuvent être reproduites sur des cellules ES sauvages en piégeant le calcium ou en inhibant la CAMK. L'exposition des cellules ES (Crt  $\gamma$ ) à l'ionomycine permet d'augmenter la concentration de calcium cytosolique et restaurer la phosphorylation de MLC2v et son insertion dans les myofilaments (Li *et al.*, 2002). Ces résultats montrent l'importance de la calréticuline dans la myofibrogénèse.

La calreticuline est fortement exprimée dans le cœur embryonnaire, puis elle diminue à la naissance. Cette régulation joue un rôle important dans le développement du système de conduction du NS et NAV. En effet, les souris continuant à surexprimer la calreticuline après la naissance, présentent une diminution de la fonction systolique, associée à un niveau faible d'expression des connexines 40 et 43, une conduction atrio-ventriculaire prolongée, suivie d'un block cardiaque entraînant la mort (Nakamura *et al.*, 2001). Cette régulation au cours du développement est assurée par un facteur de transcription COUF-TF1 qui supprime le site de fixation de Nkx2.5 et diminue l'expression de la calréticuline (Guo *et al.*, 2001).

### **III.2.5 L'échangeur calcium-sodium (NCX1)**

NCX1 est codé par le gène *Slc8a1*. Deux isoformes de NCX sont exprimées au cours du développement (Comway *et al.*, 2002). Des souris inactivées pour le gène codant pour NCX1 meurent à 10,5 jours en l'absence d'une organisation myofibrillaire normale. La réintroduction de NCX1 ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage, ce qui suggère l'intervention des deux isoformes dans les stades précoces du développement. De plus, l'utilisation de la caféine sur des embryons de souris âgés de 9,5 jours a montré que le RS n'était pas complètement fonctionnel, indiquant une

contribution faible de celui-ci à l'homéostasie calcique. Au cours du développement NCX1 est exprimé dans le champ cardiaque à 7,5 jours, et dans tout le myocardium à 8 jours. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans l'initiation des premiers battements (Linask *et al.*, 2001).

### **III.4 Calcium et activité de pacemaker**

L'apparition de l'activité pacemaker dans les stades précoces du développement est actuellement sujette à controverse. Deux hypothèses ont été formulées : pour l'une, le courant  $I_f$  est seul responsable de l'activité pacemaker. Cependant, le gène codant pour HCN4 est présent dans les cellules cardiaques dans les stades précoces, mais la protéine ne semble fonctionnelle qu'à partir de 9,5 jours (Stieber *et al.*, 2003). Cette observation a conduit à orienter les recherches vers la voie calcique. Ainsi, les oscillations calciques pourraient intervenir pour déclencher l'activité pacemaker au cours des stades précoces du développement. Dans les cardiomyocytes dérivés des cellules ES, l'expression des récepteurs à la ryanodine est faible puis augmente au cours de la différenciation ; à l'inverse les récepteurs à l'IP3 sont fortement présents dans les stades précoces, puis sont diminués dans les phases tardives (Sauer *et al.*, 2001). Ceci suggérerait une intervention de ces récepteurs dans les oscillations calciques et la génération de l'activité pacemaker. En effet, l'utilisation de cellules ES surexprimant la calréticuline ou transfectées avec un antisens dirigé contre le RIP3 de type I, a permis de démontrer l'importance de cette voie dans l'activité pacemaker (Mery *et al.*, 2005). Néanmoins, le déclenchement de l'activité pacemaker et des premiers battements semblent aussi faire intervenir l'échangeur sodique/calcique NCX1 (Comway *et al.*, 2002). Dans les cellules cardiaques dérivées de cellules ES déficientes pour RYR2, l'augmentation du rythme cardiaque observée lors de la différenciation est diminuée. Ces cardiomyocytes présentent une diminution du rythme de la phase de dépolarisation diastolique, suggérant le rôle de ce récepteur dans l'activité pacemaker (Yang *et al.*, 2002).

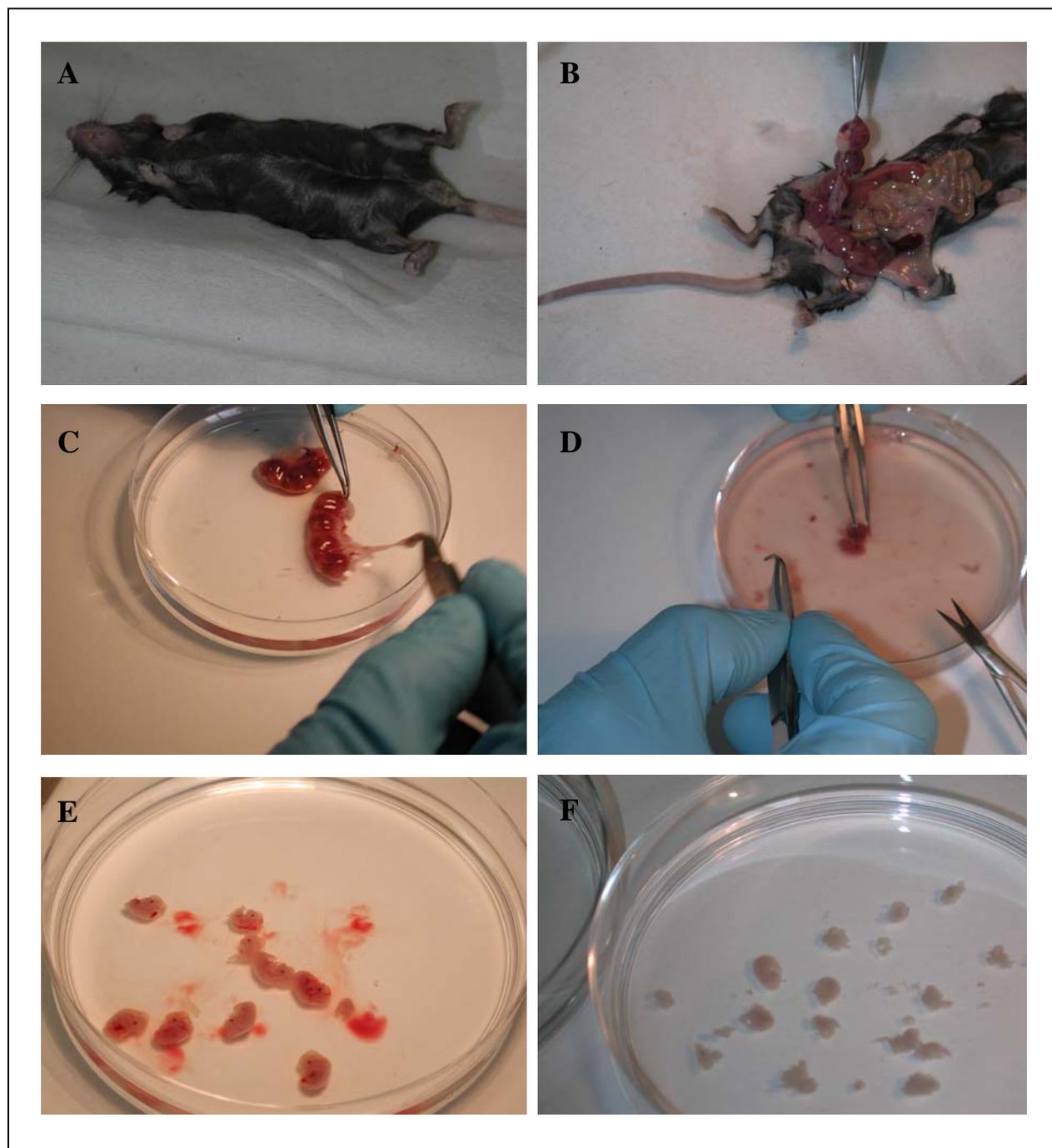
L'apparition de l'activité pacemaker et sa modulation dépendraient donc de l'intervention de nombreux facteurs.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Culture primaire**

### **I.1 Obtention des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF)**

Après une gestation de 14 jours, une souris de catégorie C57BL/6aRj (élevage Janvier) est sacrifiée par dislocation cervicale. La paroi abdominale, préalablement nettoyée à l'alcool 70°C, est incisée avec des ciseaux fins selon l'axe médian, afin d'exposer les cornes utérines. Ces dernières sont détachées de l'animal et les embryons sont libérés dans une boîte de Pétri contenant 15 ml de DPBS (Dubelcco's Phosphate Buffered saline Solution) (Invitrogen). Tous les organes « rouges » (foie, rate, cœur) sont enlevés, afin d'éliminer le maximum de globules rouges. Les embryons sont ensuite décapités et rincés dans une nouvelle boîte de Pétri comprenant 10 ml de DPBS. Ces derniers sont transvasés dans une boîte de Pétri contenant 15 ml de trypsine/EDTA (Sigma) diluée au ½ où ils sont émincés finement à l'aide de ciseaux ophtalmologiques (figure 35). Les fragments sont repris par une pipette de 10 ml, et 6 à 7 allées/retours permettent d'imprégner ces tissus de la solution enzymatique. Cette boîte de Pétri comprenant ce broyat d'embryons est placée dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 15 min. Cinq ml de Trypsine/EDTA diluée au ½ sont ajoutés, et 6 à 7 allées/retours sont effectués avant de remettre la boîte de Pétri dans l'incubateur pendant 10 min. Suite à la décantation des débris cellulaires d'environ 2 min dans un tube conique de 50 ml, le surnageant est transvasé dans un nouveau tube. Le volume est ensuite ajusté à 50 ml avec du milieu MEF. Celui-ci se compose de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen), 2mM glutamine (Gibco), 50 µg/ml pénicilline streptomycine (Gibco), et 10% de sérum de veau foetal (SVF, Hyclone). Une centrifugation de 1000 rpm à 4°C pendant 5 min est effectuée. Pour 13 embryons, le culot est repris dans 60 ml de milieu MEF etensemencé dans trois boîtes de 150 mm (Greiner). Après 24h de culture, le milieu des boîtes est changé. Lorsque 90% de confluence sont atteints, les fibroblastes embryonnaires sont dilués de moitié etensemencés dans de nouvelles boîtes pendant 48h, afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules pour la congélation.



**Figure 35: Premières étapes de l'obtention des fibroblastes embryonnaires de souris**

Une souris de catégorie C57Bl est sacrifiée par dislocation cervicale après 13,5 jours de gestation (A) Les cornes utérines sont exposées après incision de la paroi intestinale (B) puis détachées de l'animal et déposées dans une boîte de Pétri contenant du DPBS (C). Les embryons sont libérés de leurs sacs vitellins (D) puis décapités. Les organes rouges de ces embryons sont enlevés pour éliminer le maximum de globules rouges (E) puis déposés dans une boîte de Pétri contenant de la trypsine et émincés finement (F).

## **I.2 Congélation**

Ces cellules ne peuvent faire l'objet que de quelques passages (10 passages au maximum) d'où la nécessité de constituer une banque de cellules. La congélation débute par un passage. Après 3 lavages au DPBS, les cellules sont dissociées par la Trypsine/EDTA diluée au ½ pendant 3 min à 37°C. Après agitation mécanique, les cellules sont récupérées dans du milieu MEF pour arrêter l'action enzymatique. Une centrifugation de 5 min à 1000 rpm à température ambiante est effectuée. Puis, le culot cellulaire est repris dans 1 ml de milieu de congélation par boîte. Une dilution au 1/100<sup>ème</sup> est réalisée avant un comptage sur cellule de Malassez. Le milieu de congélation est composé de 40% de milieu MEF, 50% de sérum de veau foetal et 10% de DMSO (diméthyl sulfoxyde) (Sigma). Des cryotubes (NUNC) contenant 2. 10<sup>6</sup> cellules par tube sont placés 2h à -20°C, puis 3 jours à -80°C avant d'être stockés dans l'azote liquide.

## **I.3 Traitement par la mitomycine C**

Afin de bloquer la prolifération des MEFs, les boîtes de Pétri de 100 mm à 90% de confluence sont traitées pendant 3h avec de la mitomycine C à la concentration de 10 µg/ml (Sigma). Un passage est ensuite effectué et les MEFs sontensemencés à raison de 10<sup>6</sup> cellules par boîtes de 60 mm et de 500 000 cellules par boîtes de 35 mm. Ces cellules sont conservées 1 semaine dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> et utilisées en fonction des besoins.

# **II. Les cellules souches embryonnaires de souris (ES)**

## **II. 1 Lignée utilisée**

Le modèle utilisé pour notre étude est la lignée cellulaire R1 établie par Andréas Nagy en août 1991. Cette lignée a été établie à partir d'un blastocyste de 3,5 jours d'une F1 (129/Sv x 129 Sv cp) (Nagy *et al.*, 1993). La pluripotence de ces cellules a été testée par agrégation et injection des cellules dans un blastocyste pour créer des chimères.

La culture des cellules ES en phase proliférative ou leur différenciation est réalisée en adaptant les techniques précédemment décrites par Nagy *et al* et Maltsev *et al* en 1993.

## **II. 2 Culture des cellules ES en croissance**

### **II. 2.1 Passage des cellules ES**

Ces passages sont effectués lorsque la confluence atteint 40 % de la surface de la boîte, soit tous les deux jours. Après 3 lavages au DPBS, les cellules sont dissociées par la trypsine/EDTA diluée au ½ pendant 5 min à 37°C. Les « clusters » sont dissociés en cellules unitaires en utilisant une P1000. L'addition de milieu de croissance stoppe l'action de l'enzyme. Ce milieu se compose de DMEM à 4,5 g/l de glucose (Invitrogen), 2 mM glutamine (Gibco), 50 µg/ml de pénicilline/streptomycine, 100 µM β mercaptoéthanol (Sigma), 1% sodium pyruvate (Gibco), 0,1% acides aminés non essentiels (AANE) (Gibco), 15% de sérum de veau foetal (Hyclone), et de 1500 unités/ml de leukemia inhibitory factor (LIF) commercial recombinant souris (Sigma). Après une centrifugation de 1000 rpm pendant 5 min, le culot cellulaire est repris dans du milieu de croissance. Après une dilution au 1/12<sup>ème</sup>, les cellules sontensemencées dans des boîtes de 60 mm ou de 35 mm selon les besoins et maintenues dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>. Il est à noter que les lots de sérum utilisés ont été testés préalablement. Leurs effets ont été étudiés sur la croissance des cellules ES et sur la différenciation.

### **II. 2.2 La congélation**

Afin de maintenir la lignée à long terme, des congélations sont réalisées régulièrement avec des cellules ayant subi peu de passages. Ces congélations nécessitent l'utilisation de boîtes de Pétri de 100 mm. Lorsque la confluence atteint 80%, les cellules sont passées selon le protocole décrit dans le paragraphe II.2.1. Le culot est repris dans 1,5 ml de milieu de croissance par boîte de 100 mm. Puis, un volume équivalent de milieu de congélation, composé de 60% DMEM, 20% sérum de veau foetal, 20% DMSO, est ajouté. Trois cryotubes sont aliquotés et introduits dans une boîte de congélation avant de rejoindre le congélateur à -80° pendant trois jours, puis dans l'azote liquide. Afin de s'assurer de l'absence de contamination par les mycoplasmes, avant la congélation et après décongélation, un test utilisant des anticorps dirigés contre les variétés de mycoplasmes les plus fréquemment rencontrées est effectué (Roche).

## II. 3 Différenciation des cellules ES

Les MEFs inactivés constituent un obstacle à la différenciation correcte des cellules ES. Ils constituent une enveloppe rigide autour des cellules, entravent leur prolifération et limitent leur différenciation. Pour pallier ce problème, deux techniques ont été mises en place :

### - Création d'une lignée cellulaire de R1 sur gélatine

Afin de s'affranchir des MEFs traités par la mitomycine C, nous avons adapté les cellules R1 à la gélatine selon le modèle de la lignée CGR8 (Austin Smith *et al.*, 1991). Pour cela, nous nous sommes basés sur les capacités d'adhérence différentielle des fibroblastes et des cellules R1 sur le plastique. Cette technique permet l'adhésion rapide des fibroblastes sur le support gélatiné et les cellules R1 restent en suspension. Le surnageant est recueilli au bout de 30 min, puis les cellules sont ensemencées à très forte densité dans des boîtes de Pétri recouvertes de gélatine (0,1%) (Sigma). Le milieu de croissance utilisé est le même que celui décrit en II.2.1, mais la concentration en LIF commercial, élément indispensable au maintien de la pluripotence des cellules ES, est augmentée à 2000 unités/ml.

### - Ensemencement ou « plating » des cellules ES

Dans cette technique, seules les capacités d'adhérence différentielle des cellules sont mises en jeu. Avant de lancer une différenciation, un « plating » de 30 min est réalisé. Néanmoins, pour analyser les effets de différents facteurs sur la différenciation cellulaire, les cellules sont maintenues en culture sur gélatine. Ces cellules sont prétraitées pendant 24h avant de lancer une différenciation avec des concentrations variables de TGF- $\beta$ 1 (2,5 ; 5 et 10 ng/ml).

### II.3.1 Protocole de différenciation

Cette manipulation s'effectue en trois étapes successives (figure 36)

#### II.3.1.1 Initiation

La culture en gouttes pendantes permet la formation de corps embryoides (EBs). Après un passage, les cellules ES sont mises en suspension dans 10 ml de milieu de différenciation. Ce milieu diffère du milieu de croissance par l'addition de 20% de sérum de veau fœtal, de  $10^{-8}$  M de chlorure de sélénium (Sigma), et une absence totale

de LIF. Un comptage sur cellule de Malassez permet de préparer une dilution à 25 000 cellules/ml. Environ 80 gouttes de 20 µl de cette solution (soit 500 cellules par goutte) sont déposées sur le couvercle d'une boîte bactériologique de 100 mm. Le couvercle est ensuite retourné d'un geste continu sur la boîte correspondante contenant 10 ml de DPBS afin d'éviter la dessiccation. Les boîtes sont placées dans l'incubateur pendant deux jours. Les cellules sont attirées par gravité à l'extrémité de la goutte, et vont s'agréger pour constituer un corps embryoïde.

#### II.3.1.2 Récupération des gouttes

Celle-ci est effectuée deux jours après l'initiation de la différenciation. Les EBs formés dans les gouttes sont récupérés avec 3 ml de milieu de différenciation en se plaçant en haut du couvercle incliné. Ils sont ensuite récupérés dans une boîte bactériologique de 100 mm contenant 10 ml de milieu de différenciation. Cette étape de grossissement dure 3 jours.

#### II.3.1.3 Ensemencement

Après 3 jours de culture, les EBs sont prélevés avec une pipette de 5 ml. Ils sont déposés par gravité dans une boîte de Pétri de 100 mm préalablement recouverte de gélatine comprenant 10 ml de milieu de différenciation. La gélatine permet l'adhésion des EBs et le début de leur migration.

### II. 3.2 Dissociation des corps embryoïdes

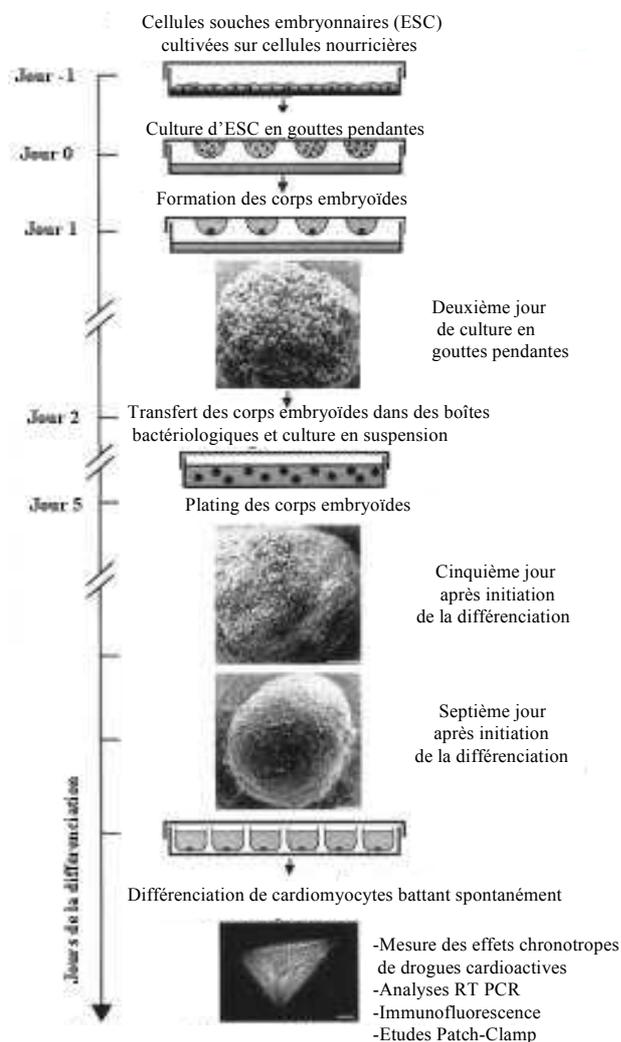
#### II.3.2.1 Solutions utilisées

- ADS 1X:

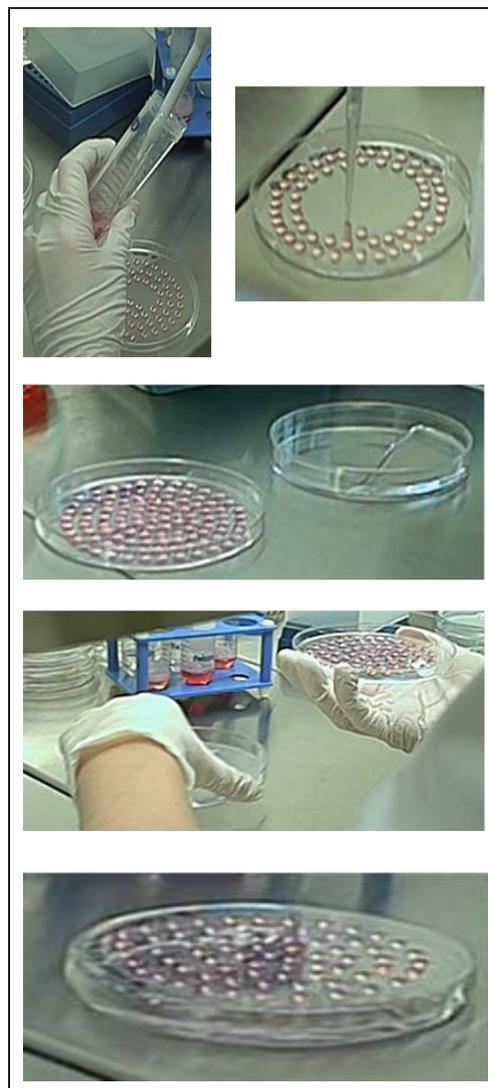
NaCl	117 mM
HEPES	20 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
KCl	5,4 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
glucose	5 mM
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

**Tableau IV: Composition du tampon ADS 1X**

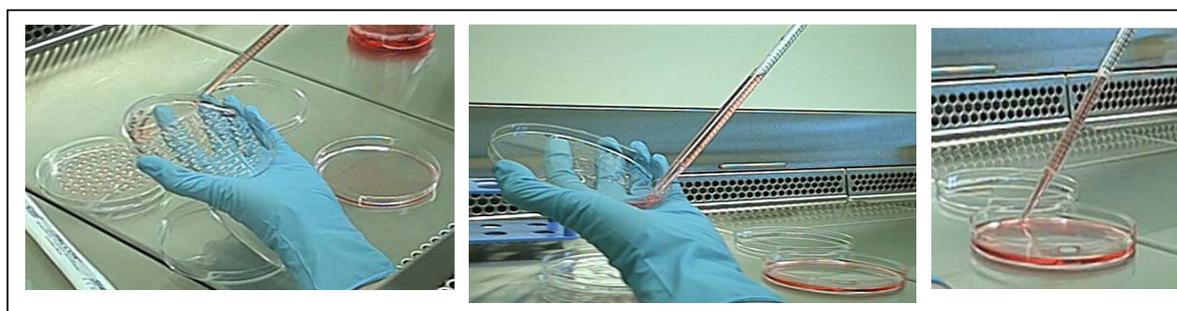
**(A) Représentation schématique des différentes techniques et étapes de différenciation des cellules souches embryonnaires de souris en cellules**



**(B) Initiation de la différenciation : du dépôt des gouttes au retournement du couvercle**



**(C) Différentes étapes de la récupération des gouttes**



**Figure 36 : Différentes étapes du protocole de différenciation**

Le pH de cette solution est ajusté à 7,35 +/- 0,05, avec une solution de NaOH à 1 M puis, le milieu est filtré sur une unité de filtration de 0,22 µm. Elle est conservée à 4°C.

#### - Solution pour les gradients de Percoll

Ce type de gradient est utilisé pour sélectionner les cellules cardiaques issues de la dissociation. Une solution stock de Percoll de densité 1,11 est obtenue en mélangeant 45 ml de Percoll pur (Sigma) avec 4,5 ml du tampon ADS 10X. A partir de cette solution, deux solutions de densité définie sont réalisées (Tableau V)

Solution de densité 1,07	5,5 ml de Percoll stock + 4,5 ml d'ADS 1X
Solution de densité 1,09	7,5 ml de Percoll stock + 2,5 ml d'ADS 1X

**Tableau V : Composition des solutions de Percoll**

Le gradient est obtenu en déposant dans un tube de 15 ml, 3 ml de la solution de densité 1,09 et en ajoutant très lentement sur le dessus 3 ml de la solution densité 1,07. Cette opération doit être faite sans mélanger les deux solutions pour constituer un ménisque à l'interface de celles-ci. C'est à cet endroit que les cellules cardiaques se situeront.

#### - Solution enzymatique

Cette solution se compose de 30 mg de collagénase de type II (Invitrogen) et de 5 mg de pancréatine (Sigma) diluée dans 50 ml d'ADS 1X. Cette solution est filtrée avec un filtre de 0,22 µm

#### II.3.2.2 Protocole

Cette étape permet de récupérer les cellules cardiaques à différents stades de différenciation (de 10,5, 11 jours et 15 jours).

Les cultures d'EBs sont rincées au DPBS, puis traitées par une solution de trypsine/EDTA diluée au ¼ pendant 1 min à température ambiante. Quatre ml d'une solution de pancréatine et collagénase de type II sont ajoutés. Les EBs sont décollés

mécaniquement à l'aide d'une pipette de 5 ml avant d'être placés pendant 20 min dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. A la fin de ce premier cycle, une dissociation mécanique à l'aide d'une pipette de 5 ml est effectuée, 4 ml de la solution composée de pancréatine et collagénase sont ajoutés. Les EBs sont placés dans l'incubateur pendant 20 min. Selon le stade de différenciation, un troisième cycle peut s'avérer nécessaire. Pendant ce temps, les gradients de Percoll sont préparés. A la fin de ce dernier cycle, les EBs dissociés sont collectés dans un tube de 50 ml et le nombre total de cellules est déterminé par un comptage sur cellule de Malassez. Après une centrifugation de 5 min à 1000 rpm, le culot est repris par de l'ADS 1X en fonction du nombre d'EBs (300 µl pour 20 EBs). Après dépôt de la solution d'ADS 1X contenant les EBs dissociés sur les gradients de Percoll, une centrifugation est réalisée à 3000 tours/min sans frein pour ne pas briser le ménisque du gradient pendant 30 min. Le ménisque contenant les cellules cardiaques est récupéré et introduit dans un tube de 50 ml. Le nombre de cardiomyocytes est déterminé par comptage sur cellule de Malassez. Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'ADS 1X pour rincer les cellules, puis une centrifugation de 5 min à 1000 rpm est effectuée. Les cellules cardiaques sontensemencées sur des lamelles de verre recouvertes de laminine (10 µg/ml) et sont cultivées en milieu de différenciation pendant une période allant de 3 jours à 1 mois.

#### **IV. Immunomarquage**

Les corps embryoïdes et les cellules cardiaques isolées à différents temps de la différenciation sontensemencés sur des lamelles de verre préalablement recouvertes de laminine (10 µg/ml) (Sigma). Après 3 jours de culture, les cellules cardiaques sont fixées. Pour éviter leur rétractation et leur décollement du support, une solution de chlorure de calcium et de magnésium à 1 mM est ajoutée à toutes les préparations décrites ci-dessous. Après 3 lavages au DPBS, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (PAF, Sigma) pendant 20 min à température ambiante. Le blocage du PAF résiduel et la perméabilisation des cellules sont assurés respectivement, par une solution de NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) et de Triton 100 (0,2%). Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de sérum d'albumine bovine 1% (BSA, Sigma) (tableau VI).

Mouse $\alpha$ -actinin clone EA-53 (Sigma)	1/1000 <sup>e</sup>
Mouse $\beta$ -MHC (Sigma)	1/200 <sup>e</sup>
Mouse MLC-2v clone F109.3E1 (Biocytex)	1/10 <sup>e</sup>
Mouse connexin 43 (Santa - Cruz)	1/400 <sup>e</sup>
Goat connexin 40 (Santa- Cruz)	1/50 <sup>e</sup>
Rabbit connexin 45 (Santa- Cruz)	1/200 <sup>e</sup>
Goat SERCA2 (Santa-Cruz)	1/50
Mouse MLC-2a	1/10 <sup>e</sup>

**Tableau VI: Dilutions des anticorps primaires utilisés dans cette étude**

Après une nuit d'incubation à 4°C, l'excès d'anticorps primaire est éliminé par lavage au DPBS. Puis, l'anticorps secondaire couplé à la fluoresceine (FITC) ou à la rhodamine (1/1000<sup>e</sup>, TBU), est incubé pendant 45 min à température ambiante. Après lavage au DPBS, une goutte de Vectashield est déposée sur les lamelles pour éviter la diminution de la fluorescence « bleaching », avant de les placer sur lames de verre. L'ensemble lame et lamelle est luté par du vernis. La lecture est effectuée soit sur un microscope à fluorescence Leica en utilisant le programme Axiovision 4, soit sur un microscope confocale Leica, TCS NT.

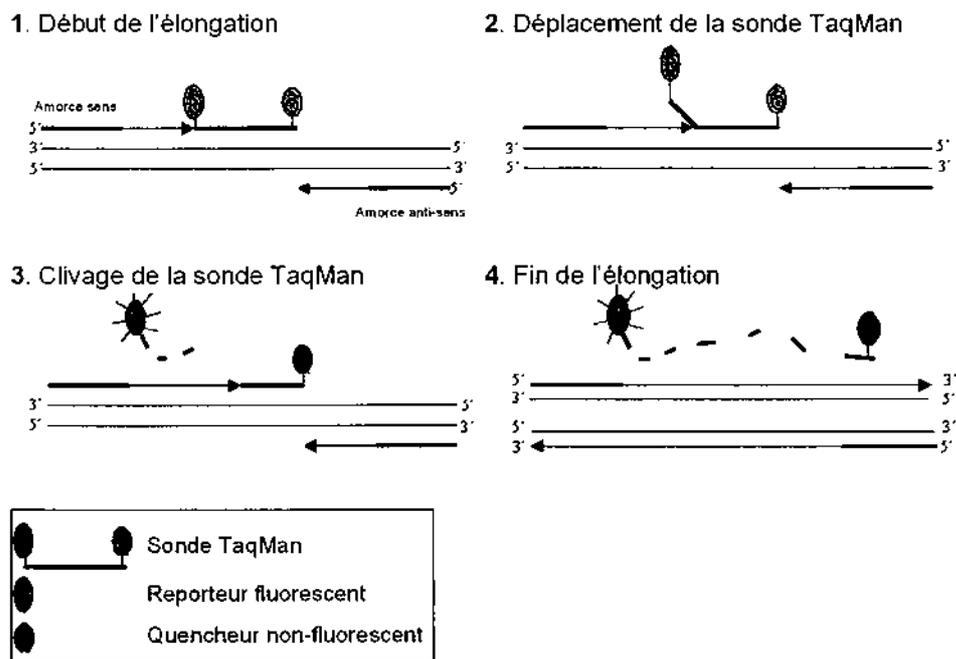
## V. Extraction d'ARN

Les ARNs totaux des cellules ES, des corps embryoïdes à 11 jours de différenciation, des cardiomyocytes isolés à différents stades de la différenciation (10,5, 11 et 15 jours) et cultivés pendant trois jours, sont isolés en utilisant le kit RNeasy mini kit (Qiagen).

L'absence de contamination par de l'ADN génomique est vérifiée par PCR. Le bon état des ARNs est analysé sur une puce Agilent (RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technologies) et la quantification est effectuée sur un « nanodrop ».

## VI. PCR en temps réel : Taqman et microfluidic card technology

Le principe de ces techniques est d'analyser le niveau d'expression des gènes d'intérêt, en utilisant la PCR en temps réel et plus particulièrement la technologie des sondes *Taqman*. Ces dernières sont composées de deux molécules, un « reporter » et un « quencher » qui, lorsqu'ils sont fixés à la sonde, n'émettent pas de fluorescence (figure 37). A chaque cycle de PCR, la Taq DNA polymérase utilise sa propriété exonucléasique de 5'-3' et clive l'extrémité de la sonde Taqman, libérant ainsi le « reporter » fluorescent. La fluorescence émise par celui-ci ne sera plus transférée au « quencher » et pourra être mesurée à sa longueur d'onde spécifique.

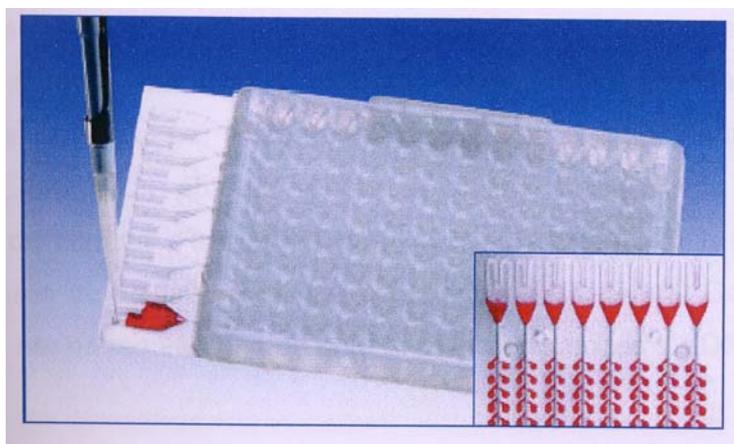


**Figure 37: Schéma récapitulatif des différentes étapes de la PCR TaqMan**

Cette technologie est commercialisée par la société Applied Biosystems sous la forme d'essais constitués d'un tube contenant un couple d'amorces (sens et antisens) et une sonde spécifique d'un gène (« Taqman Gene Expression Assays »). Les sondes Taqman sont marquées en 5' par le « reporter » fluorescent 6-carboxyfluoresceine (FAM, Applied Biosystems) et en 3' par un « quencher » non fluorescent. Ces sondes sont en

majorité interexoniques et permettent de quantifier toutes les isoformes issues d'épissages alternatifs. L'efficacité de PCR des essais est de 100%, ce qui signifie que la quantité de produits de PCR est doublée à chaque cycle.

Une innovation récente a consisté à organiser les sondes et les amorces dans une plaque permettant une analyse à haut débit. Les cartes microfluides ou « Taqman microfluidic technology » sont constituées de 384 puits, préalablement chargés par un essai Taqman spécifique d'un gène. Elles permettent d'analyser en simultané l'expression de 384 gènes au maximum (figure 38). Nous avons choisi une configuration de 96 gènes qui permet d'amplifier ces gènes dans 4 échantillons en simultané sur cartes microfluides.



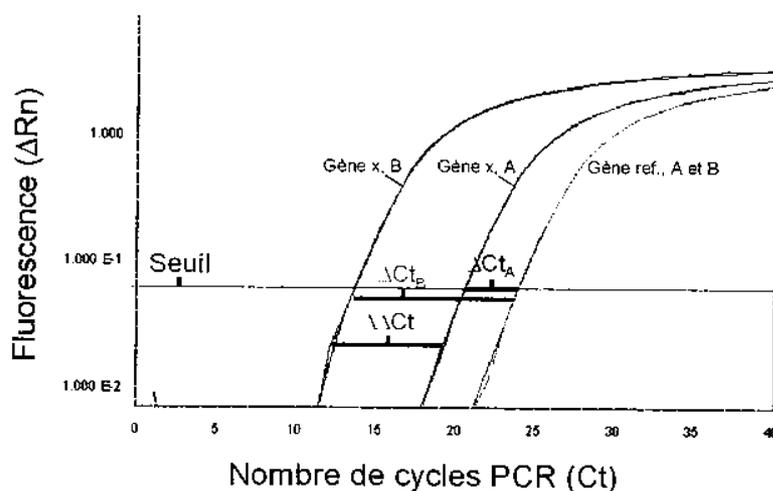
**Figure 38: Photographie d'une carte microfluide**

Ces puits sont connectés à un réservoir principal et reliés entre eux par un réseau de microcapillaires. Les ADNc complémentaires (ADNc) combinés aux réactifs de PCR sont déposés dans chaque réservoir, puis distribués par centrifugation dans chacun des puits par le réseau des microcapillaires. Chaque puits contient 1 ng d'ADNc dans un volume réactionnel de 1  $\mu$ l. Les puits sont scellés et les amplifications sont ensuite réalisées dans un thermocycleur « ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System ». L'évolution du niveau de fluorescence est suivie en temps réel au cours des cycles d'amplification.

## **Protocole**

Les ADNc sont synthétisés à partir de 200 ng d'ARN total en utilisant des « random primers » fournies par le « high-capacity cDNA archive kit » (Applied Biosystems). Le programme utilisé fait intervenir un cycle à 25°C pendant 10 min suivi d'un cycle

de 2h à 37°C. Cent ng d'ADNc, mélangés au réactif « TaqMan Universal Master Mix » (1x, Applied Biosystems), sont chargés dans les réservoirs, puis distribués dans chacun des puits par le réseau de microcapillaires. Chaque puits contient 1 ng d'ADNc dans un volume réactionnel de 1 µl. Les puits sont scellés et les amplifications sont ensuite réalisées en simplicité à 50°C pendant 2 min, 10 min à 94,5°C, puis 40 cycles d'amplification sont effectués à 95°C pendant 30 sec et à 59,7°C pendant 1 min avec l'appareil « ABI Prism 7900HT Sequence Detection System » (Applied Biosystems). Les données sont collectées en utilisant le logiciel SDS 2.1, et une courbe représentant l'évolution de la fluorescence en logarithme, en fonction du nombre de cycles, est obtenue (figure 39).



**Figure 39: Représentation schématique de la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$**  (Livak and Schmittgen., 2001). Pour chaque condition expérimentale (A et B), le  $\Delta C_t$  est calculé selon la formule  $\Delta C_t = C_{tx} - C_{tref}$  où x correspond au gène analysé et ref au gène de référence utilisé pour normaliser. Il est possible de calculer les ratios qui permettent de comparer l'expression du gène x soit par rapport à sa référence ( $2^{-\Delta C_t}$ ) soit par rapport à une autre condition expérimentale ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  où  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tB} - \Delta C_{tA}$ ). Le gène de référence dans ces deux conditions A et B est stable.

Cette courbe va permettre de déterminer le cycle seuil ou  $C_t$  (threshold cycle) pour chaque gène. Ce cycle correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre la valeur de la phase linéaire de la courbe. Les résultats sont analysés selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen., 2001) :

Le  $C_t$  d'un gène x est normalisé par un gène de référence selon la formule :

$$\Delta C_t = C_t \text{ gène} - C_t \text{ gène de référence}$$

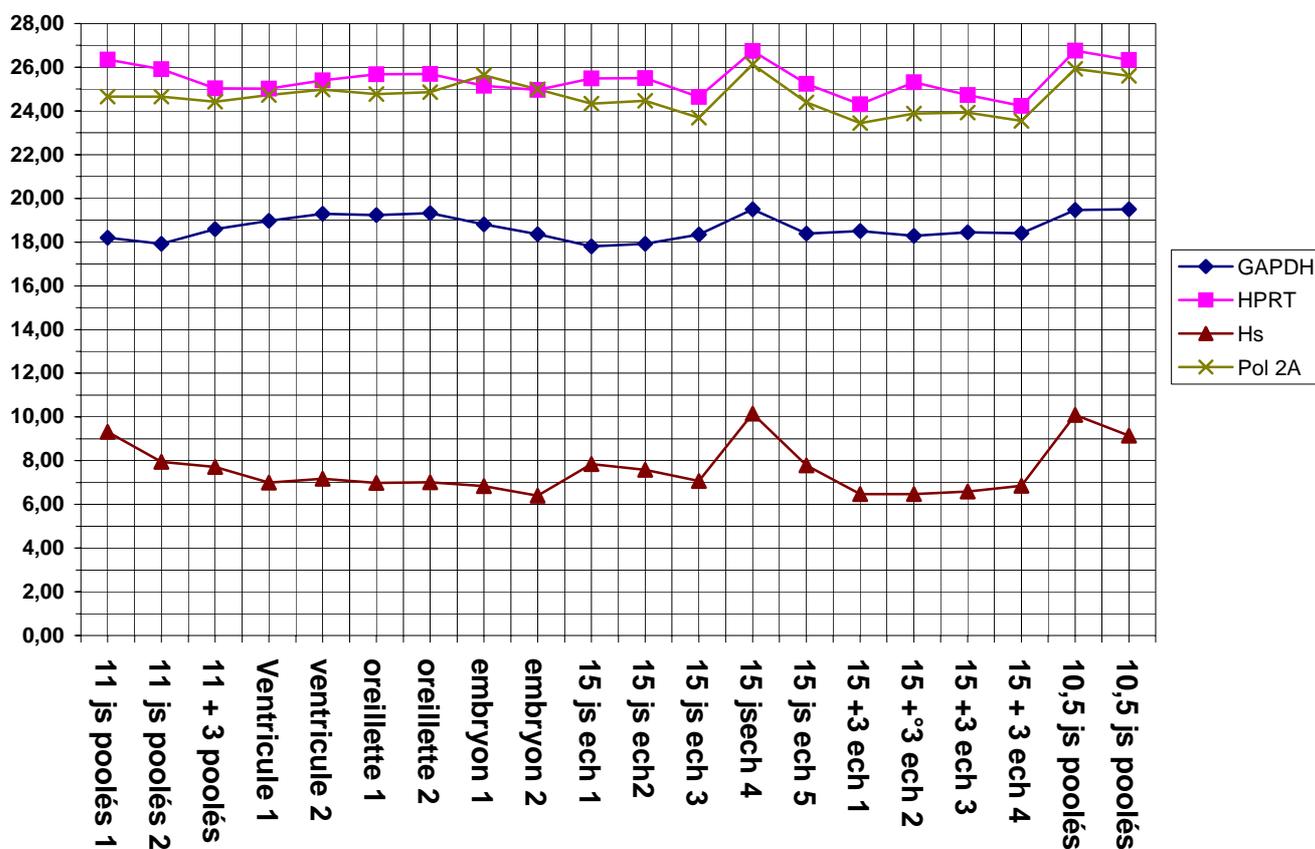
La transformation des valeurs logarithmiques en échelle linéaire permet d'obtenir le rapport :

$$R = 2^{-\Delta CT}$$

Ce rapport correspond au ratio d'expression d'un gène x par rapport à sa référence.

Les gènes dont les Ct sont supérieurs à 32 sont éliminés par manque de reproductibilité.

Quatre gènes de référence sont analysés dans nos différents échantillons. La figure 40 montre l'évolution de ces gènes dans les échantillons analysés. Le gène codant pour la GAPDH est le plus stable dans nos différentes conditions et est utilisé pour normaliser nos données.



**Figure 40 : Evolution des gènes de référence dans les différents échantillons testés**

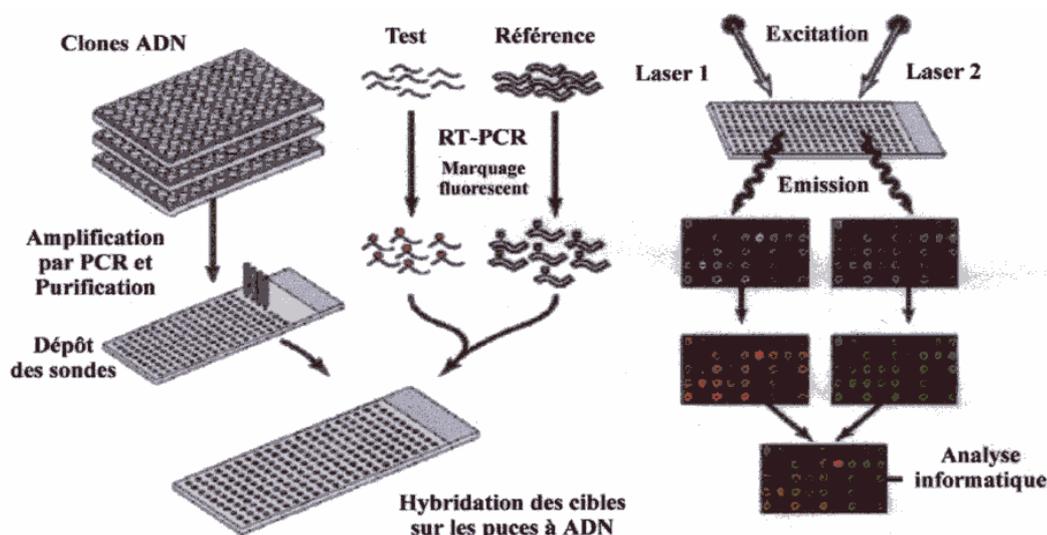
Les 96 gènes étudiés dans ce travail codent pour des canaux ioniques et leurs sous-unités régulatrices, des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, ainsi que des protéines du cytosquelette et du système de contraction. Ces gènes sont référencés dans l'annexe I. Toutefois, certains autres gènes ont été analysés en utilisant des « Taqman Gene Expression Assays ». Ils sont normalisés avec le même gène de référence.

## VII. Puces à ADN

Une puce à ADN est constituée de sondes nucléotidiques déposées ou synthétisées sur un support solide de quelques cm<sup>2</sup>. La miniaturisation du procédé permet des milliers d'hybridations simultanées en utilisant une quantité moindre de matériel génétique et une visualisation très rapide des différences d'expression entre les gènes.

### VII.1 Principe général des puces à ADN

Les cibles sont constituées de l'ARN total extrait de nos différentes conditions. Une étape de transcription inverse permet de générer des fragments d'ADNc marqués par incorporation de nucléotides couplés à un fluorochrome (cyanine 3 ou 5). Ces molécules émettent un signal lumineux après excitation par un faisceau laser : CY3 à 635 nm (rouge), CY5 à 532 nm (vert). Un couple de cibles complexes est constitué ; il résulte du mélange en proportions équivalentes de 2 cibles complexes marquées avec des cyanines différentes. Après dénaturation, ce couple de cibles est déposé sur la puce pour réaliser l'hybridation spécifique sonde/cible. Un lavage des lames est réalisé à stringence croissante pour éliminer les hybridations non spécifiques. Le signal est ensuite analysé par un logiciel de traitement d'images (figure 41)



**Figure 41: Principe général de réalisation des puces à ADN** (extrait de « the chipping forecast » Supplement de Nature Genetics 21 janvier 1999)

L'analyse comparative du profil d'expression des cellules ES prétraitées ou non pendant 24h avec du TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) a été réalisée en utilisant des puces à ADN pangénomique. Pour cela, une étape de transcription inverse des ARNTs

(constituant nos cibles) est effectuée et permet de générer des fragments d'ADNc marqués par l'incorporation de nucléotides (aminoallyl dUTP) couplés à un fluorochrome (CyDYe : cyanine 3 pour les contrôles, cyanine 5 pour les TGF- $\beta$ ). Des puces commerciales « pangénomiques » composées de 30 000 spots répartis sur 3 puces (Pan mouse 10K Array A, B, C (MWG SA Biotech) sont utilisées.

## VII.2 Fabrication et marquage des cibles

Les ARNs totaux des deux « pools » de cellules ES sont extraits, quantifiés et leur qualité vérifiée sur puce Agilent « RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technologies ». L'absence de contamination génomique est aussi vérifiée par PCR.

### VII.2.1 Protocole des puces Agilent

Un  $\mu\text{l}$  de RNADye (fluorochrome s'intercalant entre les bases de l'ARN) est ajouté à 65  $\mu\text{l}$  de gel matrice. Ce fluorochrome va permettre de suivre la migration des échantillons à travers le gel, puis son excitation par un faisceau laser permettra leur détection. Neuf  $\mu\text{l}$  de ce mélange vortexé sont ensuite déposés dans le puits G (Gel). Une pression est alors exercée pendant 30 sec avec une seringue pour une bonne répartition du gel sur toute la puce. Neuf  $\mu\text{l}$  de ce même mélange sont ajoutés avec une pipette dans les 2 autres puits notés G. Ces derniers permettront au système de revenir à sa ligne de base. Cinq  $\mu\text{l}$  de tampon de migration contenant le marqueur « RNA 6000 Nano » de 30 kbs sont déposés dans chacun des autres puits pour calibrer l'appareil (figure 42).

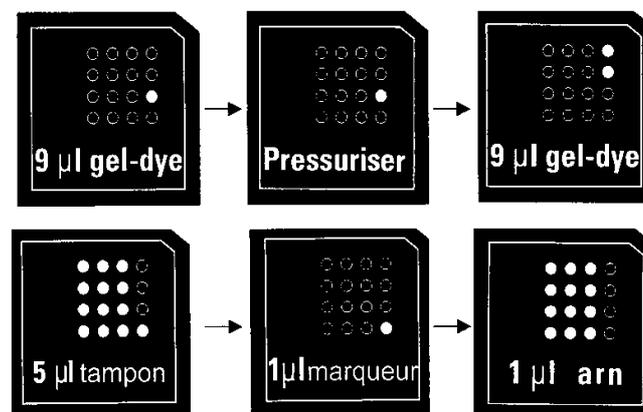


Figure 42: Protocole 6000 Nano Assay (Agilent technologies)

Les ARNs sont dénaturés 2 min au bain-marie à 70°C afin d'éliminer leurs structures secondaires et d'éviter leur mauvaise migration dans le gel. Chaque échantillon d'ARN (1µl) et un mélange de marqueur de taille (de 300 paires de bases à 6 kbs) sont déposés dans les puits. La puce est vortexée 1 min afin de mélanger le tampon et placée dans l'appareil Agilent 2100 Bio analyser. Ce dernier chauffe la puce à 30°C pour une meilleure fluidité du gel et charge les échantillons un à un après une calibration. Les ARNs passent devant un faisceau laser, ce qui excite le fluorochrome et permet leur visualisation. Un pic 28S, plus petit que celui du 18S, traduit une dégradation par des Rnases. Un faible rapport 28S/18S traduit une éventuelle dégradation des ARNs et la présence de pics dans les hauts poids moléculaires celle d'une contamination par ADN génomique. Ces différents problèmes n'ont pas été rencontrés dans nos conditions.

### **VII.2.2 Précipitation des ARNs**

Les ARNs sont précipités par ajout de  $1/10^{\text{ème}}$  de volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et d'un volume d'isopropanol filtré. Après une nuit à -20°C, le mélange est centrifugé 10 min à 13000 rpm à 4°C. Le culot est repris dans un volume d'éthanol 70% et à nouveau centrifugé. Le séchage du culot est suivi de sa dissolution dans de l'eau afin d'obtenir une concentration de 2,5 µg/ml.

### **VII.2.3 Marquage des ADNc cibles**

Il est réalisé grâce au « Cyscribe cDNA post labelling kit » (Amersham Bioscience).

#### **VII.2.3.1 RTPCR**

Cette première étape permet la synthèse d'ADNc et l'incorporation d'aminoallyl dUTP. Cette réaction s'effectue sur l'ARN total des cellules ES en utilisant, seulement des oligodTs. Dans un tube, 8 µl d'ARNT (soit 20 µg) et 3 µl d'oligodTs sont ajoutés. Cette opération est réalisée pour chaque condition. Puis, les tubes sont dénaturés 5 min à 70°C pour éliminer les structures secondaires. Pour permettre l'hybridation des amorces oligodTs, les tubes sont laissés 10 min à température ambiante. A ce mélange, sont ajoutés 4 µl de tampon cyscript 5X, 2 µl DTT (0,1M), 1 µl dNTP, 1µl AA-dUTP (amminoallyl dUTP) et 1 µl de cyscript reverstranscriptase. Puis, ces tubes après une centrifugation, sont placés à 42°C pendant 1h30.

### **VII.2.3.2 Purification de l'ADNc modifié par l' aminoallyl**

#### VII.2.3.2.1 Dégradation de l'ARNT

L'ADNc aminoallyl modifié est purifié afin d'ôter l'ARNm, de faciliter l'hybridation de la sonde d'ADNc aux ADNc cibles immobilisés sur la puce et de minimiser son hybridation avec l'ARNm complémentaire en solution. Pour cela, l'ARNm est dégradé en petits oligomères par un traitement alcalin. Ces oligomères et les nucléotides non incorporés sont ensuite éliminés par un passage sur une colonne de chromatographie. Cette opération est réalisée en introduisant 2µl de NaOH (2,5 M) dans chaque tube. Ce mélange est vortexé et centrifugé. Puis, les tubes sont incubés pendant 15 min à 37°C dans un bain-marie. Pour neutraliser le NaOH, 10 µl de tampon HEPES (2M) sont ajoutés dans chaque tube. Après avoir été de nouveau vortexés et centrifugés 15 sec, les ADNc sont prêts pour une purification.

#### VII.2.3.2.2 Purification de l'ADNc

Cette étape est effectuée par le kit de purification GFX PCR DNA maintenu à température ambiante. Les nucléotides et les oligomères sont éliminés sur une colonne fournie dans le kit. Un tampon de capture (500 µl) est ajouté aux tubes afin que l'ADNc s'accroche à la colonne. Le tout est transféré 5 min sur une colonne GFX et centrifugé 30 sec à 13 000 rpm. Une solution de lavage (600 µl) est déposée sur colonne. L'élution est réalisée grâce à 60 µl d'eau « nucléase free » préalablement chauffés à 70°C et déposés directement sur la colonne. La colonne est centrifugée 1 min à 13 000 rpm pour récupérer l'ADNc. Le séchage est effectué pendant 30 min sous vide « Speed Vac ». Le culot est repris dans 16,5 µl d'eau. Le bon fonctionnement de la « reverse transcriptase » est vérifié sur une puce Agilent.

### **VII.2.2.3 Marquage par les cyanines (CY5 et CY3)**

#### VII.2.2.3.1 Etape de couplage

Le marquage de l'ADNc est achevé lorsque les NHS Esters CyDye réagissent avec les groupes aminoallyls incorporés dans l'ADNc lors de sa synthèse. Un groupe réactif est porté sur chaque molécule de Dye. Ceci permet un marquage précis des groupes aminoallyls. Un aliquot de CyDye (quantité suffisante pour un marquage Cy3 et Cy5) est resuspendu dans 15 µl de NaHCO<sub>3</sub> (pH9, 0,1M), puis introduit dans un tube d'ADNc. Ce mélange est vortexé, centrifugé et laissé 2h dans l'obscurité pour

permettre la réaction de couplage. Afin de fixer le couplage et d'inactiver les molécules de NHS Ester n'ayant pas réagi, 15 µl d'hydroxylamine (4M) sont ajoutés par tube. Les tubes réactionnels sont centrifugés et incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 15 min.

#### VII.2.2.3.2 Purification

Cette étape est identique à celle décrite en VII.2.3.2.2. Elle permet d'éliminer les molécules de CyDye non incorporées, étape indispensable pour minimiser le bruit de fond et améliorer ainsi la sensibilité de détection des cibles en faible abondance. Le culot est repris dans 30 µl de la solution d'hybridation après séchage de 30 min sous vide.

### VII.2.3 Hybridation

#### VII.2.3.1 Préhybridation

Cette opération permet de diminuer le bruit de fond en bloquant les sites aspécifiques grâce à la présence de BSA. Le tampon de blocage est composé :

4X SSC (sodium décadocyl citrate)	}	Filtré pour éliminer le précipité
0,5 % SDS		
1 % BSA dans 150 ml eau		

Les lames sont immergées 45 min dans une solution de blocage chauffée à 42°C. Elles sont lavées 5 fois dans de l'eau milliQ et séchées par une centrifugation à 500 rpm pendant 3 min.

#### VII.2.3.2 Hybridation

Les ADNcs repris dans 30 µl de solution d'hybridation sont « poolés » pour atteindre 40 µg d'ARN total. Ce mélange est dénaturé 3 min à 95°C, centrifugé 1 min. Puis, 30 µl sont déposés sur chaque lame. Vingt µl de SSC 3X sont introduits dans le réservoir de la lame et 3 µl sur le dessus. Les lames sont incubées de 16 à 24h à 42°C pour hybridation des ADNc simples brins complémentaires.

#### VII.2.3.2 Lavage des lames

Les lames sont immergées 2 min sous agitation douce dans des solutions de stringence croissante (SSC 2X, SSC 1X, SSC 0,2 X). Elles sont ensuite séchées par centrifugation

pendant 3 min à 500 rpm, et traitées par 460 µl de Dyesaver, permettant d'éviter toute perte de fluorescence du Cy5 due à la chaleur. Après 3 min de séchage, les lames sont conservées à l'abri de la lumière.

### **VII.3 Acquisition des données**

La fluorescence émise par les marqueurs est enregistrée. Le signal est recueilli sous forme d'image qui est fragmentée de manière à délimiter chaque unité d'hybridation. Les données sont extraites, permettant de définir pour chaque spot, l'intensité d'hybridation correspondante à chaque cible. Le rapport des intensités déterminera le niveau d'expression entre les deux cibles.

#### **VII.3.1 recueil d'images par le scanner**

La lecture est réalisée par un scanner composé d'un microscope confocale couplé à 3 lasers (ScanArray 4000 GSI lumonics USA)

Les lames sont lues successivement par 2 lasers de longueurs d'ondes correspondant à l'excitation des fluorochromes (CY3 et CY5). La fluorescence émise est enregistrée avec une résolution spatiale de 10 µm. On obtient ainsi deux images polychromes distinctes correspondant chacune à une cartographie de l'intensité émise par les deux cyanines. Les réglages de l'intensité de chaque laser et de son photomultiplicateur (PMT) permettent d'obtenir des niveaux globaux d'intensité équivalente pour les deux images.

Les images sont ensuite importées dans le logiciel de traitement d'images (GenePixPro 5) dédié aux puces à ADN. Les deux images sont superposées et affichées suivant un nouveau code couleur artificiel. La cartographie CY3 est représentée en intensité de vert, croissante avec le niveau du signal. De même, l'image CY5 est représentée en rouge. La superposition des deux images sur de nombreux spots apparaît en jaune. Le logiciel permet de « flagger » ou d'éliminer les spots qui présentent un signal défectueux ou une anomalie et de déterminer les niveaux de bruit de fond pour chaque spot. GenePixPro positionne des grilles automatiquement et le bruit de fond est déterminé dans un cercle autour du spot. Les données sont extraites sous forme de fichier exploitable avec le logiciel Excel. Les signaux d'intensité pour chaque spot sont définis par le signal mesuré, moins le bruit de fond local. Le rapport qui sera

utilisé par la suite est défini par le rapport des signaux d'intensité calculés pour chaque cyanine (CY3/CY5).

### **VII.3.2 Traitement du signal**

Les données sont ensuite exportées dans MADSCAN (MicroArray Data Suites of Computed Analysis). Ce programme a été développé au sein de notre laboratoire par Nolwenn Le Meur (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/login.php>). Celui-ci permet l'analyse de ces données suivant trois étapes :

- Validation physique : cette opération a pour but d'extraire l'information en tenant compte du bruit de fond et du niveau de saturation des spots, de valider la qualité de ces derniers
- Normalisation : pour éliminer les biais expérimentaux
- Validation statistique : pour évaluer la cohérence des réplicats dans une puce et entre des puces. Ceci permet de valider le niveau d'expression de chaque gène.

#### **VII.3.2.1 Validation physique**

Les spots éliminés sont ceux avec un niveau d'expression très faible, proches du bruit de fond ou à l'opposé, avec des niveaux très hauts, proches de la saturation. Pour déterminer les spots valides, un score est défini, en compilant les critères de qualité, en tenant compte du bruit de fond, du diamètre du spot, du niveau de saturation et des niveaux d'intensité du signal. De plus, la cohérence de l'ensemble des pixels composant l'intensité du signal (moyenne d'intensité) et de ceux composant le bruit de fond, sont pris en compte. Sur cette base, il existe 5 scores :

- Score 0 : spots inutilisables car
  - présence de poussières
  - spots trop petits
  - bruit de fond plus important que le signal ou en fonction du rapport signal/bruit

L'intensité du signal par rapport au bruit de fond doit être 3 fois supérieure au standard.

- Score 2 : correct
- Score 3 : CY3 est saturé

- Score 4 : CY5 est saturé
- Score 5 : les deux sont saturés

Dans ce dernier cas, il est possible d'effectuer le calcul. Celui-ci tiendra compte du pourcentage de pixels saturés.

$$M \text{ adjust} = \text{Log2} (\% \text{ pixel saturé CY5}) / (\% \text{ pixel saturé CY3})$$

Après cette opération de filtrage, seuls les spots ayant un score de 2 sont conservés.

### VII.3.2.2 Normalisation

Son but est de minimiser les biais expérimentaux ainsi que les variations dues aux échantillons biologiques. Cette étape est aussi importante pour relativiser le signal du CY5 plus fort que celui du CY3 et les différences entre ces deux cyanines dues à l'encombrement stérique. Même si le « scan » permet un équilibrage, il faut impérativement que la somme des intensités de CY3 soit égale à celle des intensités de CY5.

Cette normalisation s'effectue par rapport à des gènes invariants. Pour sélectionner ces derniers, dans le programme MADSCAN, une adaptation de la méthode des rangs invariants développés par Tseng *et al* en 2001 est utilisée. Puis, une méthode de régression non linéaire, le « lowess fitness » (locally weighted scatterplot smoothing), est appliquée aux gènes invariants dans le but de calculer un coefficient de normalisation. Cette dernière tient compte de l'intensité des signaux. Cette correction est ensuite utilisée pour normaliser la totalité des spots de la puce. On peut calculer pour chaque spot le rapport normalisé, Rnorm. Cleveland et Devlin en 2001 ont implanté la « fonction lowess » pour améliorer la visualisation des données. Cette méthode permet de mieux séparer les données sur le graphe.

$$\boxed{\text{Log2 CY5/CY3}}$$

### VII.3.2.3 Validation statistique

Cette étape nécessite d'avoir au minimum 3 puces pour corriger, détecter les biais et évaluer la cohérence des réplicats dans une et entre différentes puces. Nous n'avons réalisé qu'une seule puce, cette étape n'a donc pas été réalisée.

## **VIII. Patch clamp**

### **VIII.1 Principe**

Le patch clamp est l'approche expérimentale qui permet de mesurer, en condition de potentiel imposé, le courant engendré par le passage des ions au travers de canaux ioniques présents dans les membranes biologiques. Cette technique fut introduite par Neher et Sackmann en 1976 et décrite dans sa forme améliorée par Hamill *et al* 1981. La loi d'ohm ( $U = RI$ ) est le support théorique de cette technique. Il existe différents types de configuration. Dans notre étude, les cellules cardiaques issues de la différenciation des cellules ES maintenues en culture de 3 jours à 1 mois, sont enregistrées en configuration cellule entière à 25°C. Celle-ci permet l'enregistrement du courant traversant les canaux de l'ensemble de la membrane cellulaire. Le courant mesuré est la somme de ces courants unitaires.

Les boîtes de Pétri contenant nos cellules cardiaques sont placées sur la platine d'un microscope et le milieu extracellulaire est remplacé par une solution physiologique de type Tyrode. Une pipette en borosilicate de verre remplie du milieu intrapipette, est accolée à la surface de la membrane de la cellule et isole un fragment de celle-ci « patch ». Une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette augmente le contact de la membrane de la cellule et l'orifice de la pipette. La résistance va s'accroître pour atteindre des valeurs de l'ordre du gigaohm. Ce contact est appelé gigaseal. Cette grande résistance assure l'isolement électrique de la membrane. La pipette étant remplie d'une solution saline, elle permet l'enregistrement des courants générés par les ions transitant au travers des canaux contenus dans le morceau de membrane. Une aspiration permet de casser le morceau de membrane et d'assurer un contact avec le milieu intrapipette. Les courants ioniques sont enregistrés et l'ensemble des données est stocké sur un ordinateur via un programme d'acquisition et de traitement des données (Acquis).

### **VIII.2 Matériels et solutions utilisées**

#### **- Les pipettes de patch clamp**

Les pipettes sont réalisées à l'aide d'une étireuse verticale « Model P30, Sutter instrument et CO » à partir d'un capillaire de verre dur de borosilicate de 1,5 mm de

diamètre externe. Un premier chauffage permet d'étirer le capillaire en son centre, puis un second le rompt. Les pipettes obtenues ont une résistance d'environ 2-4 mégaohm.

Composition des solutions :

- milieu extrapipette

NaCl	145 mM
KCl	4 mM
HEPES	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	5 mM

**Tableau VII: Composition du milieu extrapipette**

- milieu intrapipette

K aspartate	130 mM
NaCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,04 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
GTP	0,1 mM
ATP Na <sup>+</sup> <sub>2</sub>	2 mM
Phosphocréatine	6,6 mM

**Tableau VIII: Composition du milieu intrapipette**

L'ATP permet de bloquer l'activation des canaux K<sub>ATP</sub>, et la phosphocréatine de recycler l'ATP.

## **IX. Induction des ES et des cellules cardiaques dérivées des ES**

Afin de voir s'il est possible d'orienter la différenciation des cellules ES ou de cardiomyocytes dérivés de ces cellules et isolés à un stade précoce de la différenciation, des cocultures avec des cellules cardiaques néonatales ont été réalisées.

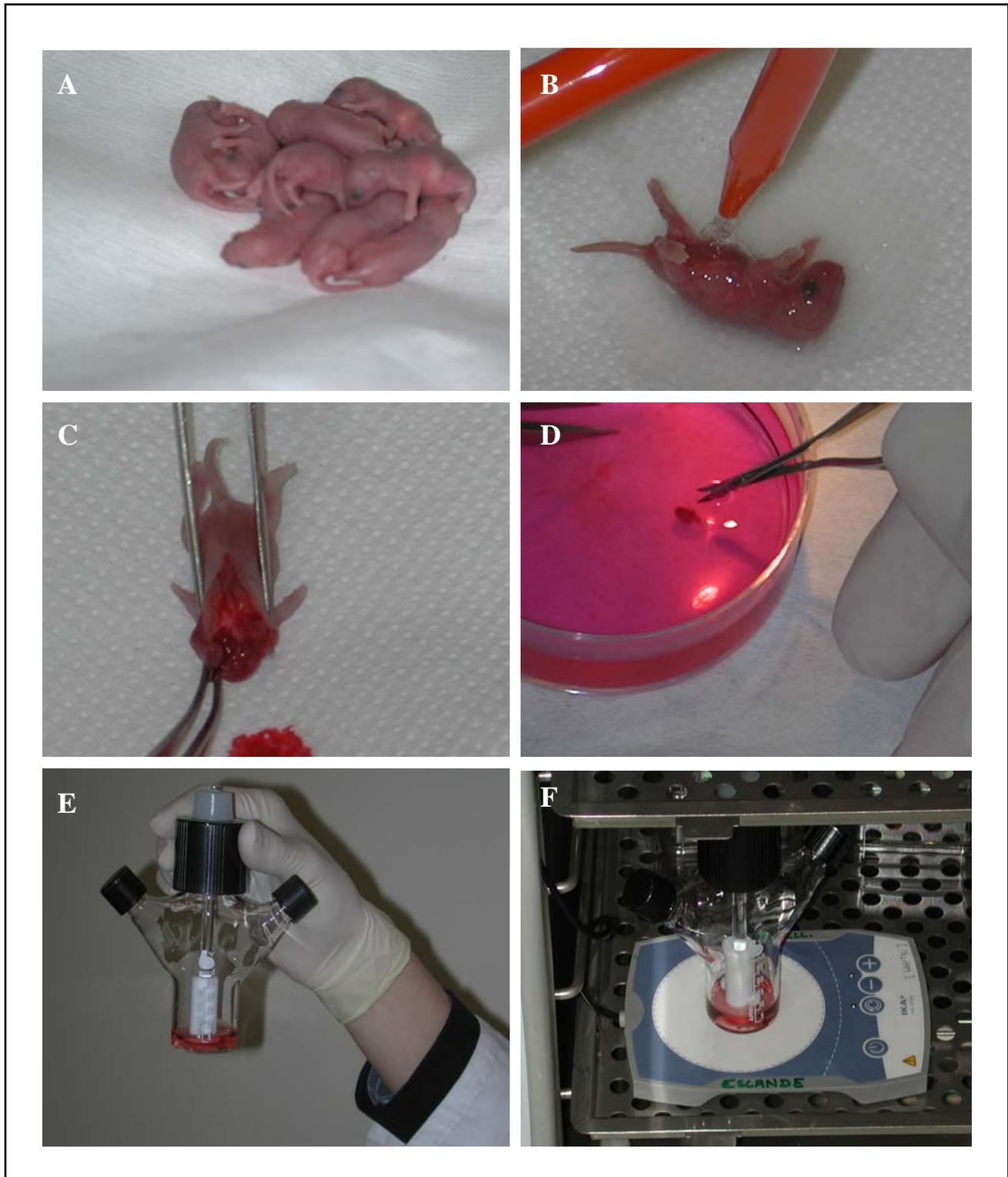
## **IX.1 Obtention des cellules néonatales**

Des souriceaux nouveau-nés de catégorie C57Bl âgés de 1 à 3 jours sont sacrifiés. Dans cette fenêtre de temps, les cellules cardiaques sont peu différenciées et sont plus faciles à dissocier. Au-delà, la technique de perfusion des cœurs est utilisée. Les cœurs sont prélevés et nettoyés dans du DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium). Puis, les oreillettes et les ventricules sont séparés dans du HBSS (milieu de Hanks sans calcium et magnésium, Invitrogen) froid et transvasés dans une boîte de Pétri de 35 mm. Le froid permet de diminuer l'activité contractile et la consommation d'ATP. Les oreillettes et les ventricules sont coupés en morceaux avec des ciseaux dans le HBSS (figure 43). Le surnageant est retiré et 2 ml de trypsine diluée au  $\frac{1}{4}$  sont ajoutés, afin d'éliminer les cellules abîmées. La trypsine est éliminée et remplacée par 3 ml de solution enzymatique composée de collagénase de type II (1 mg/ml) et de pancréatine (170  $\mu$ g/ml). Les cellules sont déposées dans une fiole Dubelcco avec un agitateur situé dans le haut de la fiole (figure 43). Ceci permet de ne pas abîmer les cellules. Cette fiole est placée dans l'incubateur à 37°C pendant 15 min. A la fin de ce premier cycle, les produits de digestion sont récupérés et l'action de la solution enzymatique est arrêtée avec 1 ml de sérum de veau foetal. Cinq à six cycles sont nécessaires pour digérer les morceaux de tissu et les produits de digestion sont récupérés de la même façon après chaque cycle. Ces derniers sont ensuite « poolés » et centrifugés 5 min à 1000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du milieu composé de DMEM à 4,5 g/l de glucose, sérum de cheval (Invitrogen, 10%), de sérum de veau foetal (Hyclone, 5%) et de pénicilline/streptomycine. Afin d'éliminer les fibroblastes, les cellules sontensemencées dans une boîte de Pétri pendant 1h. Le surnageant dépourvu de fibroblastes est récupéré et les cellules sont comptées sur cellule de Malassez. Les oreillettes et les ventricules néonataux sontensemencés à raison de 100 000 cellules/puits dans des plaques 24 puits contenant des lamelles de verre recouvertes de laminine (10  $\mu$ g/ml). Vingt quatre heures après ensemencement, 80% des cellules ont adhéré au support et les cellules ventriculaires commencent à battre. Les cellules sont utilisées 48h après dissociation.

## **IX.2 Marquage des cellules cardiaques dérivées des ES**

Le marquage des cellules cardiaques est réalisé à partir du « kit Vybrant CFDA-SE cell tracer » (molecular probes). Ce dernier contient du carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) qui diffuse passivement dans les cellules. Sa fluorescence n'est exprimée que lors du clivage de son groupe acétate par les estérases intracellulaires. Ce composé devient une amine réactive carboxyfluoresceine succinimidyl ester qui va réagir avec les amines intracellulaires et constituer un conjugué fluorescent retenu au sein de la cellule. Ce marquage présente l'avantage de ne pas être transféré aux cellules adjacentes. Son spectre d'excitation est de 492 nm et celui d'émission se situe autour de 517 nm après hydrolyse.

Après isolement sur gradient de Percoll, les cellules cardiaques dérivées des ES sont suspendues dans du PBS (Phosphate Buffered Solution) préchauffé à 37°C, contenant la sonde (CFDA-SE) à 10 µM et incubées 15 min à 37°C. Ces cellules sont ensuite centrifugées à 1000 tours/min et le culot est suspendu dans du milieu de différenciation. Afin de s'assurer une complète hydrolyse de la sonde par les estérases, les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 min. Une centrifugation permet d'éliminer l'excès de sonde n'ayant pas réagi avec les amines. Les cellules sont reprises dans un volume adéquat de milieu de différenciation, comptées sur cellule de Malassez, puisensemencées sur des oreillettes ou des ventricules néonataux. Cette culture dure de 3 à 4 jours. Les cellules sont fixées et marquées avec des anticorps dirigés contre  $\alpha$ -actinine, MLC2v, ou la connexine 43 selon les dilutions décrites dans le paragraphe V.



**Figure 43: Premières étapes de dissociation des cœurs de souris.** Des souris nouveau-nés de catégorie C57Bl âgés de 1 jour après la naissance (A) sont nettoyés à l'alcool (B) avant d'être décapités. Le cœur retiré de la cage thoracique (C) et placé dans du milieu HBSS froid (D), puis les oreillettes et les ventricules sont séparés. Ces tissus sont repris dans une solution enzymatique composée de pancréatine et de collagénase de type II, introduits dans une fiole de Dubelcco (E), puis placés dans un incubateur pendant 15 min correspondant au premier cycle de digestion (F)

## **RESULTATS et DISCUSSION**

## **Partie 1**

### **Profil d'expression des canaux ioniques dans les cardiomyocytes dérivés des cellules ES**

Les cardiomyocytes dérivés des cellules ES à des stades tardifs présentent les caractéristiques « génotypiques » et fonctionnelles des cellules de type pacemaker, atrial et ventriculaire (Maltsev *et al.*, 1993 ; Boheler *et al.*, 2002). Au cours de la différenciation des cellules ES, les protéines spécifiques du cœur, les récepteurs et les canaux ioniques sont exprimés de la même façon que lors de la cardiogénèse (Maltsev *et al.*, 1994, van Kempen *et al.*, 2003, Boheler *et al.*, 2002). Un certain nombre de travaux se sont intéressés d'une part, à l'étude « génotypique » et fonctionnelle de quelques courants ioniques et d'autre part au phénotype des cellules cardiaques au cours de la différenciation des cellules ES (White and Claycomb, 2005 ; Van Kempen *et al.*, 2003 ; Matsev *et al.*, 1994 ; Gassanov *et al.*, 2004 ; Kolossov *et al.*, 2005). Dans ces travaux, le phénotype des cellules cardiaques a été déterminé par des immunomarquages en utilisant des anticorps dirigés contre l' $\alpha$ -actinine cardiaque, la chaîne légère de la myosine de type ventriculaire (MLC-2v) et la chaîne lourde de la myosine (MHC) (Maltsev *et al.*, 1994., Wobus *et al.*, 1997). Le profil « génotypique » de ces cardiomyocytes s'est limité aux gènes codant pour quelques canaux ioniques tels que HCN, canaux responsables du courant de pacemaker  $I_f$ , Cav 1.2 et 1.3, canaux portant le courant calcique de type L, Kir 2.1 responsable du courant  $I_{K1}$ , Kir 3.1 portant le courant potassique activé par l'acétylcholine  $I_{K_{Ach}}$ , et le canal Nav1.5 responsable du courant  $I_{Na}$ . De plus, quelques gènes codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique telles que SERCA2 et les canaux ryanodines ont également été étudiés (White et Claycomb, 2005). Cependant, ces travaux correspondent à une infime partie des canaux impliqués dans l'activité électrique cardiaque et des protéines impliquées dans le couplage excitation/contraction.

Notre étude avait pour but de (1) caractériser par RT-PCR semi-quantitative à haut débit, les profils d'expression des cellules ES, des EBs et des cardiomyocytes dérivés des cellules ES à différents stades de la différenciation, et de comparer ces derniers avec des cardiomyocytes obtenus dans les myocards embryonnaire et néonatal. (2) d'établir les profils électrophysiologiques et phénotypiques des cellules cardiaques dérivées des ES.

## I. Les cellules ES

Les cellules ES murines R1 sont cultivées sur des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inactivés par la mitomycine C. L'utilisation de la capacité d'adhésion différentielle des cellules ES et des MEFs, nous a permis de s'affranchir des fibroblastes embryonnaires et d'obtenir une population de cellules ES pures. Après extraction de l'ARN de ces cellules, une RT-PCR semi-quantitative est effectuée en utilisant la technique des « microfluidic cards » comme décrite dans la section Matériels et Méthodes paragraphe VI.

Parmi les 96 gènes analysés et référencés dans l'annexe I, 14 gènes sont exprimés dans les cellules ES à des niveaux variables (figure 44). Ils se répartissent en fonction de leur niveau d'expression : 5 gènes fortement exprimés et 9 gènes faiblement exprimés.

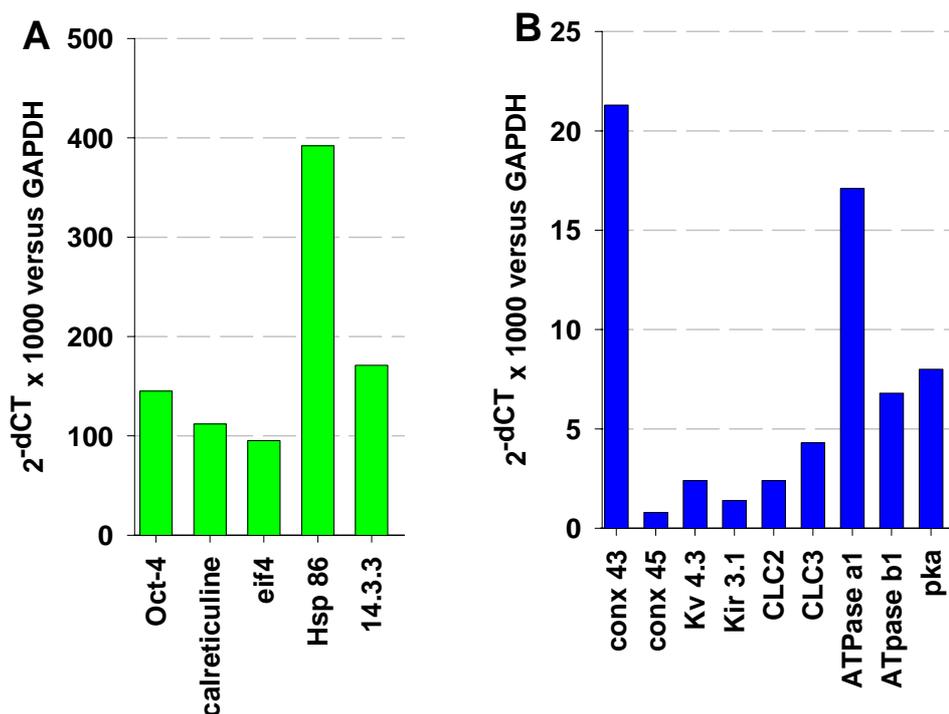


Figure 44: Profil d'expression des cellules ES

- Gènes fortement exprimés :

Parmi eux, le gène pou5f1 codant pour le facteur de transcription Oct-4, intervenant dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES, est exprimé (figure 44 A). Les

4 autres gènes codent pour la calreticuline, la protéine 14.3.3, le facteur d'élongation Eif4, et la protéine Hsp86.

Pour ces différentes protéines, peu de données sont disponibles concernant leur rôle dans les cellules ES. Cependant, la calreticuline a été identifiée dans deux approches protéomiques, dans les lignées de cellules ES murines D3 et R1 (Kurisaki *et al.*, 2005, Elliott *et al.*, 2004). Parmi toutes les fonctions qu'exerce cette protéine dans différents types cellulaires, elle est principalement impliquée dans : 1) la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire, 2) la conformation des protéines et 3) la régulation du cycle cellulaire où en inhibant la traduction de p21, elle favorise la croissance cellulaire (pour revue, Michalak *et al.*, 1999 ; Iakova *et al.*, 2004). Par des approches protéomiques similaires, ont été également identifiées différentes « heat shock proteins » (HSPs). Celles-ci interviennent dans de nombreuses fonctions telles que la conformation, l'assemblage et le transport des protéines et peuvent être également impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire (pour revue, Arrigo, 2005 ; Perchan *et al.*, 1991). En ce qui concerne la protéine 14.3.3, différentes isoformes ont été mises en évidence dans la lignée de cellules ES murines R1, sans pour autant que leurs fonctions aient été clairement établies dans ce type cellulaire (Elliott *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré que ces protéines assurent de nombreuses fonctions telles que la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, l'oncogénèse et la biosynthèse de la dopamine (Morrison, 1994). Dans les cellules carcinomiales F9, l'isoforme bêta a été démontrée pour réguler la voie des MAPKs en intervenant avec Raf1. Dans cette même lignée, elle joue également un rôle dans l'induction de la différenciation de ces cellules par l'acide rétinoïque (Takahara *et al.*, 2000).

- Gènes faiblement exprimés

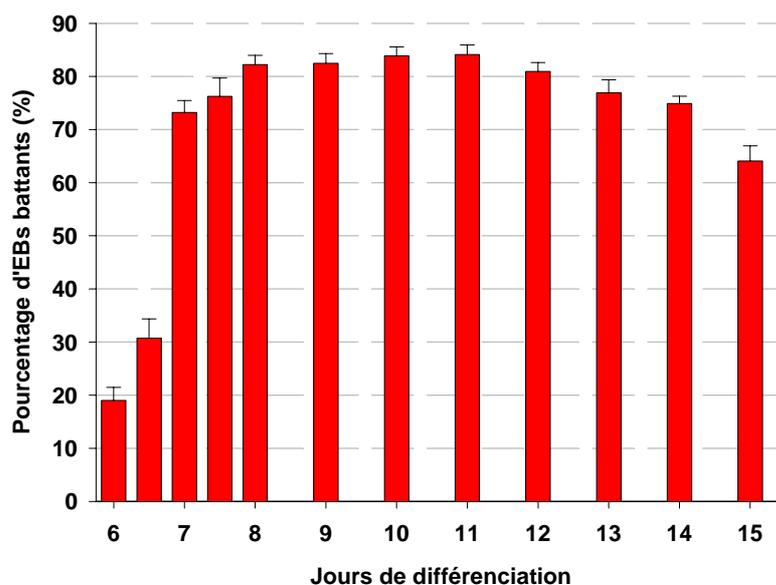
Parmi les 9 gènes moins exprimés (figure 44 B), on peut noter les connexines 43 et 45, la connexine 43 étant la forme prédominante dans les cellules ES. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Oyamada *et al* en 1996. D'autre part, les deux sous-unités a1 et b1 de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase sont également observées. Enfin, les canaux ioniques transmembranaires : Kv4.3, Kir 3.1, dont les protéines canal sont

responsables respectivement du courant transitoire sortant,  $I_{to}$  et du courant potassique activé par l'acétylcholine,  $I_{K_{ACh}}$  sont observés.

## II. Les EBs à 11 jours de différenciation

### II.1 Paramètres de la différenciation

La différenciation est initiée selon la technique de la culture en gouttes pendantes (Maltsev *et al.*, 1993), décrite dans la section Matériels et Méthodes paragraphe II. Les premières cellules battantes sont observées 6 jours après l'initiation de la différenciation et correspondent à des foyers de trois à cinq cellules. Ces derniers augmentent en nombre et en taille au cours de la différenciation. Comme le montre la figure 45, le nombre d'EBs battants croît avec le temps de différenciation. Il atteint un maximum à 11 jours, celui-ci correspondant à 86% de la totalité des EBs battants.



**Figure 45 : Evolution du pourcentage d'EBs battants en fonction du temps.** Les valeurs sont exprimées +/- SEM avec n=14 différenciations soit 4500 EBs répertoriés.

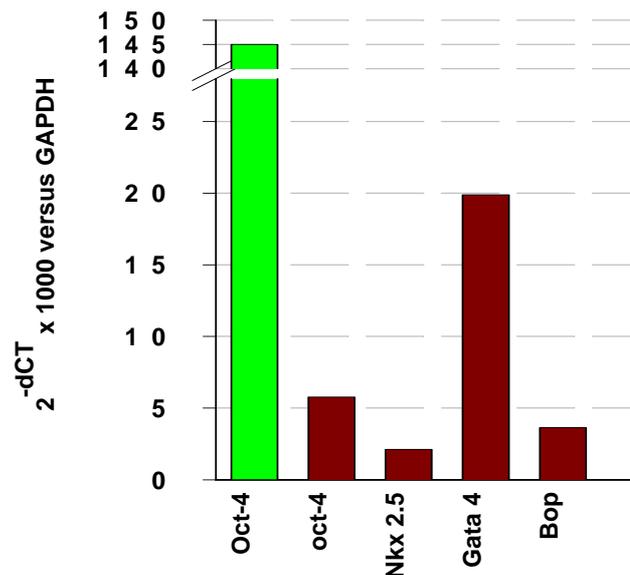
### II.2 Profil d'expression des EBs à 11 jours de différenciation

Celui-ci a été réalisé à partir d'ARN extrait de 200 EBs à 11 jours de différenciation

#### II.2.1 Facteurs de transcription

L'induction de la différenciation conduit à une diminution drastique de l'expression d'Oct-4 (figure 46). Le faible pourcentage d'expression restant (3,4 %) reflète les cellules non différenciées subsistant dans les corps embryoïdes, et non une expression

dans les cellules cardiaques. En effet, il a été clairement démontré et nous l'avons vérifié, que ce facteur de transcription n'est plus exprimé dans les cellules cardiaques (non illustré). Nkx2.5, marqueur le plus précoce de la différenciation cardiaque (Komura et Izumo, 1993 ; Harvey *et al.*, 1996), est observé dans ces préparations de même que GATA 4. Ce dernier est connu pour agir sur MEF2c, qui lui-même active Bop, un facteur de transcription intervenant dans la différenciation musculaire (Hwang et Gottlieb, 1995) (figure 46).



**Figure 46: Profil d'expression des facteurs de transcription dans les EBs à 11 jours de différenciation.** En vert, rappel du niveau d'expression d'Oct-4 dans les cellules ES, en marron niveau d'expression de Oct-4, Nkx2.5, Gata 4, Bop dans les EBs.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Komuro et Izumo en 1993 et Von Both *et al* en 2004. Cependant, le niveau d'expression du gène codant pour GATA 4 est plus exprimé que celui de Nkx2.5. Au cours de l'embryogénèse, GATA 4 est synthétisé par l'endoderme et sa libération induit la différenciation cardiomyocytaire. Ceci est concomitant à l'apparition de l'expression de Nkx2.5 dans ces cellules cardiaques. C'est seulement ensuite que GATA 4 est également exprimé dans les cellules cardiaques. Ce que nous observons, correspond donc aussi bien à GATA 4 endodermique que cardiaque.

## II.2.2 Les canaux ioniques

Parmi ces canaux ioniques, les sous-unités  $\alpha$  des canaux calciques et leurs sous-unités régulatrices sont fortement représentées. Les gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  Cav3.1, et Cav 3.2 responsables du courant  $I_{CaT}$ , sont les plus fortement exprimés. Les gènes codant pour le canal Kir 2.1, responsables, dans les cardiomyocytes adultes, du courant  $I_{K1}$  connu pour sa forte contribution au maintien du potentiel de repos et Kir 6.1 portant le courant  $I_{KATP}$ , sont également exprimés ; à l'inverse Nav 1.5 responsable du courant sodique cardiaque est faiblement exprimé. HCN4 portant le courant  $I_f$  impliqué dans la dépolarisation diastolique des cellules automatiques est l'isoforme la plus exprimée parmi les 4 présentes. Par ailleurs, le gène codant pour la connexine 43 est le plus fortement exprimé des 3 isoformes de connexines analysées (figure 47).

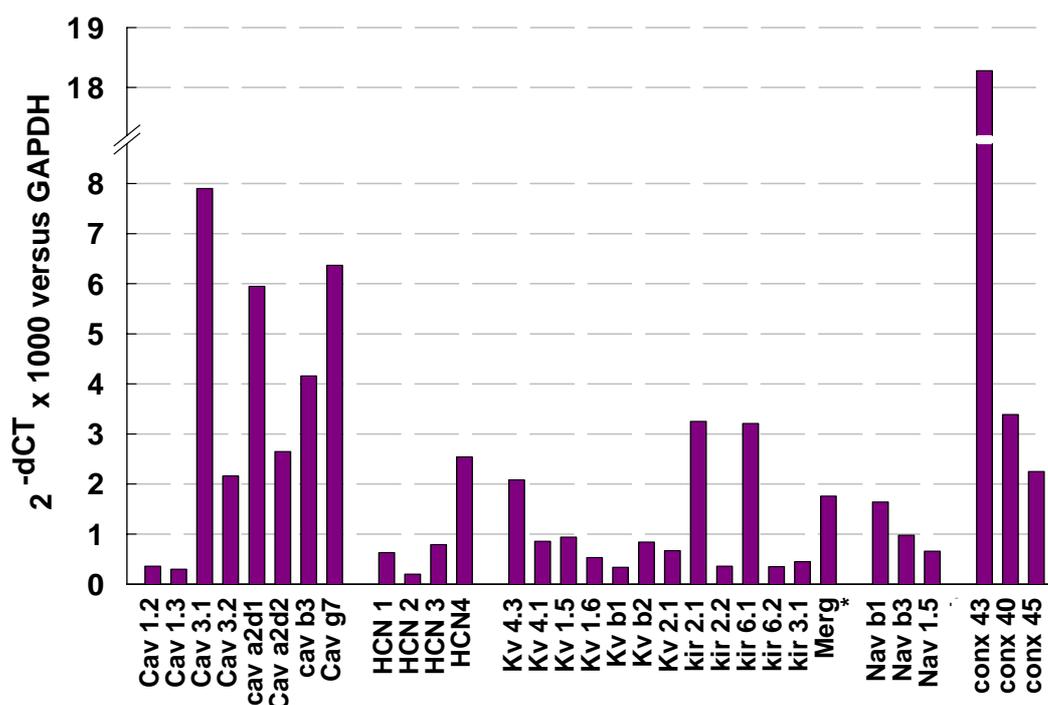


Figure 47: Profil d'expression des canaux ioniques transmembranaires dans les EBs

Ce profil nous indique que les principaux canaux ioniques cardiaques sont présents dans les corps embryoïdes. Néanmoins, l'expression de ces canaux n'est pas limitée aux seules cellules progénitrices cardiaques. Ces gènes peuvent être exprimés dans les cellules dérivées des autres types de feuilletts embryonnaires. Le niveau d'expression faible du gène codant pour le canal HCN3 (canal localisé dans les cellules neuronales)

peut suggérer la présence de précurseurs de cellules neuronales à ce stade. Ainsi, le niveau d'expression d'un gène donné dans un type cellulaire donné ne peut être que sous-estimé par rapport à son réel taux d'expression, du fait, d'éventuelles expressions dans d'autres types cellulaires, présents dans les EBs.

C'est pourquoi nous avons isolé les cardiomyocytes des EBs, et réalisé le profil d'expression des gènes à partir des ARNs extraits de ces cellules.

### III. Les cellules cardiaques dérivées des cellules ES

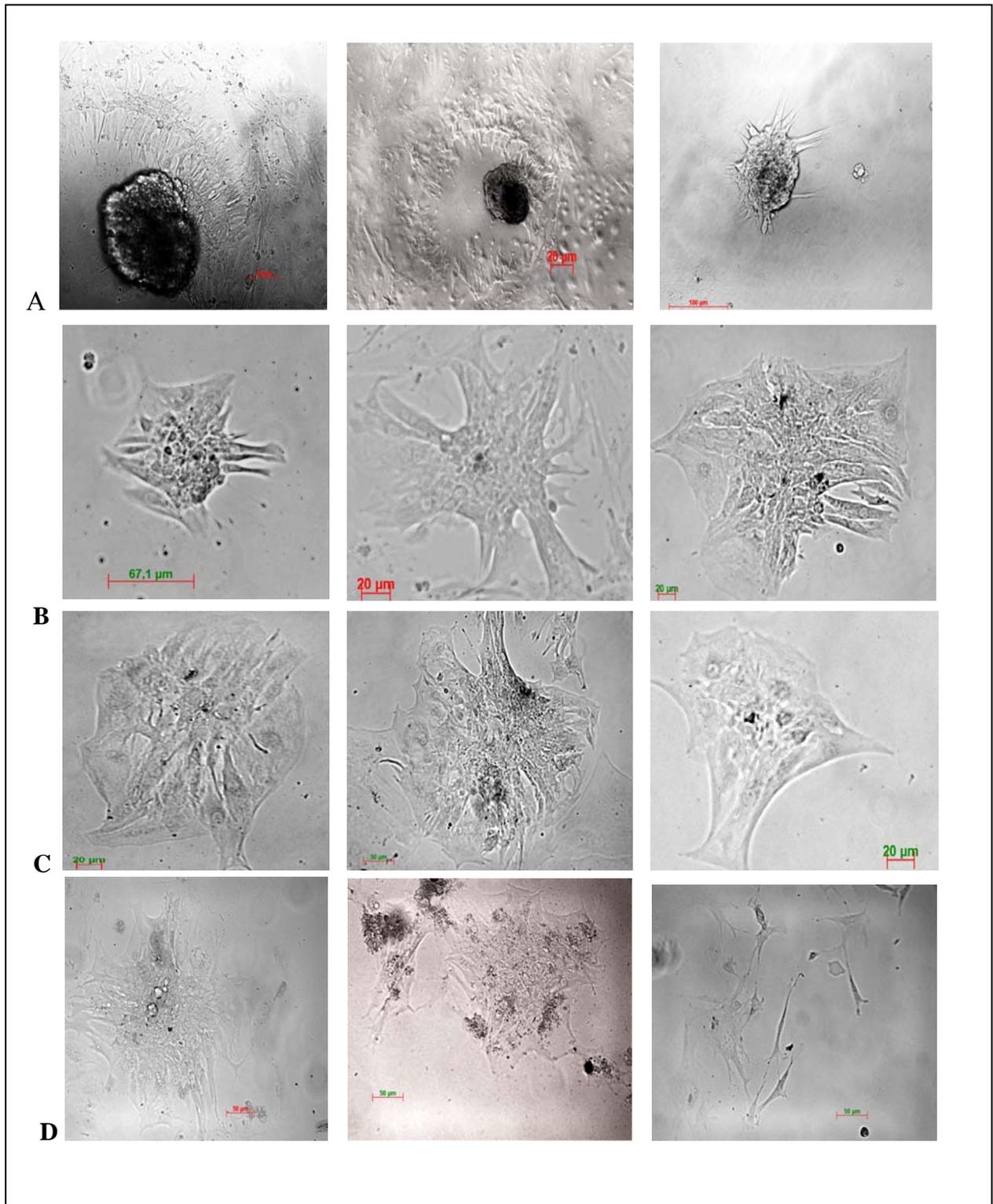
Les profils d'expression génomique des cardiomyocytes isolés à 10,5, 11 ou 15 jours de différenciation et cultivés pendant trois jours sont analysés. Ces profils sont comparés à ceux des cœurs d'embryons de 13,5 jours post-coïtum, de cardiomyocytes atriaux et ventriculaires néonataux (de 2 jours). Le profil électrophysiologique et le phénotype des cardiomyocytes isolés des EBs et maintenus pendant 3 jours, sont également étudiés, afin de pouvoir établir une relation entre les immunomarquages et les expressions des gènes réalisés dans ces mêmes conditions.

#### III.1 Obtention des cellules cardiaques

Les EBs sont dissociés par action enzymatique et sont purifiés sur gradient de Percoll, après 11 ou 15 jours de différenciation. Le nombre moyen de cellules cardiaques obtenu est résumé dans le tableau suivant :

	11 jours de différenciation	15 jours de différenciation
Nombre total de cellules cardiaques	600 000 ± 75,6	1,5 .10 <sup>6</sup> ± 1.10-3
Nombre de cellules cardiaques/EB	2 900 ± 165	3 372 ± 240
Rendement	3%	3%

**Tableau VIII: Nombre de cellules cardiaques obtenu à 11 jours et 15 jours de différenciation.** Les valeurs sont exprimées ± SEM avec n=14 différenciations pour les 11 jours de différenciation et n=10 pour les 15 jours de différenciation



**Figure 48: Photos en contraste de phase de différents types de « clusters » cardiaques isolés d'EBs après 11 ou 15 jours de différenciation. 24h après dissociation (A) et cultivés pendant 3 jours (B) ou 12 jours en culture (C). Cellules cardiaques isolées d'EBs après 15 jours de différenciation et cultivées pendant 3 jours (D).**

Les cellules cardiaques obtenues à 11 et 15 jours de différenciation sont cultivées sur des boîtes de Pétri traitées à la laminine pendant 3 jours. Vingt heures après ensemencement, les cardiomyocytes isolés de corps embryoïdes à 11 jours de différenciation se présentent sous forme de petits « clusters » ronds et compacts, battant spontanément (figure 48). Le lendemain, les cellules situées sous ces « clusters » s'organisent en structure rayonnante permettant l'ancrage des « clusters » sur la laminine (figure 48 A). Au bout de trois jours de culture, les « clusters » s'étalent tout en maintenant leur activité contractile. Cette dernière peut être conservée 3 semaines à 1 mois. Les cellules cardiaques prolifèrent pendant les trois premiers jours de culture, puis la taille des foyers se stabilise (figure 48 B et C). A 15 jours de différenciation, les cellules cardiaques présentent plusieurs types de formes : des « clusters » de cellules cardiaques battant spontanément, décrits plus haut et des cellules plus longilignes présentant ou non une activité contractile (figure 48 D).

### **III.2 Etude du profil électrophysiologique**

Les cardiomyocytes isolés à 11 et 15 jours de différenciation et maintenus pendant 3 jours en culture présentent différents profils électrophysiologiques. Les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation montrent un profil similaire à celui décrit pour des potentiels d'action de type nodal. Ces PA présentent une phase de dépolarisation lente diastolique, une valeur maximum du potentiel diastolique ( $E_{m \text{ Max}}$ ) de -55 mV, et une fréquence moyenne de 50 battements/min.

A l'inverse, les cardiomyocytes isolés à 15 jours montrent un profil hétérogène. En effet, au sein d'un même « cluster », ces cellules présentent des PA qui diffèrent principalement par la valeur de leur potentiel de repos membranaire. Des petites cellules rondes, situées au centre du « cluster », ont une activité spontanée et un  $E_{m \text{ Max}}$  de -45 mV. La présence de cette dépolarisation diastolique permet au potentiel membranaire d'atteindre une valeur de -31 mV correspondant au potentiel seuil d'activation (Take off potential) du PA émis. Dans ce cas, la fréquence des PA est de 0,5 Hz (à température ambiante, 22-25°C). Dans les cellules allongées et situées à la périphérie du « cluster » cardiaque, l'activité spontanée est maintenue et l'on note également la présence d'une dépolarisation diastolique. Dans ces cellules,  $E_{m \text{ Max}}$  est

égal à -75 mV, le « Take off potential » varie entre -60mV et -65 mV et la fréquence des PA est de 0,3 à 0,5 Hz (à 22°C –25°C) (figure 2 de l'article)

Ces observations suggèrent que dans des cultures de cardiomyocytes isolés à 15 jours de différenciation nous avons une hétérogénéité des caractéristiques électrophysiologiques portant sur la valeur maximale du potentiel diastolique et sur la valeur du seuil d'émission du PA. A l'inverse, la durée ne semble pas être affectée de manière importante au sein d'un même « cluster ». Ces résultats suggèrent une hétérogénéité des courants impliqués dans le déterminisme du potentiel diastolique ( $I_{K1}$ ,  $I_f$  et d'autres) et/ou une variabilité de l'amplitude ou de l'activation d'un ou de plusieurs de ces courants. Ceci pourrait correspondre en partie à l'hétérogénéité électrophysiologique souvent décrite dans les cardiomyocytes isolés, issus de la différenciation *in vitro* de cellules ES à ce stade. Par ailleurs, ces résultats sont très similaires à ceux décrits dans le noeud sino-atrial, où un gradient du potentiel diastolique est constaté, du centre de l'automatisme vers la périphérie. Le potentiel diastolique a une valeur d'autant plus négative que l'on s'éloigne de ce centre tout en conservant une dépolarisation diastolique (Boyett *et al.*, 2000).

### **III.3 Caractérisation phénotypique des cellules cardiaques**

Les cardiomyocytes isolés à 11 et 15 jours de différenciation et cultivés pendant 3 jours présentent une variabilité phénotypique. Les anticorps dirigés contre les principales protéines du cytosquelette et celles impliquées dans la contraction cardiaque mettent en évidence cette hétérogénéité.

Dans un premier temps, le marquage des cellules cardiaques isolées à 11 ou 15 jours de différenciation et cultivées pendant 3 jours, avec  $\alpha$ -actinine cardiaque, montre que cette protéine s'organise en un réseau sarcomérique typique des cellules cardiaques. Ces résultats confirment d'une part, qu'il s'agit de cellules cardiaques, et d'autre part que cette protéine est fortement exprimée dans les cellules isolées à 11 jours de différenciation (figures 3,4,5 de l'article).

Le marquage de la chaîne lourde de la myosine de type bêta ( $\beta$ -MHC) dans des cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation montre une répartition hétérogène de cette protéine et un début d'organisation sarcomérique dans la plupart des cellules.

Toutefois, certaines cellules présentent une striation sarcomérique très dense comparable aux cardiomyocytes isolés à 15 jours de différenciation. Ces résultats montrent d'une part une variabilité du profil phénotypique et d'autre part, préfigurent une orientation de la différenciation cardiaque entre 11 et 15 jours vers un phénotype contractile. Cette observation se confirme avec les marquages réalisés avec un anticorps dirigé contre la chaîne légère de la myosine de type atrial (MLC-2a) et ventriculaire (MLC-2v). Dans les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation, MLC-2a présente une répartition hétérogène et une absence ou un début d'organisation structurée en sarcomères dans les « clusters » de cellules cardiaques. A l'inverse, dans les cardiomyocytes isolés à 15 jours, une striation dense sarcomérique est observée dans tous les « clusters » cardiaques. Ce résultat suggère une orientation de la différenciation de ces cardiomyocytes vers un type contractile atrial. Cette observation se confirme avec le marquage MLC-2v dans ces cellules. Quelques cellules présentent un réseau de filaments avec une organisation sarcomérique ; à l'inverse, aucun marquage n'a pu être détecté dans les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation.

Par ailleurs, le marquage de ces deux types cellulaires avec un anticorps dirigé contre la protéine SERCA2, impliquée dans le repompage du calcium, montre que dans les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation et cultivés pendant 3 jours, la localisation de cette protéine est périnucléaire. A l'inverse, dans les cardiomyocytes isolés à 15 jours de différenciation et cultivés pendant 3 jours, un début d'organisation est observé. Cependant, ces données suggèrent que les tubules transverses du réticulum sarcoplasmique ne sont pas organisés comme dans le myocarde adulte, où la localisation est au niveau des stries Z. Cette structure tubulaire est indistincte dans les cellules embryonnaires.

Ces marquages montrent une hétérogénéité des populations cellulaires existant au sein des « clusters » de cellules cardiaques et sont en accord avec ce qui a été décrit lors de la différenciation des cellules ES (Maltsev *et al.*, 1994). Le profil électrophysiologique et ces observations tendent à montrer que les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation présentent un profil « pacemaker-like » atrial. Le marquage avec des anticorps dirigés contre les connexines confirme cette hypothèse. En effet, la

connexine 43, présente dans les cellules de type contractile, est détectée à la membrane ; à l'inverse les connexines 40, connues pour être présentes dans le tissu conducteur et la connexine 45 ayant été identifiée dans le nœud sino-atrial (Alcoléa *et al.*, 1999) ont une localisation périnucléaire, et sont peu nombreuses à la membrane. Les cardiomyocytes isolés à 15 jours ont un profil de type atrial, comme le montre l'immunomarquage MLC-2a. L'analyse du profil « génotypique » de ces cellules nous permettra de rendre compte et de confirmer ces observations.

### **III.4 Analyse du profil « génotypique » des cellules cardiaques**

Le profil d'expression, des cellules cardiaques isolées à 10,5, 11 et 15 jours de différenciation est étudié, ainsi que celui des cellules cardiaques cultivées pendant 3 jours. Une comparaison avec des cœurs d'embryons de 13,5 jours et des cardiomyocytes néonataux ventriculaires et atriaux est également appréhendée.

#### **III.4.1 Les facteurs de transcription**

Le facteur de transcription cardiaque Nkx2.5 est fortement exprimé et son niveau d'expression augmente progressivement au cours de la différenciation et lors du maintien en culture. Le niveau d'expression du facteur de transcription Tbx5 s'accroît entre 10,5 et 11 jours, puis demeure stable. Toutefois, ce facteur de transcription augmente transitoirement dans les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation et cultivés pendant 3 jours. Par ailleurs, le facteur de transcription Irx4, intervenant dans la formation des chambres cardiaques ventriculaires, est faiblement exprimé tout au long de la différenciation et de la mise en culture, suggérant que dans nos conditions, la différenciation ventriculaire n'est pas importante ou peut faire penser que celle-ci se fait à un stade plus tardif. Ceci n'a jamais été démontré, mais cependant, les résultats présentés dans la revue de Boheler en 2002, le suggèrent.

#### **III.4.2 Répertoire des protéines contractiles**

A 10,5 jours, les 4 formes de myosine : la chaîne légère de la myosine de type 1 atrial (MLC1a), de type ventriculaire (MLC-2v), et les formes  $\alpha$  et  $\beta$  de la chaîne lourde de la myosine ( $\alpha$ -MHC et  $\beta$ -MHC), sont exprimées à des niveaux équivalents. Cette observation est en accord avec ce qui a été décrit dans le tube cardiaque linéaire à 8 jours de développement chez la souris (Lyons *et al.*, 1990). Entre 10,5 et 11 jours et

lors de la mise en culture, MLC-1a est fortement accrue, suggérant une prédominance des cellules atriales à 11 jours de différenciation. A l'inverse, le niveau d'expression de MLC-2v reste inchangé entre ces deux stades, et augmente peu en comparaison de MLC-1a lors de la mise en culture. Ces observations renforcent l'hypothèse émise plus haut, du type atrial dominant. De plus, l'expression de  $\alpha$ -MHC est prédominante par rapport à celle de  $\beta$ -MHC à ce stade. Ce profil d'expression à 11 jours de différenciation est comparable à celui des cardiomyocytes atriaux néonataux où  $\alpha$ -MHC et MLC-1a sont les plus exprimées. A 15 jours de différenciation, le niveau d'expression de MLC-1a et de MLC-2v est identique. A ce stade, la prévalence du type atrial observé dans les cardiomyocytes à 11 jours, a disparu. Par ailleurs, l'expression de MLC-2v à tous les stades étudiés, est plus faible que celle observée dans des cœurs d'embryons de 13,5 jours. Ceci tend à montrer que dans nos conditions de culture, la différenciation ventriculaire semble réduite ou décalée dans le temps en comparaison de ce qui se passe *in vivo*.

### **III.4.3 Répertoire des canaux ioniques**

#### **III.4.3.1 Les canaux sodiques**

Dans les cardiomyocytes fraîchement isolés à 10,5, 11 et 15 jours de différenciation, les gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  Nav 1.5, et Nav 2.3 sont prédominants. La mise en culture entraîne une augmentation du niveau d'expression de Nav 1.5 et une diminution de celle de Nav 2.3. Par ailleurs, les sous-unités régulatrices nav $\beta$ 1 et 3 suivent l'accroissement de Nav 1.5 lors de la mise en culture, ce qui suggère une régulation de ce canal par ces sous-unités. L'expression prédominante de Nav 1.5 correspond à ce qui est observé pour les cœurs d'embryons à 13,5 jours et les cardiomyocytes néonataux.

#### **III.4.3.2 Les canaux calciques**

Les canaux Cav 3.1 et Cav 3.2 responsables du courant  $I_{CaT}$  sont largement prédominants. Toutefois, Cav 3.1 absent dans les cardiomyocytes à 10,5 jours de différenciation, n'apparaît qu'à 11 jours et augmente au cours de la différenciation et lors de la mise en culture. A l'inverse, Cav 3.2 suit une direction opposée. Parmi les canaux de type L, la sous-unité Cav 1.2 est prédominante et son expression augmente

au cours du temps. A l'inverse, le niveau d'expression de Cav 1.3 reste faible tout au long de la différenciation et de la mise en culture. Il est à noter que le niveau d'expression des canaux de type T est identique à celui des cœurs d'embryons de 13,5 jours et plus faible pour les canaux de type L. Toutes les sous-unités régulatrices s'accroissent lors de la différenciation et de la mise en culture. Toutefois, la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 est prédominante.

#### **III.4.3.3 Les canaux potassiques**

Les gènes sont faiblement exprimés et peu modifiés dans leur profil d'expression au cours de la différenciation et de la mise en culture. Le gène codant pour le canal Merg est fortement exprimé à 10,5 jours et durant le développement embryonnaire, suggérant le rôle de ce canal, responsable du courant  $I_{Kr}$ , dans la repolarisation des cardiomyocytes à ce stade. A l'inverse, le gène codant pour Kir2.1, canal portant le courant  $I_{K1}$  responsable du maintien du potentiel de repos dans les cœurs adultes, est faiblement exprimé dans les cardiomyocytes dérivés des cellules ES. Les canaux Kir 6.2, kir 3.1 et 3.4 responsables respectivement des courants  $I_{KATP}$  et  $I_{KACh}$ , sont exprimés dans les cardiomyocytes et augmentent au cours de la différenciation. Kir 3.1 et Kir 3.4 sont également présents dans les cellules cardiaques néonatales de type atrial. Parmi les sous-unités régulatrices, MIRP2 est prédominante à 10,5 jours, puis son niveau d'expression diminue, à des valeurs plus faibles que celui des cœurs d'embryons à 13,5 jours. A l'inverse, les gènes codant pour Kchip2, MIRP4 et mink apparaissent à 15 jours et sont fortement exprimés. La mise en culture ne modifie pas ce profil d'expression, à l'exception de Kir3.1, 3.4 et Kir6.1 dont les niveaux d'expression augmentent à 11 jours de différenciation. La modification la plus importante à 15 jours est l'accroissement de la sous-unité mink, conduisant probablement à une régulation importante du canal KvLQT1 et à la participation du courant  $I_{Ks}$  dans la repolarisation de nos cardiomyocytes à ce stade.

#### **III.4.3.4 Les canaux HCN**

Parmi les gènes codant pour les canaux HCN, HCN4 est prédominant à tous les stades de différenciation et croît lors de la mise en culture. Par ailleurs, son niveau d'expression est comparable à celui des cœurs d'embryons de 13,5 jours dans les stades précoces, puis à 15 jours de différenciation, à celui des cellules atriales

néonatales. L'expression d'HCN1 augmente transitoirement à 11 jours de différenciation, puis diminue. Son expression est également accrue lors de la mise en culture. Les niveaux d'expression de HCN2 et 3 ne sont pas modifiés au cours de la différenciation et de la culture. Dans les stades précoces, les transcrits de HCN1 et 4 sont prédominants et peuvent contribuer à l'activité de pacemaker ; à l'inverse, à 15 jours de différenciation, seul HCN4 semble concerné. L'isoforme HCN1 est prédominante dans le nœud sinusal adulte, et sa diminution n'est pas accompagnée d'une augmentation d'expression de HCN2, suggérant que la différenciation ventriculaire n'est pas importante dans nos conditions.

#### **III.4.3.5 Les connexines**

Trois connexines sont exprimées dans le cœur adulte : connexine 43, 40 et 45 et possèdent une régulation spatiotemporelle précise. Parmi elles, la connexine 43 est prédominante et son niveau d'expression est inchangé au cours de la différenciation, mais s'accroît au cours de la mise en culture. Les connexines 40 et 45 sont faiblement exprimées. Ce profil d'expression confirme ce qui a été observé lors des marquages.

#### **III.4.4 Protéines impliquées dans l'homéostasie calcique**

Le calcium joue un rôle clé lors de la contraction cardiaque, mais aussi dans l'initiation, la modulation de l'activité pacemaker et le décours du PA. Le niveau d'expression de SERCA2, ATPase impliquée dans le repompage du calcium intracellulaire, est détecté à 10,5 jours. Son expression augmente au cours de la différenciation, lors de la mise en culture, de même que dans les cœurs d'embryons à 13,5 jours et les cardiomyocytes néonataux. Le niveau d'expression du phospholamban, un régulateur de l'activité de cette ATPase, suit le même décours. L'expression de la calréticuline, protéine impliquée dans la séquestration du calcium et dans l'expression de différents gènes dont les facteurs de transcription cardiaque (Masaeli *et al.*, 1999), est détectée à 10,5 jours, puis augmente dans les stades suivants pour atteindre à 15 jours de différenciation un niveau identique à celui observé dans les cœurs d'embryons de 13,5 jours. A l'inverse, la calséquestrine, autre protéine impliquée dans la séquestration du calcium, est exprimée à partir de 11 jours et son expression s'accroît tout au long de la différenciation et jusqu'à la naissance. Les gènes codant pour le récepteur à la ryanodine de type 2, l'échangeur NCX1, et la

calmoduline augmentent régulièrement dans ces différentes conditions. Toutefois, il est à noter que les cardiomyocytes à 11 jours de différenciation mis en culture montrent une augmentation du niveau d'expression de ces gènes plus importante que celle observée dans les cardiomyocytes isolés à 15 jours.

## IV. Conclusion et Discussion

L'étude phénotypique, « génotypique » et électrophysiologique de ces cardiomyocytes dérivés des cellules ES, nous a permis d'une part, de mettre en lumière les régulations existant au niveau de l'expression des gènes entre les deux stades de différenciation et d'autre part de mettre en relation ces expressions avec le profil phénotypique et fonctionnel qui en découle.

- Pour les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation et mis en culture :
  - (1) le profil électrophysiologique montre une phase de dépolarisation diastolique et un potentiel de repos maximal identique à ceux décrits dans les cardiomyocytes de type nodal (Mangoni *et al.*, 2001). Dans les cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation et ceux cultivés pendant 3 jours, l'expression des gènes impliqués dans l'activité électrique cardiaque, va également dans ce sens. Parmi eux, les gènes codant pour les canaux HCN1 et HCN4 responsables du courant  $I_f$  sont les plus fortement exprimés à ce stade, en relation avec ce qui est décrit dans le nœud sinusal (Moorman *et al.*, 1998). Cette prédominance est maintenue lors de la mise en culture. Par ailleurs, les sous-unités  $\alpha$  Nav1.5 et Nav 2.3 sont faiblement exprimées à 11 jours de différenciation. Ces mêmes données ont été observées dans le nœud sinusal adulte (Marionneau *et al.*, 2005). Toutefois, l'expression de Nav 1.5 augmente de 4 fois lors de la mise en culture. De plus, les sous-unités régulatrices augmentent également. Néanmoins, dans ces résultats, manque la sous-unité régulatrice nav $\beta$ 2, décrite pour permettre une régulation du canal Nav1.5 (Catteral *et al.*, 2005). La valeur du potentiel de repos étant de -65 mV, la contribution de ce canal dans la phase de dépolarisation du PA ne peut être que faible, du fait des valeurs d'activation et d'inactivation de ce canal. Les canaux calciques de type T Cav 3.1 et Cav 3.2 sont fortement exprimés dans les cardiomyocytes fraîchement isolés, et s'accroissent lors de la mise en culture. La sous-unité Cav 3.2 est la plus exprimée à ce stade, et correspond à ce qui est décrit dans les stades précoces du développement embryonnaire (Niwa *et al.*, 2000).

Néanmoins, la prédominance de cette forme est perdue au cours de la culture. Ces canaux peuvent en partie participer au potentiel de dépolarisation diastolique en facilitant les effets de  $I_f$  et de  $I_{Na-Ca}$ . Les canaux calciques de type L, et plus particulièrement Cav 1.2 sont aussi présents et leurs expressions augmentent au cours de la culture. Ces canaux vont participer à la phase de dépolarisation du PA, lorsque le seuil d'émission sera atteint. La prédominance du canal Merg responsable du courant à rectification entrante,  $I_{Kr}$ , dans les cardiomyocytes fraîchement isolés et ceux en culture, suggère une participation de ce courant dans le décours du PA et plus particulièrement à la phase de repolarisation des PA à ce stade de différenciation. Cette observation va dans le même sens que celle décrite pour le nœud sinusal. L'inactivation de l'une des isoformes codant pour ce canal entraîne des épisodes de bradycardie sinusale (Lees-Miller *et al.*, 2003), démontrant son rôle dans ce tissu. De plus les sous-unités  $\alpha$ , Kir 3.1 et 3.4 responsables du courant  $I_{K_{Ach}}$  sont aussi présentes à ce stade, et augmentent lors de la culture. Cette même observation a été faite pour les canaux Kir 6.1 portant le courant  $I_{K_{ATP}}$ . Ces courants ont tous les deux été décrits pour être présents dans le nœud sinusal (NS) et l'atrium.

(2) L'analyse phénotypique a montré une hétérogénéité de la population cellulaire en présence, qui tend vers un profil de type atrial. Ainsi, la présence de la myosine de type atrial MLC-2a et son niveau d'organisation varient dans un même « cluster » de cellules. De plus, l'expression du gène MLC-1a abonde aussi en ce sens. La mise en culture accroît l'expression de ce gène et augmente encore cette prévalence atriale. Néanmoins, l'expression des gènes impliqués dans la régulation calcique est fortement représentée et augmente lors de la mise en culture, suggérant une maturation du système intervenant dans l'homéostasie calcique. Toutefois, le profil phénotypique de la SERCA2 et sa localisation périnucléaire à ce stade, montrent que les tubules transverses du réticulum sarcoplasmique ne se sont pas encore mis en place. Par ailleurs, le calcium a été démontré pour jouer un rôle dans l'initiation et la modulation de l'activité pacemaker.

Ces données montrent qu'à ce stade précoce de différenciation, nous obtenons dans nos conditions de culture un profil de type « pacemaker-like » atrial.

- Pour les cardiomyocytes isolés à 15 jours de différenciation et cultivés 3 jours, le profil électrophysiologique tend à montrer une hétérogénéité des populations cellulaires présentes au sein d'un même « cluster » cellulaire.

L'analyse des profils « génotypiques », électrophysiologiques et phénotypiques des cardiomyocytes dérivés des cellules ES tend à montrer que dans nos conditions de culture le profil d'expression est principalement atrial avec une caractéristique de type pacemaker plus importante pour les stades les plus précoces de la différenciation. Dans nos conditions, et dans cette courte fenêtre de temps, nous observons la maturation du système atrial. Ces différentes observations montrent qu'il existe, dans nos conditions de culture, une programmation de la différenciation. Les précurseurs cardiaques de type pacemaker apparaissent d'abord, puis, le phénotype atrial devient dominant, enfin la différenciation ventriculaire débute. Cette vision coordonnée est renforcée par les immunomarquages. Ces derniers montrent une absence de marquage de la chaîne légère de la myosine de type ventriculaire (MLC-2v) dans les stades précoces de la différenciation, et une apparition dans les stades plus tardifs.

**Phenotypic expression and pattern of ionic channel gene expression in murine ES-derived cardiomyocytes at an early stage of differentiation.**

Maylis Dagouassat, Patrice Naud, Patricia Lemarchand, Denis Escande and Philippe Jourdon

Institut du Thorax, U-533 INSERM, Faculté de Médecine, 1 Rue Gaston Veil,  
44035 Nantes Cedex

## ABSTRACT

Several studies have shown the potential of ES cells to differentiate into different types of cardiomyocytes and the main phenotypic characters of these ES-derived cardiomyocytes have been described. There is a general agreement, based mainly on electrophysiological studies, that at early stages of differentiation cardiac cells correspond to atrial like pacemaker cells. However the evolution of the pattern of the molecular components contributing to the electrophysiological properties of the cardiomyocytes at this early stage of differentiation has not been undertaken in details. We assessed the expression pattern of ionic channels in spontaneously beating cardiomyocytes derived from the differentiation of murine ES cells by using large-scale real time RT-PCR, we profiled the main channels and related genes at two different stages of this *in vitro* cardiogenesis (11 and 15 days). We tested whether maintaining these cells in culture alters their genotypic profile and compared it to those we established in embryonic and newborn mice hearts. Furthermore a phenotypic and functional analysis have been undertaken. The electrophysiological data showed that at the earliest stage studied (11 days) cardiomyocytes have only a spontaneously firing action potential whose characteristics are very similar to that described in adult mice cardiac pacemaker cells. In 15-days old cardiomyocytes this type of AP is also observed in some cells. However, a spontaneously firing action potential (AP) associated to a more negative maximum diastolic potential is observed in many cells. This suggests that at this stage of differentiation, two types of cardiac cells (pure pacemaker and atrial like cells) coexist. By using specific atrial and ventricular immuno-markers we show that in cardiomyocytes isolated at 11 days of differentiation a clear ventricular phenotype is never observed and this occurs only in a very few cells at the latest stage of differentiation studied (15 days). The analysis of the genes governing the specific atrial and ventricular contractile proteins and transcription factors known to be expressed specifically in one type of these myocardial cells supports these results. *Irx4* a specific ventricular transcription factor is not expressed neither at 10.5 or 11 days ruling out the contribution of ventricular cells to this gene expression profile. The gene profile of ionic channels shows that at this stage, *Kir 2.1*, the main channel involved in the maintenance of the resting potential in adult myocardial cells, has a very low level of expression and remains to such a low level in 15 days cardiomyocytes. *HCN4* and *HCN1* are the two main isoforms largely expressed in the 11 days ES-derived cardiomyocytes and therefore would contribute to the diastolic depolarization observed in these spontaneously firing cells. As *HCN1* is specifically expressed in adult mice pacemaker cells, its presence in 11 days cardiomyocytes

derived from ES suggest a nodal phenotype of these cells. Its down-regulation at 15 days may reflect that these pacemaker cells are no more so abundant in 15 days cardiac preparations than in 11 days.  $\text{Na}_v 1.5$  has a very low expression in the ES-derived cardiomyocytes compared to newborn myocardial cells. The genes encoding T type channels, Cav 3.1 and Cav 3.2, are expressed at both stages of differentiation and are the most dominant genes encoding for channel proteins involved in the depolarising phase of the action potential. Among genes encoding potassium channels, *merg* is the gene dominantly expressed and *Mink* is up regulated as the differentiation is prolonged. The  $\text{K}_{\text{ATP}}$  are expressed at the earliest stages of differentiation. The progressive changes occurring in the main genes encoding the proteins involved in calcium homeostasis reveal the remodelling of these elements during the early cardiogenesis to improve calcium homeostasis. Maintaining 11 days cardiomyocytes in culture for 3 days modifies the gene expression profile with an upregulation of several genes towards a predominant atrial profile. In conclusion, our results established clearly that at 11 days of differentiation ES cells derived cardiomyocytes have functional and genotypic characteristics of pacemaker cardiac cells expressing an atrial phenotype which may be amplified by maintaining isolated cardiomyocytes in culture for 3 days, whereas 15 days of differentiation corresponds to the starting point of the ventricular differentiation process.

## INTRODUCTION

Mouse pluripotent embryonic stem (ES) cells retain their developmental capacity and can be differentiated *in vitro* into cardiomyocytes. Such a differentiation of ES cells to cardiac lineage offers a potential source for cardiac cellular therapy. Furthermore it provides an important model to investigate mechanisms and genes involved in the earliest steps of cardiac development. Many studies concern mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (Wobus, 2002 for review). The electrophysiological characteristics and the expression of some specific cardiac genes in terminally differentiated cells show that these cells display a high degree of diversity (Maltsev et al., 1993). They exhibit characteristics of atrial, ventricular and sino-atrial cells. More recently, a study concerning the comparison between ES cell-derived cardiomyocytes and cardiomyocytes from embryonic mice, based on *in situ* hybridization, and quantitative RT-PCR for transcription factors and electrophysiology suggests that cardiomyocytes derived from ES cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube (Fijvandraat et al., 2003). However the pattern of the molecular components contributing to the electrophysiological properties of these cardiomyocytes has not been undertaken in details. In the present study we assessed the expression pattern of ionic channels in spontaneously beating cardiomyocytes derived from the differentiation of murine ES cells by using large-scale real time RT-PCR, we profiled the main channels and related genes at two different stages of this *in vitro* cardiogenesis (11 and 15 days). We tested whether maintaining these cells in culture alters this genotypic profile and compared them to those we established in embryonic and newborn mice hearts. Furthermore a phenotypic and a functional analysis have been undertaken. We conclude that at the earliest stage of differentiation studied, 11 days, the cardiomyocytes exhibit characteristics of both nodal pacemaker cells and atrial cells and it is only at 15 days that a clear ventricular phenotype is observed in very few cells whereas the general pattern of gene expression corresponds predominantly to that of atrial cells.

## METHODS

### ES cell differentiation

R1 ES cells, were provided by Dr. Nagy, and cultivated on mitomycin C mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEF) feeder layer. ES Cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS, Hyclone), L-glutamine (2

mM),  $\beta$ mercaptoethanol (0.1  $\mu$ M), non essential amino acids (0,1 mM), pyruvate (1 mM), 100U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 1500 units/ml leukemia inhibitory factor (LIF, Sigma). The medium was changed everyday.

Differentiation of ES cells into cardiac cells was performed by the hanging drop technique (Maltsev et al., 1994) with 500 cells /drop of differentiation medium. Each differentiation corresponds to 9000 drops. The differentiation medium has a similar composition as the medium described above but LIF was redrawn, FCS was increased up to 20% and  $3 \cdot 10^{-8}$  M selenium chloride was added. After 2 days the embryoïd bodies (EBs) obtained were cultured in suspension for 3 days, and plated onto gelatin-coated (0.1%) tissue culture dishes. The contractile activity was determined by optic microscopy everyday from day 6 before changing the medium. Cardiomyocytes at 10.5, 11 and 15 days after inducing the differentiation, were enzymatically isolated using 1 mg/ml collagenase and 0.25 mg/ml pancreatin in  $\text{Ca}^{2+}$ -free ADS buffer containing 117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM HEPES, 5 mM glucose. Cardiomyocytes were purified through a percoll gradient and either RNA were immediately extracted from these cells or the cardiac cells were plated in differentiating medium onto Petri dishes containing laminin treated glass coverslips Each cycle of differentiation was undertaken such a way to obtain at least an average value of 600 EBs at plating time onto gelatine dishes. Purified cardiac myocytes after gradient percoll was estimated, with hematocytometer, to be 3% of the total cellular content of an EB, giving at 11 days of differentiation an average value of  $25 \cdot 10^4$  cardiomyocytes/differentiation.

### **Immunocytochemistry**

For immunostaining cells were fixed in a solution containing 3% paraformaldehyde in PBS (0.1 M, pH 7.4) for 20 minutes. Cells were washed in 0.1 mM PBS, permeabilized for 30 min with 0.2% Triton X-100 and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. These antibodies are: Mouse MLC2V-clone F109 3E1 (Biocytex), Mouse connexin 40, 43 and 45 (Santa Cruz) and Goat Serca2 (Santa Cruz). After washing the cells with PBS, secondary antibody (Alexa Fluor 488-conjugated anti mouse, and alexa fluor 564 anti-mouse, Molecular probes) was added and the cells were incubated for 45 min at room temperature. Finally the cells were washed with PBS and embedded in mounting medium. Imaging was performed on a TCS-SPI confocal laser scanning microscope (Leica, Heidelberg, Germany) with TCS NT software and/or an inverted scanning microscope having an epifluorescent equipment ( Zeiss Germany) with Axiovision 4.

### **RNA preparation.**

Total RNA was extracted from 1) ES cells, 2) EBS at 10.5, 11 and 15 days after inducing the differentiation and 3) from cardiomyocytes isolated from EBs at 10.5, 11 and 15 days and maintained for 3 days in culture. They were treated with DNase I mini kit (Quiagen) by following the manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed by microelectrophoresis on acrylamide gel (Agilent 21000 Bioanalyser, Palo Alto, CA, USA). Lack of genomic DNA contamination was verified by PCR. The concentration of RNA was determined by nanodrop technology. RNA from 5 up to 10 differentiations were pooled, both for cardiomyocytes freshly isolated from EBs and those maintained 3 days in culture, in order to run Taqman low-density arrays.

### **TaqMan Real-time RT-PCR**

Taqman low-density arrays (Micro Fluidic cards, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used in a two-step dRT-PCR process. First strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using the high capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then carried out in Micro Fluidic cards using the ABI PRISM 7900 HT sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were preloaded with 96 x 4 predesigned fluorogenic TaqMan probes and primers. The probes were labelled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM, Applera Corp, Norwalk, CT, USA) on the 5' end and with non fluorescent quencher on the 3' end. The genes selected for their cardiac expression encode mainly 71  $\alpha$  and  $\beta$ -ion channel subunits, ten proteins involved in calcium homeostasis, six specific phenotypic markers of cardiac regions, and 4 genes used for normalization. Two nanogrammes of cDNA combined with 1 x TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) were loaded into each well. The Micro Fluidic Cards were thermal cycled at 50°C for 2 min and 94.5°C for 10 min, followed by 40 cycles at 97°C for 30 sec, and 59.7°C for 1 min. Data were collected with instrument spectral compensations by the Applied Biosystems SDS 2.1 software, and analysed using the threshold cycle ( $C_t$ ) relative quantification method (Livak & Schmittgen, 2001). GAPDH reference gene was used for normalization of the data. Genes with  $C_t > 32$  were eliminated for lack of reproducibility. The values were then used for the  $2^{-dCt} \times 1000$  calculations;  $2^{-dCt}$  corresponds to the ratio of each gene expression versus GAPDH.

## **Electrophysiology**

Experiments were performed by using whole cell patch clamp techniques with an axopatch 200B amplifier (Axon instruments, Foster City, CA) with a sampling at 10 KHz and filtering at 1 Hz. Action potentials were recorded at room temperature (21 to 23°C). The recording bath solution contained (mM) : NaCl 145, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 5, Hepes 10, pH 7.4 (KOH). The pipette solution contained (mM) : K aspartate 130, NaCl 10, CaCl<sub>2</sub> 0.04, MgCl<sub>2</sub> 1, GTP 0.1, ATP(Na)<sub>2</sub>, phosphocreatin 6.6, pH 7.25 (KOH). Pipettes had tip resistances of 3-4 MΩ when filled with the internal recording solution.

## **Statistical analysis**

Data were expressed as mean ± SEM. Comparison between groups was performed using one-way ANOVA. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## **RESULTS**

### **Cardiomyocyte differentiation**

The earliest spontaneous contactile activity is detected in some EBs ( $19.0 \pm 2.5$  %), as a small locus of 3 to 5 cells, 6 days after inducing the differentiation (Fig 1). In the following days, the beating area, the amount of beating loci in one EB and the number of spontaneously beating EBs progressively increase. The percentage of EBs presenting such a spontaneous activity reaches a maximum by day 11 ( $84 \pm 1.8$  %). The time course of the percentage of spontaneously beating EBs is very reproducible from one differentiation to another allowing to control the pattern of the differentiation. Cardiomyocytes isolated from 11 days EBs and maintained in culture still divide during the next two following days after plating, although the spontaneous activity is maintained. When from the same differentiation experiment, RNA was extracted from half of the cardiomyocytes immediately after isolation from EBs and extracted from the other half of cardiomyocytes after 2 supplementary days in culture, the amount of RNA was higher in this later case.

### **Electrophysiology**

Patch clamp electrophysiology on cardiomyocytes was recorded in purified cardiomyocytes from 11 days and 15 days EBs and maintained for 2 days in culture. Most of the cells are

clustered. The AP recorded in these clusters shows different electrophysiological phenotypes depending on the differentiation time course (Fig. 2). At both stages of differentiation a spontaneous electrical activity was recorded, bursting at different rates. In 11 days cardiomyocytes, in a same cluster of cardiac cells, the AP was the same for the different cells recorded within this cluster therefore we considered only one value of each AP parameter for our analysis. The maximum diastolic potential,  $E_{m_{\text{Max}}} = -55.5 \pm 1.2 \text{ mV}$  ( $n = 8$ , Fig. 2A & B). When the slow diastolic depolarization phase reaches a potential of  $-47, 9 \pm 2.1 \text{ mV}$  ( $n=8$ ) an AP is triggered, at a frequency of 50/min in average. This type of action potential is very similar to that described in adult mice nodal pacemaker cells (Mangoni et al., 2001). In cardiomyocytes isolated at 15 days (Fig. 2 C and D) our results shows mainly two different types of AP. First AP similar to those recorded in 11 days cardiac cells, having a low value of  $E_{m_{\text{Max}}}$  ranging from  $-45$  to  $-65 \text{ mV}$ , and a slow diastolic depolarization (Fig 2 C). In these cells AP was induced when the membrane potential value is around  $-35 \text{ mV}$ . On the other hand, a large number of cells have an  $E_{m_{\text{Max}}}$  of  $-75 \text{ mV}$  and shows also a very slow diastolic depolarization phase-like (Fig 2 D). The threshold potential for an AP triggering has a more negative value than previously ( $-65 \text{ mV}$ ). A slightly slower rate of firing is observed in these cardiac cells (0.5 Hz) when compared to that in 11 days cells. The two types of AP can be recorded from different cells in a same cluster as illustrated in Fig 2 C and D. The cells having a low  $E_m$  value are more spherical and located in the center of the clusters. The APs having the highest negative values of  $E_m$  were more excentred. This discrepancy between APs parameters at the two different states of differentiation was also observed in cells that were not in clusters. These results support that at 15 days different functional phenotypes coexist which may correspond to various types of cells and/or different degrees of differentiation.

### **Phenotypic characterization by immunostaining**

In order to characterize the phenotype of our cardiac cells we have undertaken immunostaining of some proteins either involved in the contractile activity or in the electrical coupling between cells. The expression of  $\alpha$ -actinin,  $\beta$ -MHC and of MLC2V in cardiomyocytes isolated from 11 and 15 days EBs and maintained 3 days in culture are illustrated in figure 3.  $\alpha$ -actinin is already well organized in a sarcomeric structure in 11 days cardiomyocytes (Fig 3 A) to a similar degree to that observed in 15 days cardiac cells (Fig 3 B). At the opposite, the isoforme  $\beta$  of the myosine heavy chain ( $\beta$ -MHC) in 11 days cardiac cells has different degrees of expression. As illustrated in fig 3B, most of the cells show only a partial expression of this myosin in a fully well organized striated pattern which

characterizes cardiac muscles. This is observed independently of the shape of the cells considered. Only some parts of the myosin filaments present a sarcomeric striation. In 15 days the cardiac cells presents the classic sarcomeric organization (Fig 3E). Therefore, between 11 and 15 days an improvement in the arrangement of the myosin heavy chain in a fully sarcomeric structure occurs such as a similar pattern to that described in adult myocardium is observed by 15 days of differentiation. The isoform 2 of the light chain of the ventricular myosin (MLC2V) is not detected in 11 days cardiac cells (Fig 3C). In 15 days cardiac cells, in it is the same as we observed only 1 or 2 cells/cm<sup>2</sup> which presented a clear immunostaining as illustrated in figure 3 F. The other cells have exactly the same expression level as the one observed in 11 days cardiac cells. This suggest that by 15 days of differentiation very a few cells have developped a ventricular phenotype. In order to know whether the main phenotype of our cells was an atrial one we have done an immunostaining with an antibody against the isoform 2 of the atrial light chain of the myosin (MLC2V). Figure 4 A shows that already at 11 days cardiac cells expressed an intense expression of this protein in almost all the cells of the different preparations studied. The organization in a sarcomeric structure, at this stage of differentiation is not obvious in all of the cells. Some cells show a filament structure without a clear striation. This sarcomeric structure is observed in all of the cardiac cells after 15 days of differentiation (Fig 4B). The sarco-endoplasmic reticulum Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase is one of the proteins involved in the recycling of the intracellular calcium. Fig 4 (C-E) shows that at 11 days cardiac myocyte, characterized by an imunostaining of the alpha actinin (Fig 4 C) expressed this protein troughout the cytosol without a particular localization. However, this protein seems to be more expressed in the perinuclear area. In 15 days cardiac cells (Fig 4 F-H) this ATPase is also more present in this area, however some specific co-localization with the sarcomeric alpha actinin is observed. It has been shown that titin which colocalize with alpha actinin at the T-tubule sis already expressed at a very early time of cardiac embryogenesis. Even if T-tubules are not present at this stage of cardiac development, the co-localization of SERCA2 with alpha actinin anticipate this.

In order to investigate the physical coupling between adjacent cells we performed an immunostaining against connexin 43. Both in 11 and 15 days cardiac cells connexin 43 was expressed (Fig 5 A-D) at the membrane level of adjacent cells where they form junctions.

## Gene expression profile Analysis

### Repertoire of contractile proteins

During the embryogenesis there is a complex temporal and spatial regulation of cardiac myosin gene expression (Lyons et al., 1990). When differentiated as EBs, ES cells give rise to a heterogeneous cardiac cells population, with a gradual diversity depending on the time scale of the differentiation (Maltsev et al., 1994). Atrial, ventricular and nodal, having a specific myosin gene expression profile, the temporal variation of this expression profile in ES-derived cardiomyocytes is an index of the relative expression of each predominant type of cardiac cell at a specific stage of the differentiation process. Therefore, we determined the dynamic pattern of protein contractile genotype in ES-derived cardiomyocytes after 11 and 15 days of *in vitro* differentiation (Fig 6) and compares it to that determined in 13.5 days embryonic and newborn heart cells.

Cardiac actin increases from 10.5 days to birth showing that the sarcomeric structuration of cardiac contractile proteins, which is already somewhat present at an early stage of differentiation improves during embryogenesis.

In cardiomyocytes isolated from EBs at 10.5 days of differentiation each of the four myosin transcripts MLC1a, MLC2V,  $\alpha$ -MHC and  $\beta$ -MHC are expressed without a specific predominance. Such a coordinated expression of these transcripts is similar to what has been previously described in 8 days p.c. mouse linear heart tube (Lyons et al., 1990).  $\alpha$ -MHC increased during *in vitro* differentiation and is upregulated when compared to level at the same stage of differentiation. In 9 days p.c. mouse heart is largely restricted to ventricular cells and outflow tract (Lyons et al., 1990). Furthermore, at this 9 p.c. embryonic heart both atrial and ventricular myosins are expressed in all myocardial cells. Our results show that MLC2V expression level remains unchanged at 11 days when compared to that at 10.5 days, whereas MLC1A is 3 times higher in 11 days than in 10.5 days cardiomyocytes, suggesting that atrial cells are predominant at 11 days. The very large increase both in  $\alpha$ -MHC and MLC1a associated to a much smaller increase in MLC2V observed when cardiomyocytes isolated from 11 days EBs are maintained for 3 days in culture, strengthened this hypothesis. The overexpression of  $\alpha$ -MHC, when compared to  $\beta$ -MHC, is maintained in freshly isolated cardiomyocytes from 15 days EBs whereas MLC1A and MLC2V are equally expressed. In embryos older than 10 days p.c both MLC1A and  $\alpha$ -MHC mRNA are expressed at high levels in atria and disappear from the ventricle where  $\beta$ -MHC and MLC2V are expressed at high levels (Lyons et al., 1990). Our results in 13.5 embryonic hearts, where mRNAs were

extracted from whole heart, shows that MLC1A and  $\alpha$ -MHC are lower than MLC2V and  $\beta$ -MHC respectively which results from the very much larger amount of ventricular cells in this embryonic heart. Such a distribution of the myosin transcripts is not observed both in cardiac myocytes freshly isolated from 15 days EBs and maintained in culture. Furthermore, by maintaining the cardiomyocytes in culture does not allow anymore an increase prevalence of atrial expression as previously observed in 10.5 days cardiac cells. The ventricular differentiation seems to be reduced and/or delayed in the in vitro model of differentiation compared to that occurring during fetal embryogenesis. A remodelling may occurs between 10.5 and 15 days such a way that it does not allow the predominant stimulation in atrial cells when isolated cardiomyocytes are cultured.

Similarly, the transcripts for two different isoforms of Troponin I (troponin I1 and troponin I3) increase progressively throughout all the differentiation process supporting a maturation of these transcripts during this period of the cardiac development.

## **Repertoire of ionic channels transcripts**

### **Voltage gated Na channels**

$\text{Na}_v$  channels are composed of a pore-forming  $\alpha$ -subunit associated with one or more auxiliary  $\beta$ -subunits. The  $\alpha$  subunits are able to form functional channels, whereas  $\beta$  subunits modulate the biophysical properties of the  $\alpha$  subunit. Nine mammalian  $\text{Na}_v$  channel  $\alpha$  subunit genes have been characterized with distinct tissue-specific expression and electrophysiological properties. Based on expression profiles, individual  $\text{Na}_v$  channel genes can be divided into several different groups.  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ , and  $\text{Na}_v1.6$  are primarily found in the central nervous system;  $\text{Na}_v1.7$ ,  $\text{Na}_v1.8$ , and  $\text{Na}_v1.9$  are predominant in the peripheral nervous system, and skeletal and cardiac muscle cells express  $\text{Na}_v1.4$  and  $\text{Na}_v1.5$ , respectively. 3 different  $\beta$  auxiliary subunits have been characterized,  $\text{Na}_v\beta1$ ,  $\text{Na}_v\beta2$  and  $\text{Na}_v\beta3$ .

In the present work, cardiac cells derived from ES cells express 4 isoforms of  $\text{Na}_v$  Channel  $\alpha$  subunits channels.  $\text{Na}_v 1.3$ ,  $\text{Na}_v 1.4$ ,  $\text{Na}_v 1.5$  and  $\text{Na}_v 2.3$  (Fig 7 A and D), the other isoforms were not detected. At a specific stage of differentiation, the expression level of these genes is different and varies with the differentiation process.

$\text{Na}_v 1.3$  and  $1.4$  have a very low level of expression in ES-derived cardiomyocytes at all steps of differentiation studied.  $\text{Na}_v 1.3$  has been identified in adult mouse SA node.  $\text{Na}_v 1.4$  is no more detected in 15 days ES-derived cardiac cells. However, both  $\alpha$  subunits remain expressed at later stages of the embryonic development (Fig 7A and C).  $\text{Na}_v 1.3$  expression

remains very low even in newborn heart cells.  $\text{Na}_v 1.4$  which remains low till midgestation is highly expressed at birth. In newborn mice the gene encoding this channel is strongly expressed both in atrial and ventricular myocardium with a predominancy in atrial cells (Fig 5C).

$\text{Na}_v 2.3$  and  $\text{Na}_v 1.5$  are predominantly expressed in all ES derived cardiomyocytes (Fig 7A and D). At 10.5 and 11 days of differentiation, a similar level of expression is observed for  $\text{Na}_v 1.5$  and  $\text{Na}_v 2.3$ . It is only at 15 days that  $\text{Na}_v 1.5$  increases whereas  $\text{Na}_v 2.3$  remains unchanged. A predominancy of  $\text{Na}_v 1.5$  over is observed during the following stages of the embryonic development (13.5 days p.c.) and is maintained at birth (Fig 7D and F).  $\text{Na}_v 1.4$  which remains low till midgestation is highly expressed at birth.

When isolated ES-derived cardiomyocytes are maintained in culture, a remodelling of the  $\alpha$ subunits genes expression occurs.  $\text{Na}_v 2.3$  is down expressed (Fig 7B) whereas  $\text{Na}_v 1.5$  is overexpressed (Fig 7E).

The genes encoding the two sodium channel  $\beta$  subunits,  $\text{Na}_v\beta 1$  and  $\text{Na}_v\beta 3$ , are already present in 10.5 days ES-derived cardiomyocytes (Fig 7A).  $\text{Na}_v\beta 1$  is predominantly expressed at 10.5 days whereas at 11 days the level of  $\text{Na}_v\beta 3$  is higher resulting from a decrease in the expression of  $\text{Na}_v\beta 1$ . At 15 days, both  $\beta$  subunits are equally expressed. By maintaining 11 day cardiomyocytes in culture induces an increase of the expression of both subunits (Fig 7B) at a level similar to that observed in embryonic heart cells. In newborn  $\text{Na}_v\beta 3$  is more expressed in atrial than in ventricular cardiac cells.

At an early stage of differentiation it is both  $\text{Na}_v 1.5$  and  $\text{Na}_v 2.3$  that are mainly and equally expressed. Maintaining isolated cardiomyocytes in culture induces an upregulation of the specific cardiac  $\text{Na}_v 1.5$   $\alpha$ -subunit to a level similar to that observed in 13 days embryonic heart. The expression pattern of  $\text{Na}_v 2.3$  is the opposite. Simultaneously, the  $\text{Na}_v\beta 1$  and  $\beta 3$  subunits are also increased. The alteration of the expression profile of genes encoding Na channels and their subunits under our culture conditions is similar to that observed at further stages of differentiation, suggesting that an improvement of the differentiation process for these channels.

The expression profile of voltage gated sodium channels transcripts (Fig 7) shows mainly that in neonatal cardiac cells genes coding for the  $\alpha$ -subunits  $\text{Na}_v 1.4$  and  $\text{Na}_v 1.5$  are largely expressed whereas  $\text{Na}_v 1.4$  transcript is very low in 13.5 days embryonic heart and cardiomyocytes derived from ES cells differentiation. The  $\text{Na}_v 1.5$  has a very low expression level in 10.5 and 11 days cardiomyocytes. When the cardiomyocytes isolated from 11 days

EBs are maintained for 3 days in culture, a ten fold increase of this transcript is observed. Even if a large disparity in the results prevents a significant difference we may suggest that this transcript is either unchanged or has a tendency to an increase at 15 days of differentiation when compared to 10.5 or 11 days of differentiation. The  $\beta$ -subunits  $\text{Na}_v\beta 1$  and  $\text{Na}_v\beta 3$  have similar profiles, and vary the same way, as  $\text{Na}_v 1.5$ . The  $\alpha$ -subunits  $\text{Na}_v 1.3$  and  $\text{Na}_v 2.3$  are expressed at a low level in all the different cardiomyocytes studied.

### **Voltage gated Ca channels**

The repertoire of  $\text{Ca}^{2+}$  channels transcripts are illustrated in figure 8. Both voltage-dependant T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$   $\alpha$ -subunits genes are expressed in ES-derived cardiomyocytes. The  $\alpha$ -1C subunit Cav 1.2, which is the major L type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha$ -subunit in both embryonic and neonatal mouse cardiac cells (Fig 8 C), is the most expressed L-type alpha subunit in cardiomyocytes derived from ES cells, whatever the conditions of culture are (Fig 8 A). Furthermore a slight increase is observed for this transcript at 15 days of the differentiation when compared to 10.5 or 11 days. By culturing for 3 days cardiomyocytes isolated cells from 11 days EBs also increases slightly this gene expression level (Fig 8 B). However the level of expression of this gene in the cardiac cells derived from the *in vitro* differentiation remains lower than the one observed in 13.5 embryonic heart cells. The expression of alpha-1D subunit, Cav 1.3, is low in all the different cardiac preparations studied.

The two T-type  $\alpha$  subunits, Cav 3.1 (CACNA1G) and Cav 3.2 (CACNA1H), are present in ES-derived cardiomyocytes (Fig 8 A). Cav 3.2 was already present in cardiomyocytes isolated 10.5 days after inducing differentiation whereas Cav 3.1 was not detected at this stage of development. By lengthening the differentiation process allows to detect the Cav 3.1 transcript at 11 days which level increases at 15 days after inducing differentiation. An increase in Cav 3.1 was observed when cardiomyocytes isolated from 11 or 15 days EBs are maintained in culture (Fig 8B). Concerning Cav 3.2, maintaining the cells in culture induces opposite effects.

Among the five genes encoding the  $\text{Ca}^{2+}$  channel auxiliary subunits, Cav $\alpha 2$ - $\delta 1$ , Cav $\alpha 2$ - $\delta 2$ , Cav $\beta 1$ , Cav $\beta 2$ , and Cav  $\beta 3$ , it is Cav $\alpha 2$ - $\delta 2$  that predominates in ES-derived cardiomyocytes (Fig 8 B). The expression of all auxiliary subunits increases as long as the differentiation in the EBs is maintained.

In the early stages of the *in vitro* differentiation T type calcium channels genes predominate and the expression level for  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits at 15 days is close to that in 13.5 days

embryonic hearts excepted for Cav 1.2, which is lower in cardiac cells derived from *in vitro* differentiation. Isolated cardiomyocytes derived from ES cells maintained in culture tends to increase the expression level of the calcium channels subunits.

### **Potassium channels**

In cardiomyocytes derived from ES cells a great number of K channel have a very low level of gene expression which remains unchanged during all the time course of the *in vitro* differentiation (Fig 9 and Fig 10). This is mainly the family of genes Kv1x including Kv1.5 which is expressed in newborn mice hearts (Fig 10 A) and at a higher level in the ventricles than in the atria. The gene encoding Kv 2.1 subunit, which corresponds to a slow potassium current, is detected at a low level in 10.5 and 11 days ES-derived cardiomyocytes when compared to the high level expression in newborn heart cells (Fig 9 A and Fig 10 B). Only a slight increase occurs at 15 days of differentiation. Kir 2.1, corresponding to the channel allowing the maintain of the diastolic resting potential at a very negative value in adult cardiac cells of all mammals, has a low expression level in cardiomyocytes derived from ES cells compared to that in newborn mice (Fig 9 A and 10 B) even a slight increase between 10.5 and 15 days is observed. Merg is the gene of the potassium voltage-gated family which is the most expressed in 10.5 days cardiomyocytes (Fig 9 A). It increases during all the embryonic development suggesting that the potassium rectifier current flowing through this channel would be the main repolarizing current in cardiomyocytes at these early stages of differentiation. Kir 6.2, Kir 3.1 and Kir 3.4, corresponding to the  $K_{ATP}$  and the  $K_{ACh}$  channels, respectively, are also expressed in cardiomyocytes derived from the ES cells (Fig 9 A). The expression of these two later increases with the time course of the differentiation. Kir 3.1 and Kir 3.4 are mainly present in the newborn atrial cells (Fig 10 A).

Several potassium auxiliary subunits, already expressed in cardiomyocytes isolated from the EBs which may modulate the activity of potassium channels (Fig 11 A). TASK2 is predominantly expressed in the 10.5 days myocytes and decreases very rapidly to a lower value than that in embryonic heart cells (Fig 11 C). It is the same for MIRP2. At the opposite, KChIP2 and MIRP4 which are not present in 10.5 cardiac cells are largely expressed in 15 days cells. According to the role of the auxiliary subunits one might suggest that they may contribute to a better localization of the channels in the membrane and or modulate their activity.

When cardiomyocytes isolated from EBs are maintained in culture the voltage dependent K channels gene expression profile is almost unchanged (Fig 11 B) excepted a transient increase in merg, Kir 3.4 and Kir 6.2 in 11 days cardiomyocytes maintained in culture. The most

drastic change observed is for MinK in cardiac myocytes isolated at 15 days of differentiation and maintained in culture (Fig 11 B). This gene, which is not expressed before 15 days of differentiation, is upregulated after 3 days in culture from this stage of differentiation. In these conditions, it has a level similar to that observed in 13 days embryonic heart (Fig 11 B & C). As this channel is known to associate with KVLQT1, may improve the current flowing through this channel and therefore to contribute in part to the time course changes of the AP occurring between 11 days and 15 days of differentiation.

### **HCN Channels**

HCN genes (HCN1, HCN2, HCN3 and HCN4) are encoding for the channels involved in the hyperpolarizing-activated inward current ( $I_f$ ), characteristic ionic current of pacemaker cells. In adult sino atrial node HCN4 is the most expressed of the HCN gene family of all species investigated so far (Stieber et al. 2004 Marionneau et al., 2005). In the present work, the expression profile analysis of HCN gene family (Fig 12 A, B and C) clearly shows that HCN4 is the most expressed gene at the earliest stage of differentiation studied. It is expressed at a constant level in ES-derived cardiomyocytes. Maintaining in culture cardiomyocytes isolated from 11 days EBs tends to an upregulation of this transcript however the large dispersion of the values do not allow to conclude firmly this point at 11 days (Fig 12 B). In the 13.5 days embryonic heart a similar level of expression is observed when compared the one in ES-derived cardiomyocytes (Fig 12 A & 12C). In newborn mice the HCN4 transcript is higher in atria than in ventricles and in atria its level of expression is similar to the one in 15 days ES-derived cardiomyocytes.

The HCN1 gene expression level is low in 10.5 days cardiomyocytes (Fig 12 A) increases transiently at 11 days and then decreases at a later stage of differentiation. When cardiomyocytes isolated from 11 days EBs are cultured (Fig 12 B), an increase of this gene expression occurs. HCN2 is expressed at a very low level in all preparations tested excepted for neonatal ventricles where a higher expression is observed (Fig 12 A & C). HCN3 has a homogeneous distribution along the differentiation time course. In early cardiac differentiation (11days) HCN4 and HCN1 are the main genes transcripts that may contribute to the pacemaker activity whereas at later stage (15 days) it is HCN4. The results obtained in neonatal cardiomyocytes are close to those previously described in adult mice myocardium (Marionneau et al., 2005).

## Connexins

The gap junction protein CX 43 is the main isoform expressed in all cardiac preparations studied (Fig 13 B, D and F). In ES-derived cardiomyocytes, its level of expression remains unchanged during all the time course of differentiation of the present study (Fig 13 B). There is an upregulation of its expression between the embryonic stage and birth time (Fig 13 B & F). In ES-derived cardiomyocytes the three other isoforms, CX 37, CX 40 and CX 45 are present at a low level (Fig 13 A). CX40 and CX45 have been described to be restricted to the conduction tissue of developing mammalian hearts and in the adult murine cardiac conduction system and sinus node (Delorme et al., 1995; Alcolea et al., 2004). CX 40 which is already expressed in embryonic heart (Fig 13 C), is then highly expressed exclusively in neonatal atrial cells. CX 45 remains low in neonatal cardiac cells (Fig 13 C). The observed changes in connexin profile expression during cardiac development are in agreement with previous reports (Coppen et al., 2003; for review, Teunissen and Bierhuizen, 2004). When ES-derived cardiomyocytes are maintained in culture, Connexin 43 increases at both stages of differentiation studied (Fig 13 D). Under these conditions, Connexin 40 is upregulated in 11 days cells (2 fold increase, Fig 13 C), whereas Connexin 45 is increased in cultures of 15 days cells. These results suggest a modification of the profile of these genes by maintaining the cells in culture towards an automatic cardiac cell type and/or atrial one if we considered the prevalence of isoform connexin 40 in the atrial cells of newborn mice (Fig 13 E).

## Proteins involved in $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis

Calcium not only plays a key role as an activator of the cardiac contractile machinery but is also involved in the regulation of the nodal pacemaker activity. As ES-derived cardiomyocytes at an early stage of differentiation have a spontaneous pacemaker like activity, we decided to study the modulation of the expression profile of the genes encoding for proteins involved in intracellular calcium homeostasis (Fig 14 A & B). The isoform SERCA2 of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum Na-K ATPase is already expressed at 10.5 days (Fig 14 C). Calreticulin gene (Calret), encoding a calcium chelating protein located within the sarcoplasmic reticulum, is also detected whereas calsequestrin, another chelating protein also located in the SR, is not expressed (Fig 14 A). From 11 days, time at which the calsequestrin is detected, till 2 days after birth, SERCA2 level progressively increases (Fig 14 C). Calsequestrin has the same type of pattern (Fig 14 A). Calreticulin which has the same level of expression in 15 days cardiomyocytes and 13, 5 days embryonic heart, does not vary

between 13.5 days and birth (Fig 14 A, C & D). Contraversely, calsequestrin is still upregulated during this time lapse. Maintaining in culture cardiomyocytes isolated at 11 days upregulates the expression of both SERCA 2 and Calreticulin (Fig 14 B). Phospholamban (pIn) a cytosolic regulator of the SERCA activity follows the same time course as the gene SERCA2. Among the two isoforms of ryanodine sensitive channels (RYR1 and RYR2) only RYR2 was expressed. Even if its level of expression was low compared to the previously mentioned genes, it slowly increases with cardiac development (Fig 14 A & D). The expression of sodium-calcium exchanger gene (NCX1) is observed since the earliest stage of development studied (Fig 14 A) as are the genes encoding for two cytosolic proteins which activity is calcium dependent: the isoform1 of the calmodulin (Calm1) and the calcineurin.

### **Transcription factors**

Among the different transcription factors known to be involved in cardiogenesis, we studied mainly 3 of them: Nkx2.5, Tbx5 and Irx4. The level of expression of these genes has been undertaken by Taqman RT-PCR semi quantitative independently of the microfluidic cards runs. However, for these determinations a gene present on the card and giving an expression level which was quantified was tested simultaneously in order to verify that similar results were obtained independently of the experimental protocol used and therefore to conciliate the results. GAPDH was also the reference gene used under these conditions. Analysis showed that Nkx2.5, the earliest marker of cardiac differentiation, is present as soon as 10.5 days of differentiation and was expressed throughout all the differentiation time course (Fig 15), as it is well established. Irx4, which is restricted at all stages of development to the ventricular myocardium (Bruneau et al., 2002) is never observed in our different ES-derived cardiomyocytes whatever the culture conditions are (Fig 15). Suggesting that at these stages of *in vitro* development the ventricular differentiation program is not running. This supports our results obtained with MLC2V immunostaining. Tbx5 has been shown in mice hearts to be in the posterior–anterior field of the linear tube and then restricted to the atria and left ventricles at mid gestation. This transcription factor is expressed in our cultures and increases between the 10.5 and 11 days of differentiation without changing further for longer differentiation time (Fig 15). It was also expressed in newborn myocardium where it is 10 times more expressed in the atrium than in the ventricles. 10.5 days cardiomyocytes cultured for 3 days increases the expression of this gene by a factor 2.

## DISCUSSION

Several studies have reported results concerning the phenotypic and functional characteristics of the action potential and of the main currents contributing to these AP in cardiac cells derived from murine ES cells at different stages of differentiation obtained by different differentiation protocols ( Maltsev et al. 1993; 1994, 1999; Viatchenko-Karpinski et al., 1999; Abi-gerges et al., 2000; Doevendans et al., 2000). However only partial results, concerning the genes supporting these different types of AP in these cells have been undertaken.

In the present work immunocytochemistry, electrophysiological phenotypes and gene expression profile data reveal the characteristics of ES-derived cardiomyocytes at an early stage of differentiation (10.5 and 11 days) and at a mid-gestational stage (15 days).

In cardiomyocytes derived from the early stage of differentiation, the expression profile for genes encoding contractile proteins are different to that of 13.5 days embryonic heart. We notice that  $\beta$ -MHC and MLC2V are predominantly expressed in 13.5 days embryonic heart. This would reflect the large ventricular cell content in this cardiac preparation and suggest that our cardiac cells correspond to an earlier stage of *in vivo* differentiation. In 10.5 days cardiac cells  $\alpha$ - and  $\beta$ -MHC are equally expressed. This is similar to what has been previously described in cardiomyocytes derived from D3 cell line (Wobus and Guan, 1998). The same expression level is also observed for MLC1A and MLC2V. It is only at 11 days that MLC1A and  $\alpha$ -MHC predominate. Development regulation studies of myosin gene expression in mouse cardiac muscle have shown that between 7.5 and 8 days p.c., in the cardiac tube, these different isoforms of myosin are expressed in every cardiac cell. It is only when the ventricular chambers are formed that  $\beta$ -MHC mRNA begin to be restricted to ventricular myocytes whereas  $\alpha$ -MHC transcripts continue to increase. Simultaneously MLC1A and MLC2V follow the same pattern of expression. This parallelism between *in vivo* results and our results confirms that this stage of *in vitro* development should correspond to the linear cardiac tube, as previously suggested by previous authors (see review Boheler et al. 2002). However, it has been shown that during embryogenesis, in the linear heart tube and its subsequent looping, the expression of the transcription factor *Irx4* is restricted to the ventricular segment and is absent from both the posterior and anterior segments of the heart corresponding to presumptive atrial domain and presumptive outflow tract region, respectively. Furthermore, at later stage, this transcription factor is exclusively found in ventricular myocardium (Bruneau et al., 2000). *Irx4* is not present in the ES-derived cardiac

cells, whereas we observed it in 13.5 embryonic heart cells and in ventricular neonatal cells as previously described by Bruneau et al. (2000). Therefore, atrial cells and /or pacemaker cells are both cellular types that have to be considered in our conditions. The immunostaining studies at 15 days showing clearly that MLC2V is observed only in a very few cells at 15 days whereas MLC1A is detected in almost the totality of the cells confirm the prevalence of atrial cells in the range 10.5-15 days of differentiation. This ruled out the contribution of ventricular cells to interfere with our gene expression profile and we might conclude that the gene expression profile of cardiomyocytes at an early stage of differentiation is atrial-cells like. However, the electrophysiological characteristics of 11 days cardiomyocytes show a low value of the resting membrane potential associated to a slow depolarizing phase inducing a spontaneous activity, which is in agreement with previously published results (Maltsev et al., 1993, Wobus and Guan 1998). These electrophysiological characteristics are similar to the previously described pacemaker activity of mice nodal cells (Mangoni et al., 2001) and do not correspond to that recorded in atrial cells of 12.5 embryonic cardiomyocytes (Fijvandraat et al., 2003). Our results concerning the expression profile of the ionic channels at this stage of differentiation (10.5 and 11 days) clearly show that  $\text{Na}_v1.5$  has a very low level of expression, Cav 3.2  $\alpha$  subunit and HCN1 and HCN4 are the predominant genes encoding channels inducing a depolarizing current. We may also notice that Kir 2.1 has a low expression level. This general ionic gene expression profile is very similar to that described in nodal cells of adult mice (Marionneau et al., 2005). Altogether these results suggest that cardiomyocytes derived from ES cells at 10.5 - 11 days have a genotypic profile pacemaker like. After isolating the cells and maintaining them in culture, MLC1A,  $\text{Na}_v 1.5$ , are upregulated. The same is observed for the genes encoding proteins involved in intracellular calcium homeostasis. This suggests that maintaining these isolated cells in culture reinforced the differentiation process towards an atrial like one. This is even more pronounced than if they were kept in EBs since this upregulation reaches higher level than those observed in cells freshly isolated from 15 days EBs. However, even if under these conditions the gene expression profile tends to be shifted towards a more atrial one, it does not allow the functional expression of an AP similar to that recorded in atrial cells of 12.5 days embryonic atrial cells as described by Fijinvadraat et al., (2003). They have a phenotype pacemaker-like as previously mentioned.

At a later stage of differentiation (15 days) corresponding to mid-gestation, we observed a predominance of MLC2v when compared to MLC1A. Immunostaining, however does not permit to detect a large population of cells showing such a phenotype, only a few cells present

this phenotype with a more abundant amount of MLC2V than in 11 days old cells. Furthermore, maintaining in culture the cells isolated from 15 days EBs do not allow anymore an upregulation of these genes encoding for both cardiac contractile proteins. Genes encoding for potassium channels and their beta subunits are increased, at various degrees depending on the channels considered, when compared to 11 days. HCN1 decreases whereas HCN4 remains unchanged. However, the transcription factor *Irx4* is still not detected. The AP recorded at 15 days shows for many cells a much more negative membrane resting potential value than in 11 days cardiomyocytes close the resting membrane potential observed in embryonic atrial cells by Fijinvadraat et al., (2003). However, a spontaneously firing population of cells having a low membrane resting potential is still observed. This result suggests that at this time of differentiation ES-derived cardiomyocytes correspond to a heterogenous population of cardiomyocytes having mainly either a nodal- or an atrial-like phenotype.

Our results support the hypothesis that in the early range of differentiation (11-15 days) ES-derived cardiomyocytes have an atrial-like phenotype of which we have characterized the gene expression profile. The full genetic program allowing the differentiation of ES-cells into ventricular cells might start at a later stage of the differentiation. The gene profile established in the present study can be used as a model to study at an early stage of cardiac differentiation the ionic channel remodelling which may occur under physiopathological conditions.

## REFERENCES

- Abi-Gerges N.; Ji G.J.; Lu Z.J.; Fischmeister R.; Hescheler J.; Fleischmann B.K. (2000) Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Physiol.*, 523, (2), 377-389.
- Alcolea S, Jarry-Guichard T, de Bakker J, Gonzalez D, Lamers W, Coppén S, Barrio L, Jongsma H, Gros D, van Rijen H. (2004) Replacement of connexin40 by connexin45 in the mouse: impact on cardiac electrical conduction. *Circ Res.*; 94(1):100-9.
- Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE. (2000) Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol.*;217(2):266-77
- Bruneau B., (2002). Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* 90;509-519
- Coppén S , Kaba R, Halliday D, Dupont E, Skepper J, Elneil S and Severs N (2003) Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal Heart. *Dev Dyn.* 1995 Dec;204(4):358-71
- Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Marics I, Briand JP, Willecke K, Gros D, Theveniau-Ruissy M. (1995) Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn.*; 204(4):358-71.
- Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, Theveniau-Ruissy M. (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res.*; 81(3):423-37.
- Doevendans P.A.; Kubalak S.W. An R-H.; Becker D.K.; Chien K.R.; Kass R.S. (2000) Differentiation of Cardiomyocytes in Floating Embryoid Bodies is Comparable to Fetal Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32, 839-851

Fijnvandraat A., Van Ginneken A., De Boer P., Rujiter J., Christoffels V., Moorman A. and Deprez R. (2003) Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube.

Livak K. and Schmittgen T., (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-Delta CT method. *Methods*, 25, 402-408.

Lyons G., Schiaffino S., Sassoon D., Barton P., Buckingham M. (1990) Development of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J. Cell. Biol* 111,2427-2436;

Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.*; 44(1):41-50.

Mangoni M. and Nargeot J., (2001) Properties of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.*, 52, 51-64.

Mangoni M, Couette B., Bourinet E., Platzer J., Reimer D. and Striessnig J et al., Functional role of L-type Ca<sub>v</sub>1.3Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100,25543-5548.

Marionneau C, Couette B, Liu J, Mangoni M, Nargeot J, Lei, M, Escande D, Demolombe S (2005) Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.*, 562, 223-234.

Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. (2004). Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med.*;14(1):23-8.

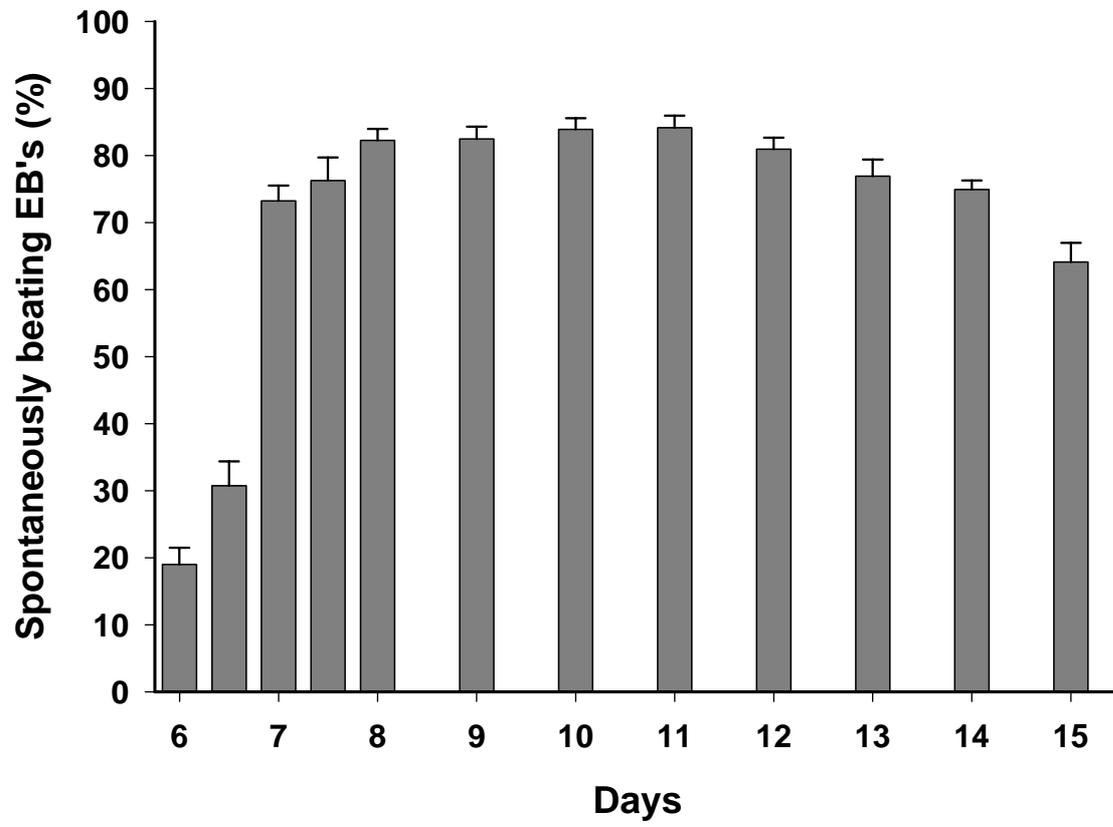
Teunissen and Bierhuizen (2004) Transcriptional control of myocardial connexins. *Cardiovasc Res.* ; 62(2):246-55.

S. Viatchenko-Karpinski, B. K. Fleischmann, Q. Liu, H. Sauer, O. Gryshchenko, G. J. Ji, and J. Hescheler<sup>†</sup> (1999) Intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proceed. Nat. Acad. Sci., NY*, 96, 8259-8264

Wobus A.M., Guan K. (1998) Embryonic stem cells-derived cardiac differentiation: modulation of differentiation and “loss of function”. *Analysis in vitro. Trends in Cardiovasc. Med* 8, 64-74.,)

Wobus A.M., Guan K., Yang H.T. and Boheler K. (2002) Embryonic stem cells as a model to study cardiac skeletal and vascular smooth cell differentiation. In: *Methods in Molecular Biology: Embryonic Stem Cells; Methods and protocols*, edited by K. Turlosen, Totowa, N.J: Humana vol. 186, chapt 13, 127-156.

Wobus A.M and Boheler K. (2005) Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 85, 635-678.



**Figure 1**

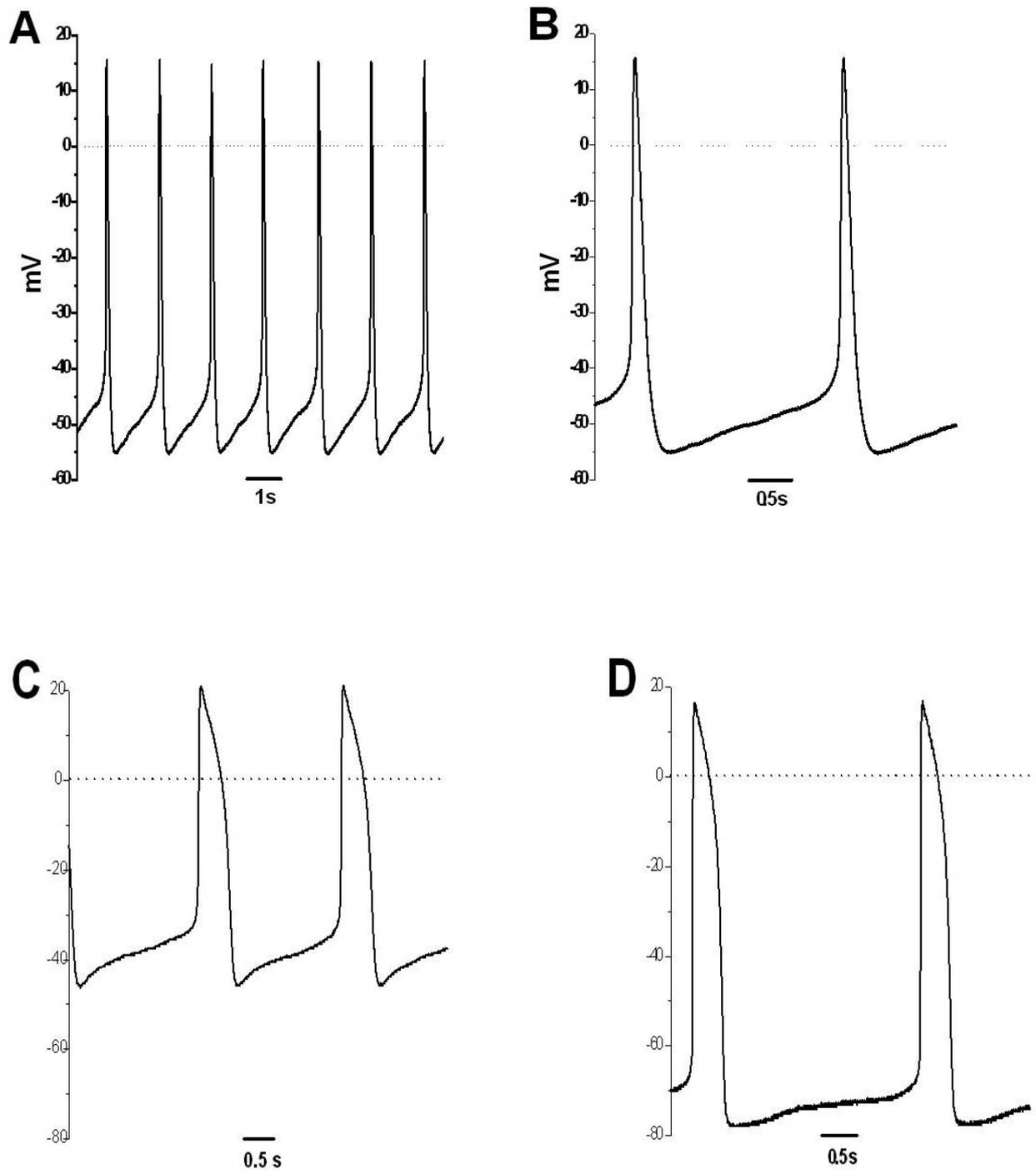
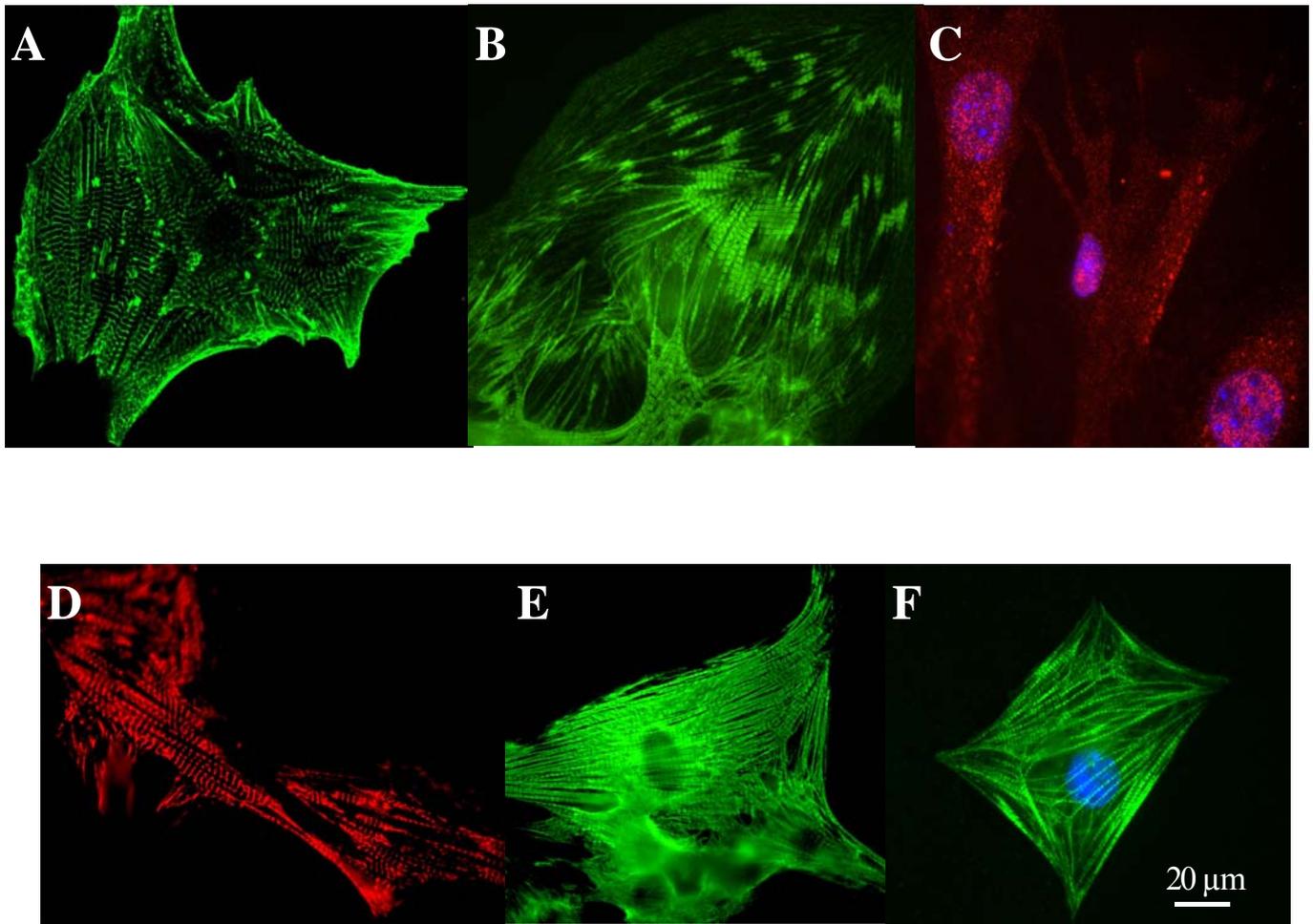
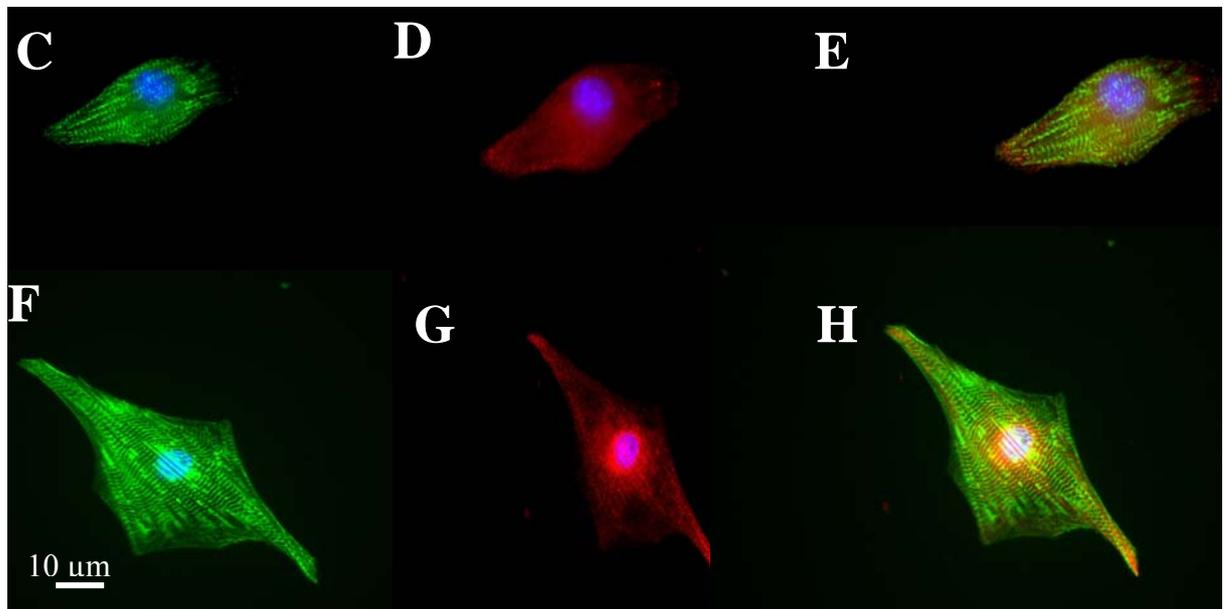
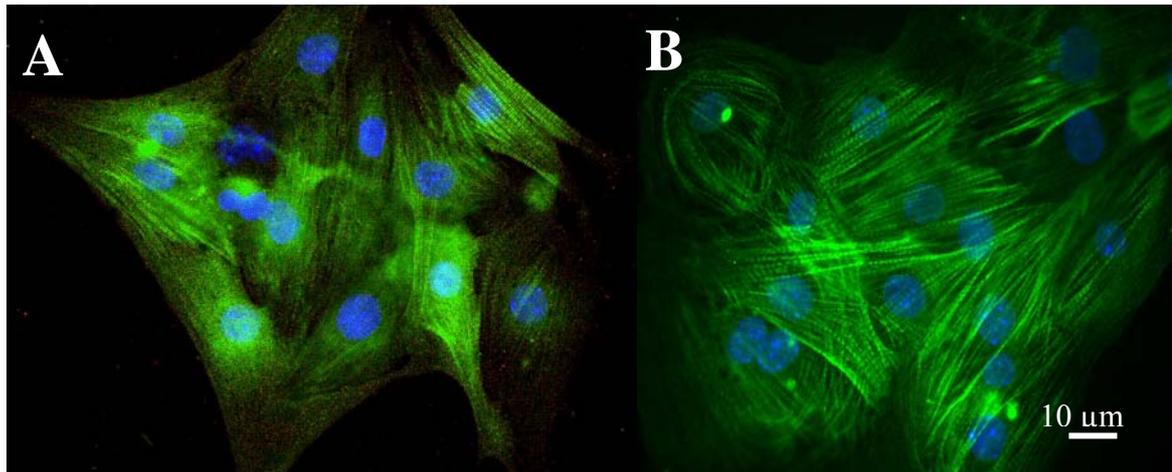


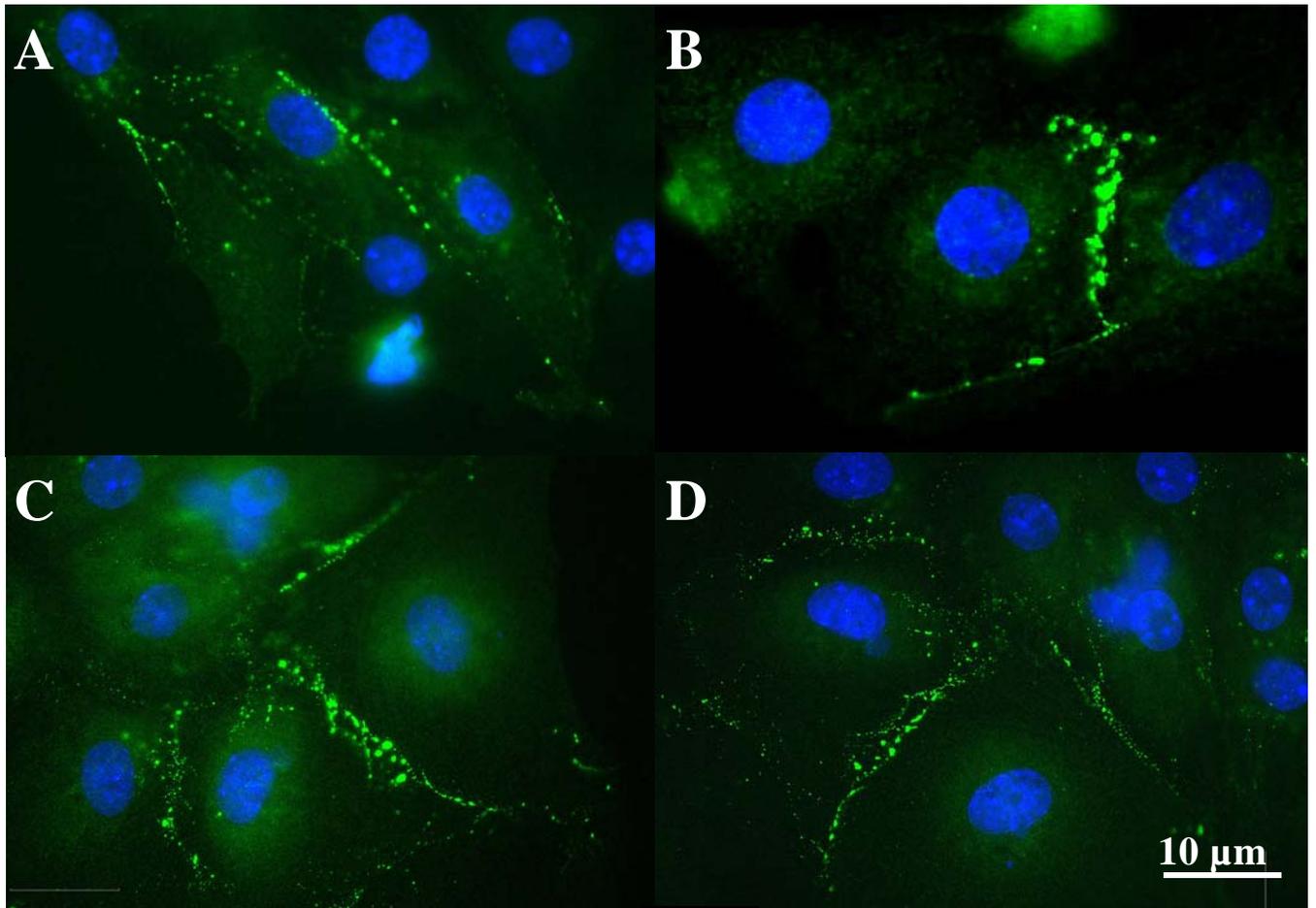
Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

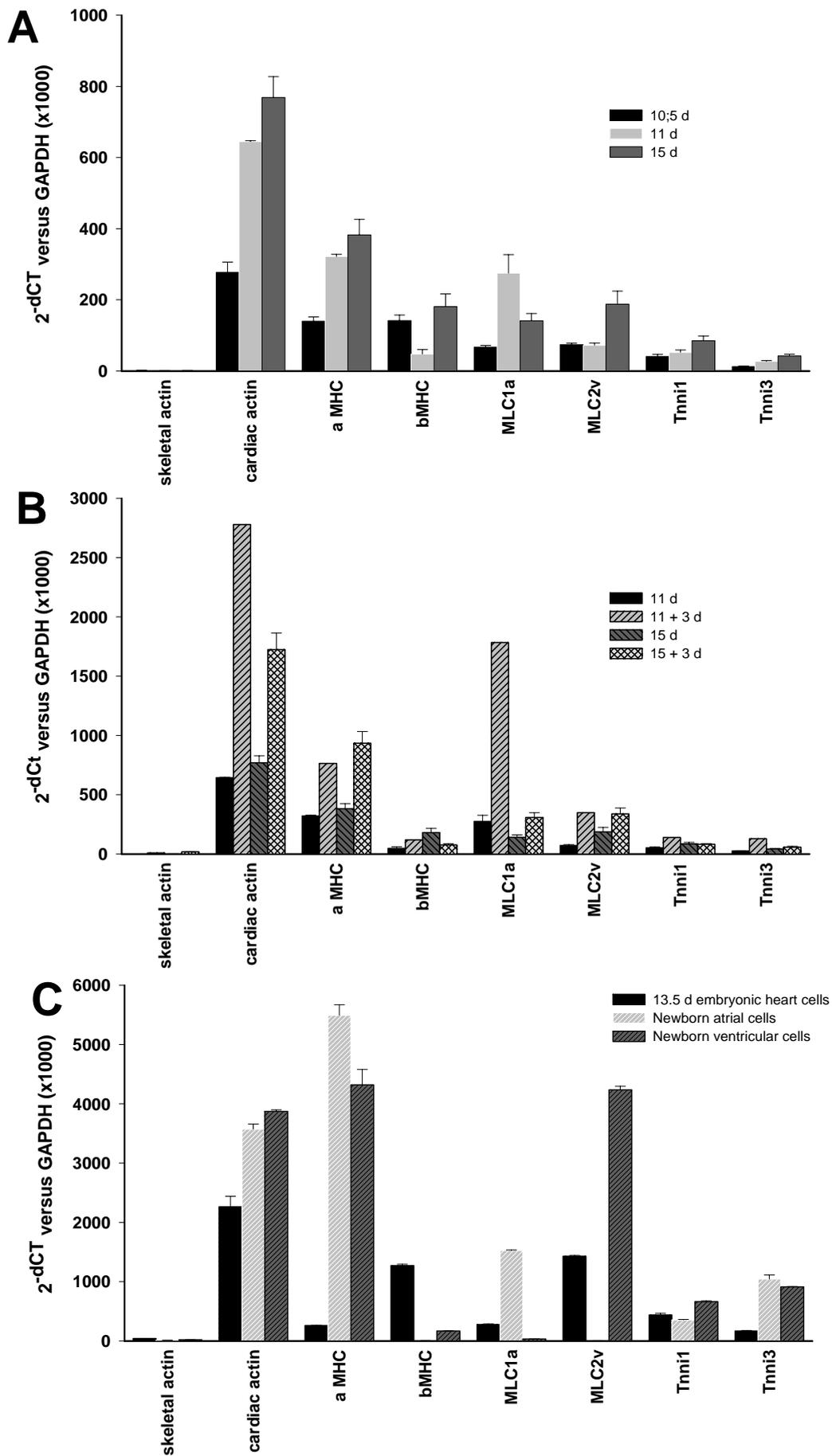


Figure 6

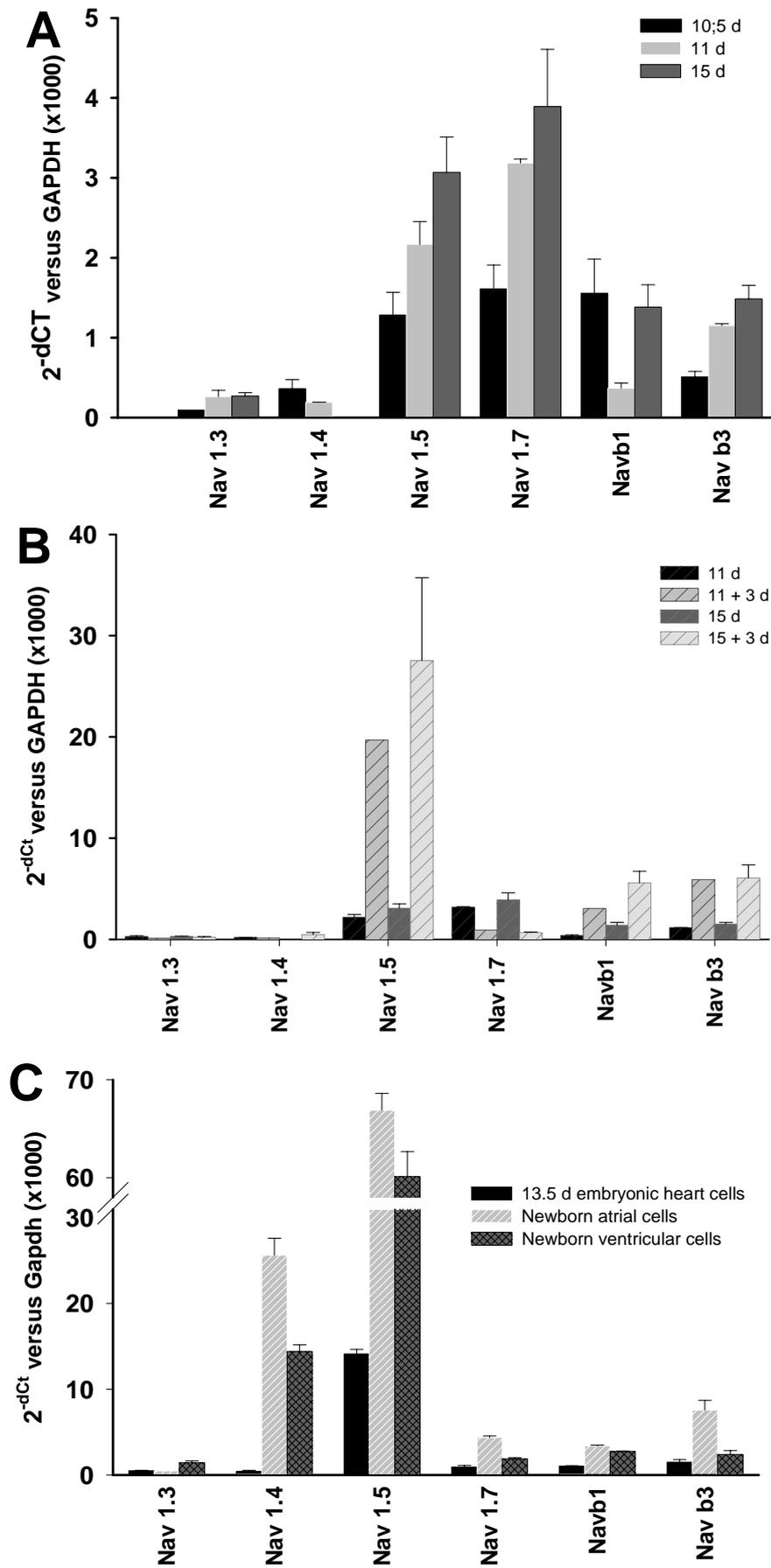


Figure 7

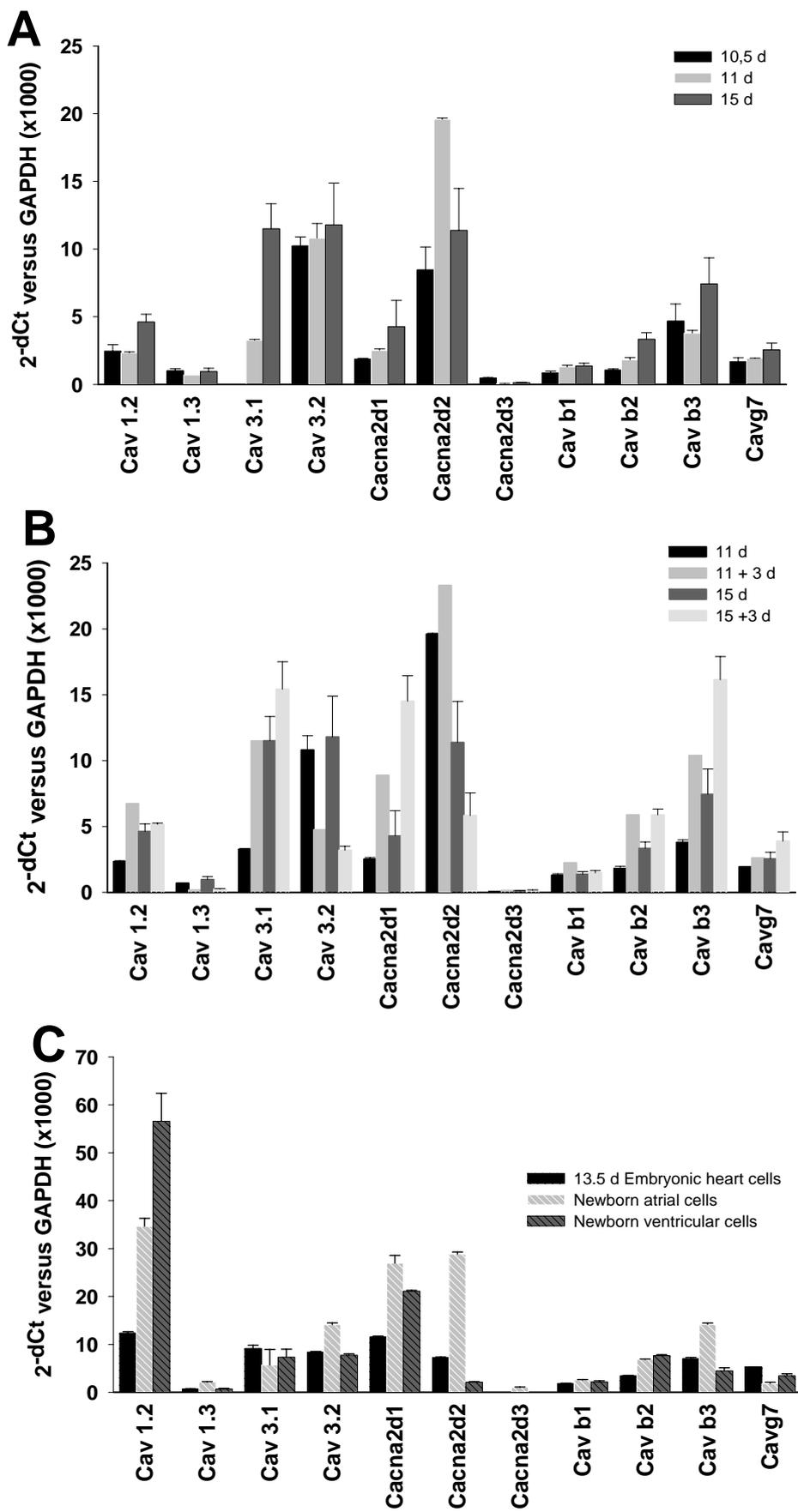


Figure 8

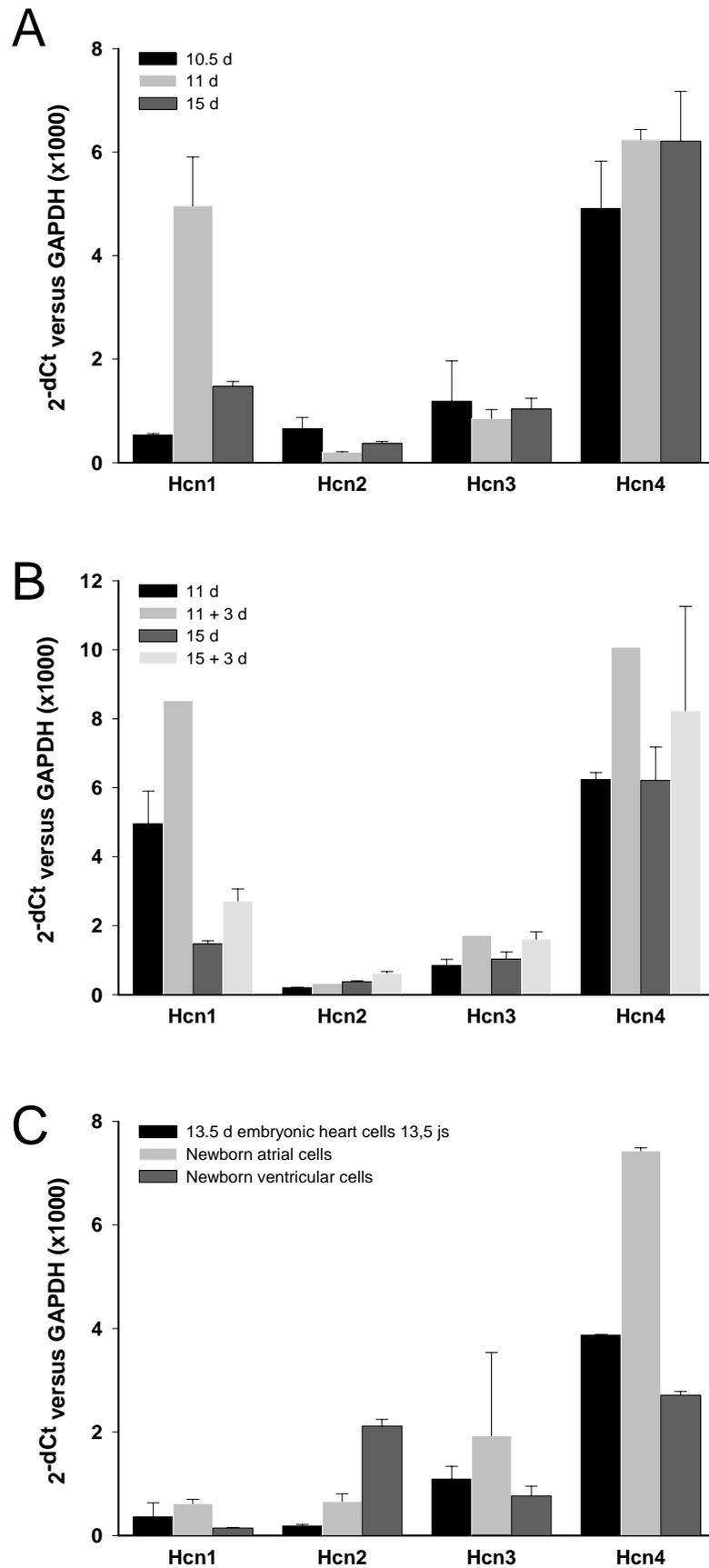


Figure 12

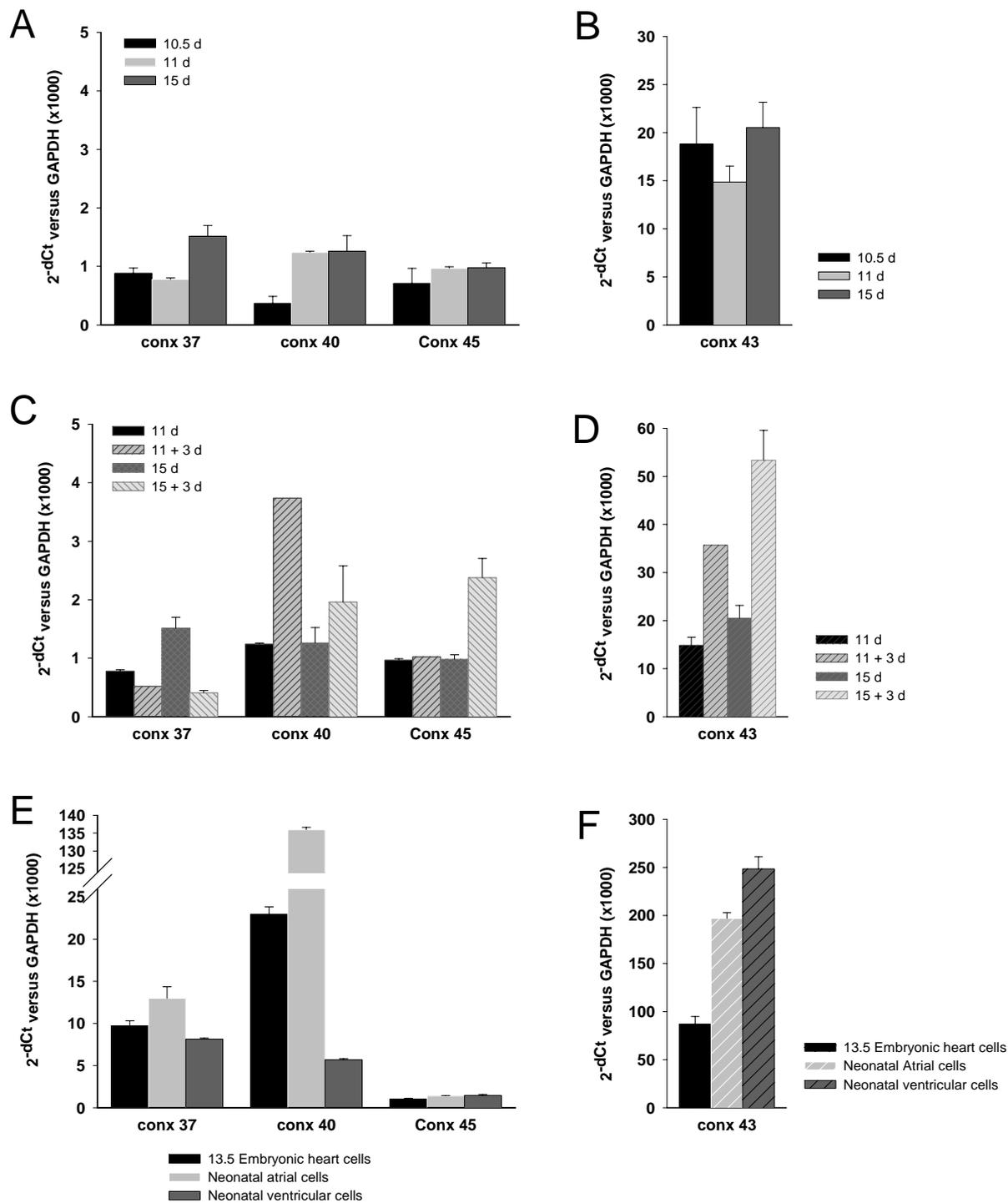


Figure 13

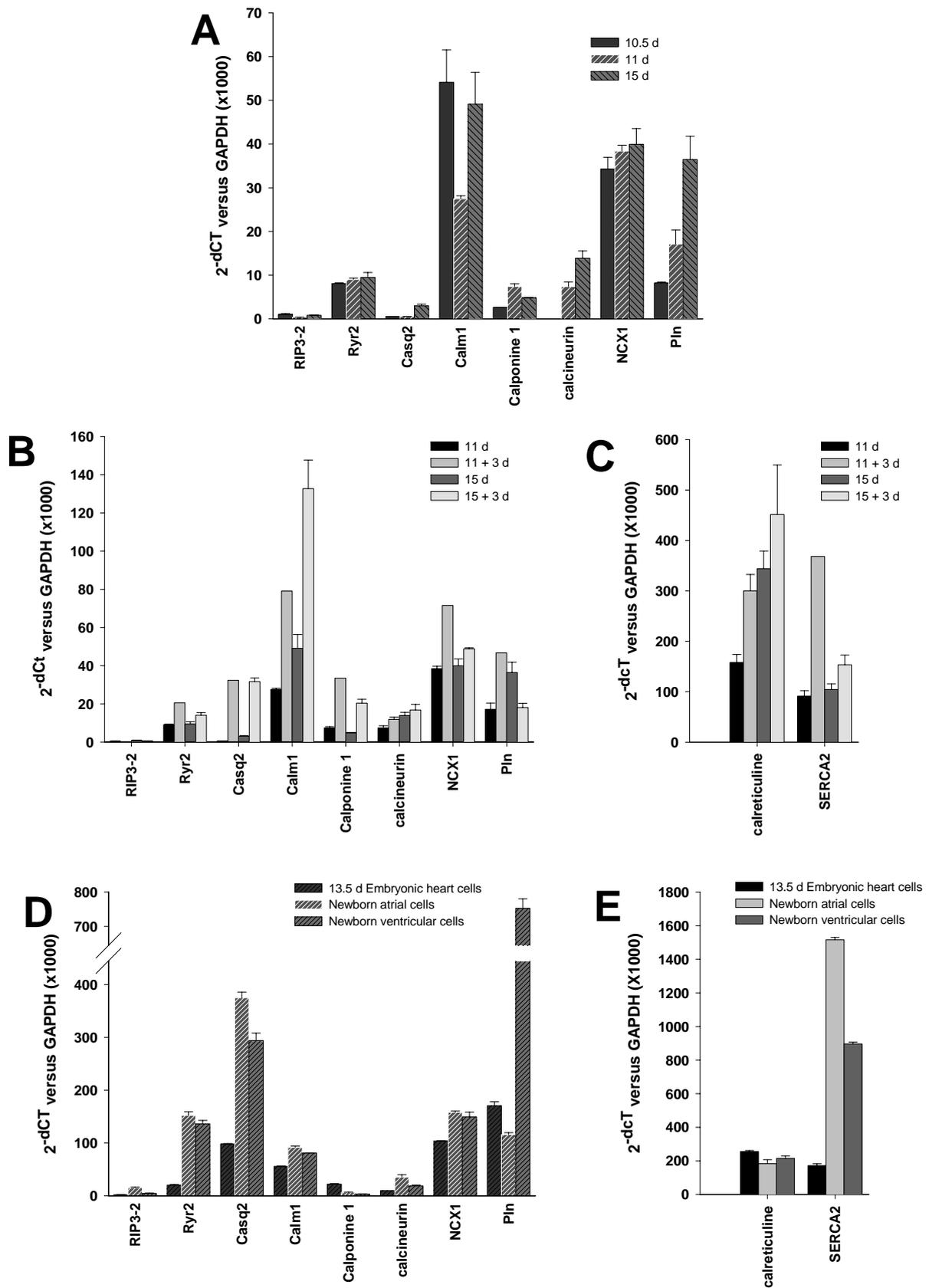


Figure 14

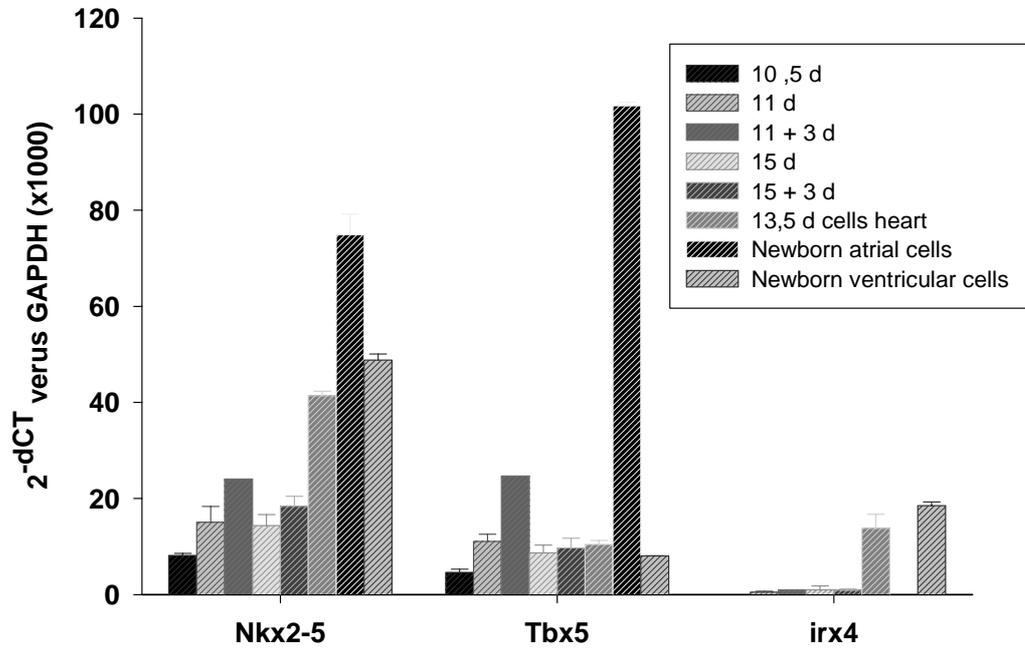


Figure 15

## Figures Legend

### Figure 1

Quantification of spontaneously beating embryonic bodies as a function of the time course of differentiation. Each day after inducing the differentiation the amount of EB showing a spontaneous activity was evaluated by eye microscopy and expressed as the percentage of the number of EBs.

### Figure 2

Action potentials recorded from ES-derived cardiomyocytes isolated from 11 days EBs (A and B) and from 15 days EBs (C and D).

### Figure 3

Immunostaining of cardiac cells for specific proteins. Cells isolated either from 11 days embryonic bodies (A, B and C) or 15 days EBs (D, E and F) were stained with anti-sarcomeric  $\alpha$ -actinin (A and D), anti  $\beta$ -myosin heavy chain (B and E) and anti-myosin light chain -2v (C and F) antibodies.

### Figure 4

Immunostaining of isolated 11 days (A, C-E) and 15 days (B, F-H) cardiac cells for the isoform 2 of the atrial myosin light chain (MLC2a, A and B), sarcomeric  $\alpha$ -actinin (C and F), sarco-endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2, B and F).

### Figure 5

Immunostaining of ES-derived cardiac cells for connexin 43. Cardiomyocytes were isolated from 11 days (A and B) and from 15 days (C and D) EBs.

**Figure 6**

Expression pattern of genes encoding for regionally distributed contractile proteins in ES-derived cardiomyocytes immediately after isolation from the EBs (A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B), in 13.5 days p.c. and 2 days neonatal cardiac cells (C). The relative quantities of the different genes, cardiac  $\alpha$ -actin;  $\alpha$ -myosin heavy chain;  $\alpha$ -MHC;  $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC; isoform 1 of atrial myosin light chain, MLC1a, isoform 2 of ventricular myosin light chain, MLC2v; slow skeletal troponin I, Tnni1; and cardiac troponin I, Tnni3, were expressed as ratios versus glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH, x 1000). Means  $\pm$  S.E.M. from 3 pools for 10.5 days (10.5d), 2 pools for 11 days (11d) and 4 pools for 15 days (15d) ES cells-derived cardiomyocytes, 3 pools for 13.5 days (13.5d) embryonic heart cells, and 2 pools for newborn cardiac cells.

**Figure 7**

Expression profile of  $\text{Na}^+$  channel genes and the genes of their subunits in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (C).

**Figure 8**

Expression profile of  $\text{Ca}^{2+}$  channel genes and the genes of their subunits in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (C).

**Figure 9**

Expression profile of  $\text{K}^+$  channel genes in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A) and after maintaining these cells in culture for 3 days (B)

**Figure 10**

Expression profile of K<sup>+</sup> channel genes in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells.

**Figure 11**

Expression profile of K<sup>+</sup> channel auxiliary subunits genes in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (C).

**Figure 12**

Expression profile of HCN channel genes in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (C).

**Figure 13**

Expression profile of Connexin 37, 40 and 45 in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (C) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (E). The expression profile for connexin 43 in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; B), after maintaining these cells in culture for 3 days (D) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (F).

**Figure 14**

Expression profile of genes encoding for proteins involved in intracellular calcium homeostasis in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days; A), after maintaining these cells in culture for 3 days (B and C) and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells (D and E).

**Figure 15**

Expression profile of genes encoding for transcription factor Nkx2-5, TBX5 and Irx4 in ES-derived cardiomyocytes at three different stages of differentiation (10.5, 11 and 15 days), after maintaining these cells in culture for 3 days and in 13.5 days p.c. and newborn cardiac cells .

## **Partie II**

### **Co-culture des cardiomyocytes dérivés des cellules ES et des cardiomyocytes néonataux**

## **Influence de la niche sur la différenciation cardiomyocytaire**

Il est connu que l'environnement des cellules souches conditionne leur différenciation, quelque soit le type de cellules souches, adultes ou embryonnaires. Les travaux du groupe d'Anversa mettent bien en évidence cela. En effet, les cellules souches hématopoïétiques injectées dans la zone bordante d'un cœur infarci se différencient en cardiomyocytes et en cellules vasculaires, ce qui permet un gain de fonction de ce cœur greffé (Kadjura *et al.*, 2005 ; Orlic *et al.*, 2002). Dans le cas des cellules souches embryonnaires, des travaux réalisés *in vitro* montrent que les cellules ES co-cultivées avec des cardiomyocytes de rats néonataux, se différencient en cellules cardiaques (Befhard *et al.*, 2002). Une telle induction de la différenciation cardiomyocytaire est également observée *in vivo*. L'injection de cellules ES dans le myocarde de rat ayant préalablement subi un épisode ischémique, permet l'intégration de cellules ES qui se différencient en cardiomyocytes. Il en est de même lorsque ce type d'injection est réalisé chez le mouton (Menard *et al.*, 2005). De plus, il a été montré dans ce dernier cas, que les cardiomyocytes dérivant des cellules ES sont électriquement couplés aux cardiomyocytes de l'hôte. Ceci semblerait se faire par des jonctions communicantes mettant en jeu la connexine 43 (Menard *et al.*, 2005). En ce qui concerne les cardiomyocytes obtenus par différenciation des cellules ES, il existe à notre connaissance deux travaux réalisés *in vivo* sur ce sujet. Le premier d'entre eux, a été réalisé par le groupe de Field. Ils ont montré qu'une population pure, hautement différenciée, de cardiomyocytes dérivés des cellules ES murines pouvait s'implanter dans des cœurs de souris dystrophiques, se connecter au tissu environnant, et donner des cardiomyocytes exprimant la dystrophine (Klug *et al.*, 1996). Cette greffe a pu être maintenue pendant 7 semaines. D'autre part, le groupe de Gepstein en utilisant un modèle animal (porc) présentant un bloc atrio-ventriculaire a montré que l'injection de « clusters » de cellules cardiaques obtenues par dissection laser de corps embryoides dérivés de cellules ES humaines, permet de surmonter ce bloc atrio-ventriculaire par induction d'un foyer pacemaker qui pilote le rythme ventriculaire (Kehat *et al.*, 2004). Il existe une connexion entre les cellules hôtes et les cellules du greffon ; c'est le premier cas connu d'un pacemaker biologique. De même, ces auteurs ont montré que ces « clusters » de cellules cardiaques s'implantent dans les cultures de cellules néonatales de rats et contrôlent le rythme de ceux-ci (Kehat *et al.*, 2004). Ces

« clusters » sont isolés à des stades précoces de la différenciation entre 7 et 10 jours. La stimulation par l'isoproterenol, un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, conduit à une accélération du rythme cardiaque dans ces co-cultures ; à l'inverse l'utilisation d'un découplant des jonctions, l'hépatanol, conduit à une abolition du couplage entre ces deux cultures, suggérant une connexion étroite. Le marquage par la connexine 43 confirme cette interaction.

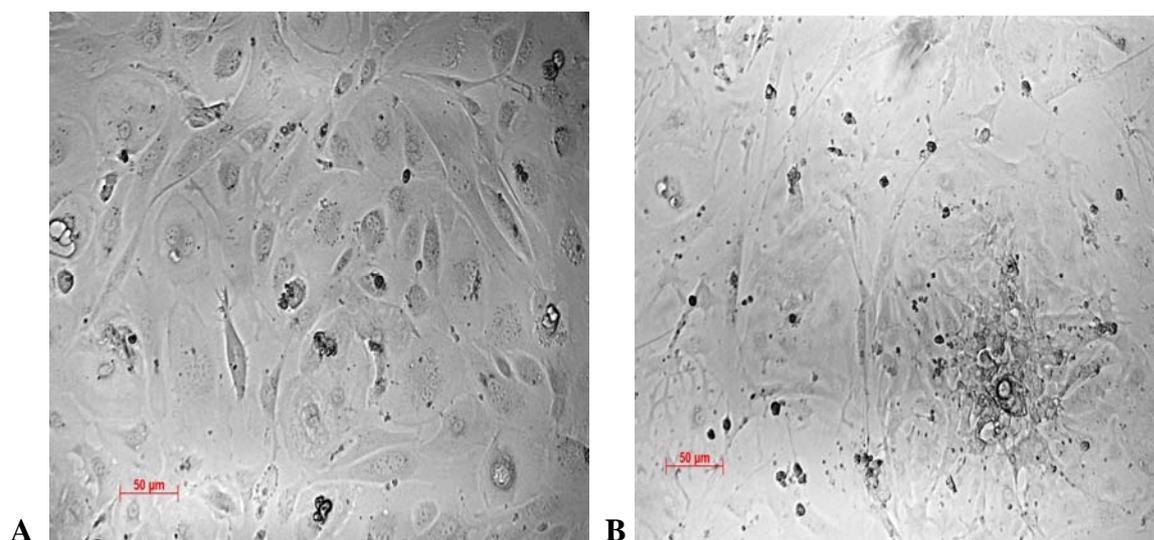
Nous nous sommes posés deux questions : (1) Les cardiomyocytes issus de la différenciation des cellules ES s'implantent-ils de manière équivalente dans le myocarde ventriculaire ou atrial ?

(2) Est-ce que le stade de différenciation intervient dans la survie de ces greffons ? Ceci revient à rechercher l'influence de la niche sur le greffon.

Afin d'analyser les effets de la niche cardiaque sur l'orientation de la différenciation, les cardiomyocytes dérivés des cellules ES à des stades précoces (11 jours) ou tardifs (15 jours) sont co-cultivés avec des cardiomyocytes néonataux de type atrial ou ventriculaire.

## **I. Culture des cardiomyocytes néonataux**

Ces cardiomyocytes sont obtenus à partir de cœurs de souriceaux âgés de deux jours. Les oreillettes et les ventricules sont séparés, puis les tissus sont dissociés par action enzymatique, comme décrit dans le paragraphe IX Matériels et Méthodes. Après 5 cycles de 20 min, les cardiomyocytes de chaque type sont récupérés etensemencés dans une boîte de Pétri. Comme précédemment, l'adhésion différentielle sur support plastique a été utilisée afin d'éliminer les fibroblastes. Les cellules cardiaques sont mises en culture sur des lamelles de verre recouvertes de laminine à raison de 100 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits, en présence d'un milieu de culture contenant 5% de sérum de veau foetal et 10% de sérum de cheval. Celui-ci permet de favoriser la prolifération des cellules néonatales. Vingt quatre heures après ensemencement, 90% des cardiomyocytes ont adhéré au support. La figure ci-dessous montre une culture de cardiomyocytes atriaux et ventriculaires après quatre jours d'ensemencement.



**Figure 49: Cardiomyocytes néonataux obtenus à partir de cœurs de souris de 2 jours et ensemencés à raison de 100 000 cellules par puits.** Cellules de type atrial après 4 jours de culture A). Cellules de type ventriculaire après 4 jours de culture B).

Les cellules ventriculaires néonatales battent spontanément 24 heures après ensemencement. A l'inverse, les cellules néonatales de type atrial battent avec un décalage de 24 heures. Ces dernières présentent de petits foyers sporadiques et en aucun cas un syncytium, comme observé dans les cellules de cardiomyocytes ventriculaires néonataux.

## II. Co-Culture de cellules cardiaques isolées à différents stades de différenciation

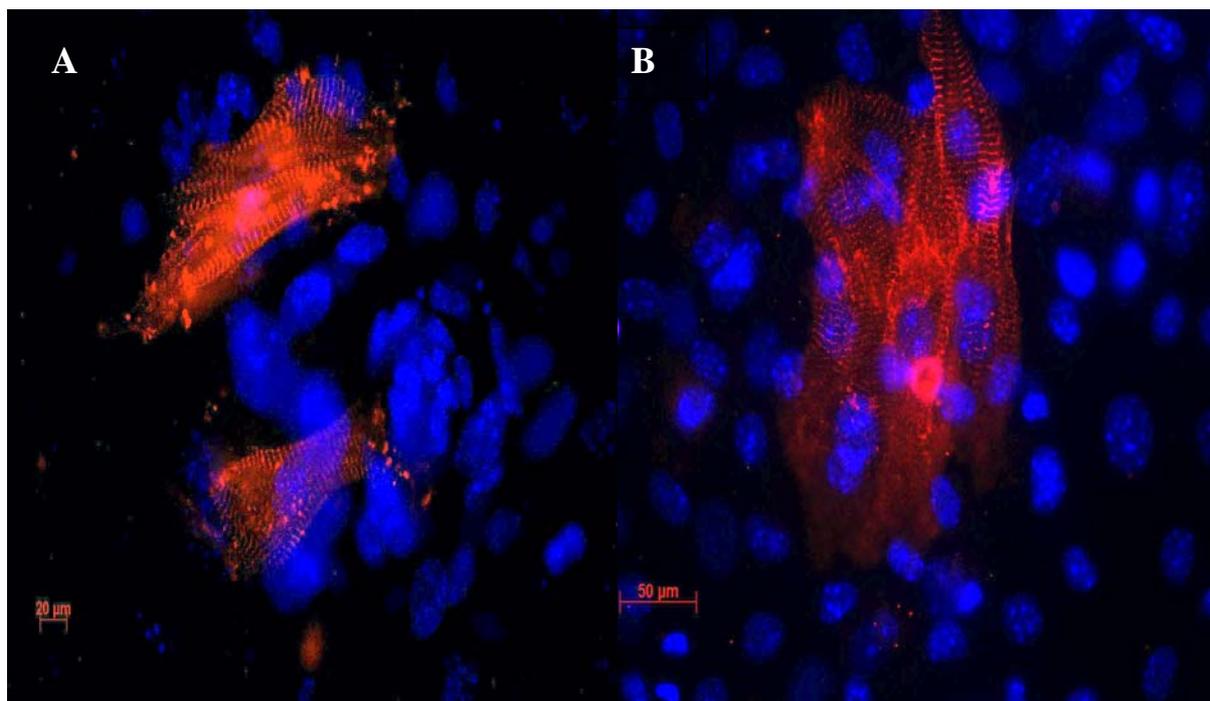
Afin d'étudier les effets de la niche sur le déterminisme des cellules cardiaques dérivées des ES, des cardiomyocytes isolés à différents stades de la différenciation sont marqués avec la sonde CFDA-SE. Cette dernière va réagir avec les fonctions amines des protéines de la cellule, ce qui permet de piéger la sonde dans le cytoplasme. Cette dernière présente donc l'avantage de ne pas être diffusable d'une cellule à l'autre et de se maintenir au moins 4 jours dans une cellule. Vingt quatre à quarante huit heures après la mise en culture des cellules cardiaques néonatales, 10 000 cellules cardiaques dérivées des ES marquées, sont ensemencées. Le milieu de différenciation des cellules ES est utilisé dans cette co-culture. Les cellules cardiaques s'implantent au sein de ces cultures comme l'illustre la figure 50. La présence de cellules unitaires et de très petits « clusters » arrondis est observée. Il est à noter que très peu de cellules sont greffées. Nous avons contrôlé l'effet du milieu de

différenciation sur la survie des cellules néonatales et nous n'avons observé aucune modification morphologique. Néanmoins, les battements dans les cellules de type atrial ne sont plus observés dans ces conditions ; à l'inverse, la co-culture ne modifie pas les battements des cellules néonatales ventriculaires.

Après trois jours de co-culture, le phénotype des cellules cardiaques dérivées des ES est étudié par immunomarquage.

### III. Phénotype des cellules cardiaques dérivées des cellules ES cultivées pendant 3 jours avec des cardiomyocytes néonataux

Afin de vérifier que l'intégrité structurale des cellules ventriculaires néonatales est conservée dans ces conditions de culture, un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre l' $\alpha$  actinine cardiaque a été réalisé. Comme illustré dans la figure 51 ci-dessous, les cardiomyocytes néonataux conservent l'organisation sarcomérique spécifique des cellules cardiaques.



**Figure 51 : Immunomarquage des cellules ventriculaires néonatales avec un anticorps dirigé contre l' $\alpha$ -actinine cardiaque (grossissement x 63). A) Cellules cardiaques cultivées en milieu contenant 5% de sérum de veau foetal et 10% de sérum de cheval. B) Cellules cardiaques cultivées en milieu de différenciation. Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu)**

Afin d'étudier l'influence des cellules néonatales sur le phénotype des cardiomyocytes greffés, des immunomarquages avec des anticorps dirigés contre la chaîne légère de la myosine de type ventriculaire (MLC2v) sont réalisés. Les figures 52 et 53 sont réalisées en microscopie confocale selon un axe horizontal. Les cellules néonatales sont marquées avec un anticorps MLC2v couplé à un anticorps secondaire rhodamine. Les cellules cardiaques sont marquées avec la sonde CFDA-SE qui émet dans la longueur d'onde du FITC. Si ces cellules greffées expriment MLC2v, une coloration jaune devrait être visible, ce qui n'est pas le cas. Ces résultats suggèrent que l'orientation de ces cellules à des stades précoces (11 jours) ou intermédiaires de la différenciation (15 jours) en cellules ventriculaires, n'a pas été induite dans ces conditions. Des co-cultures réalisées avec des cardiomyocytes isolés à 11 et 15 jours de différenciation et des cellules néonatales atriales sont actuellement en cours.

Le couplage des cardiomyocytes dérivés des cellules ES et des cellules cardiaques néonatales, a été étudié par un marquage avec un anticorps dirigé contre la connexine 43. Les figures 54 et 55 ont été réalisées en microscopie confocale selon respectivement un empilement de plans sériés virtuels « Z-stac » horizontaux et verticaux. Ceci montre d'une part, que les « clusters » de cellules cardiaques sont parfaitement connectés entre eux par la connexine 43 (figure 54). D'autre part, on peut noter l'existence d'un couplage entre ces cellules et les cardiomyocytes néonataux au niveau des contacts membranaires entre ces deux types cellulaires. On remarque que le marquage des connexines 43 est très intense et fusionnel, ce qui démontre un couplage entre ces cellules (figure 55).

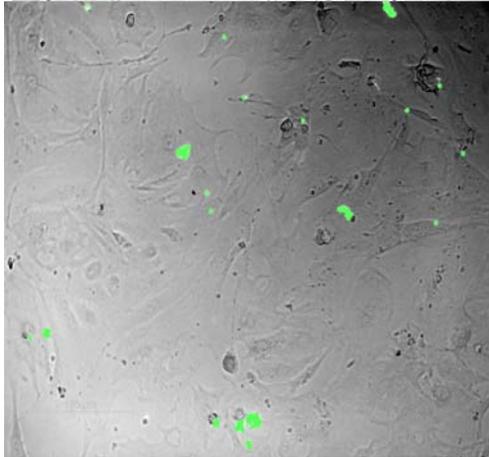
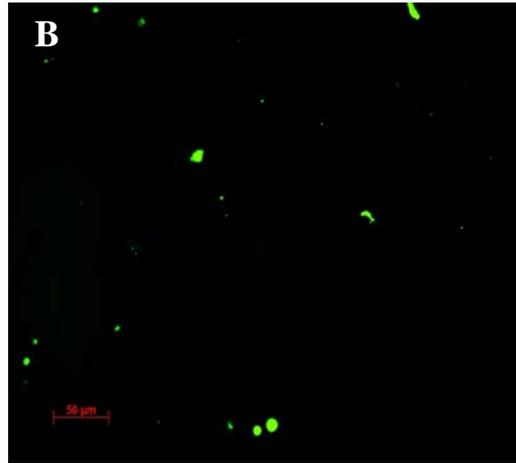
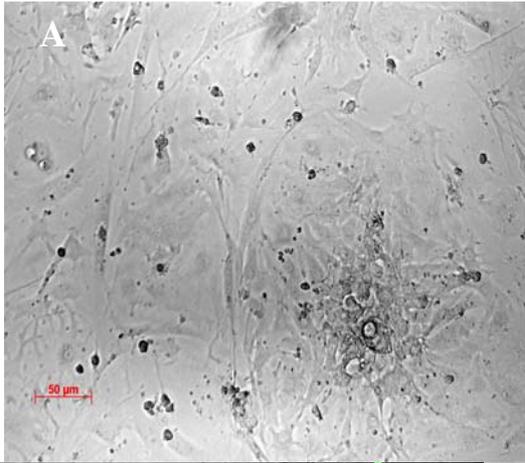
#### **IV. Commentaires et discussion**

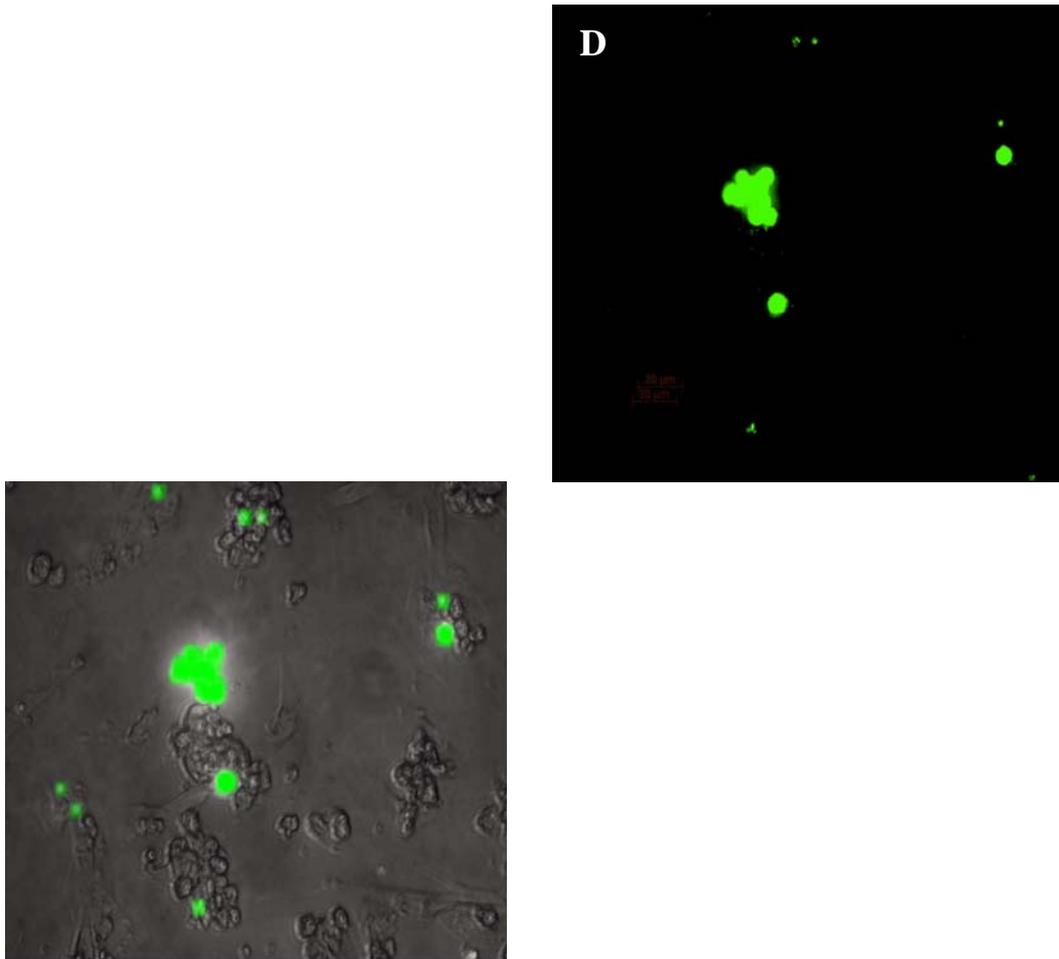
Ces résultats montrent que

- 1) l'orientation des cardiomyocytes isolés à des stades précoces ou plus tardifs de la différenciation vers un type ventriculaire n'est pas induite.
- 2) ces cellules cardiaques peuvent se connecter entre elles au sein d'un même « cluster », et également aux cellules néonatales environnantes.

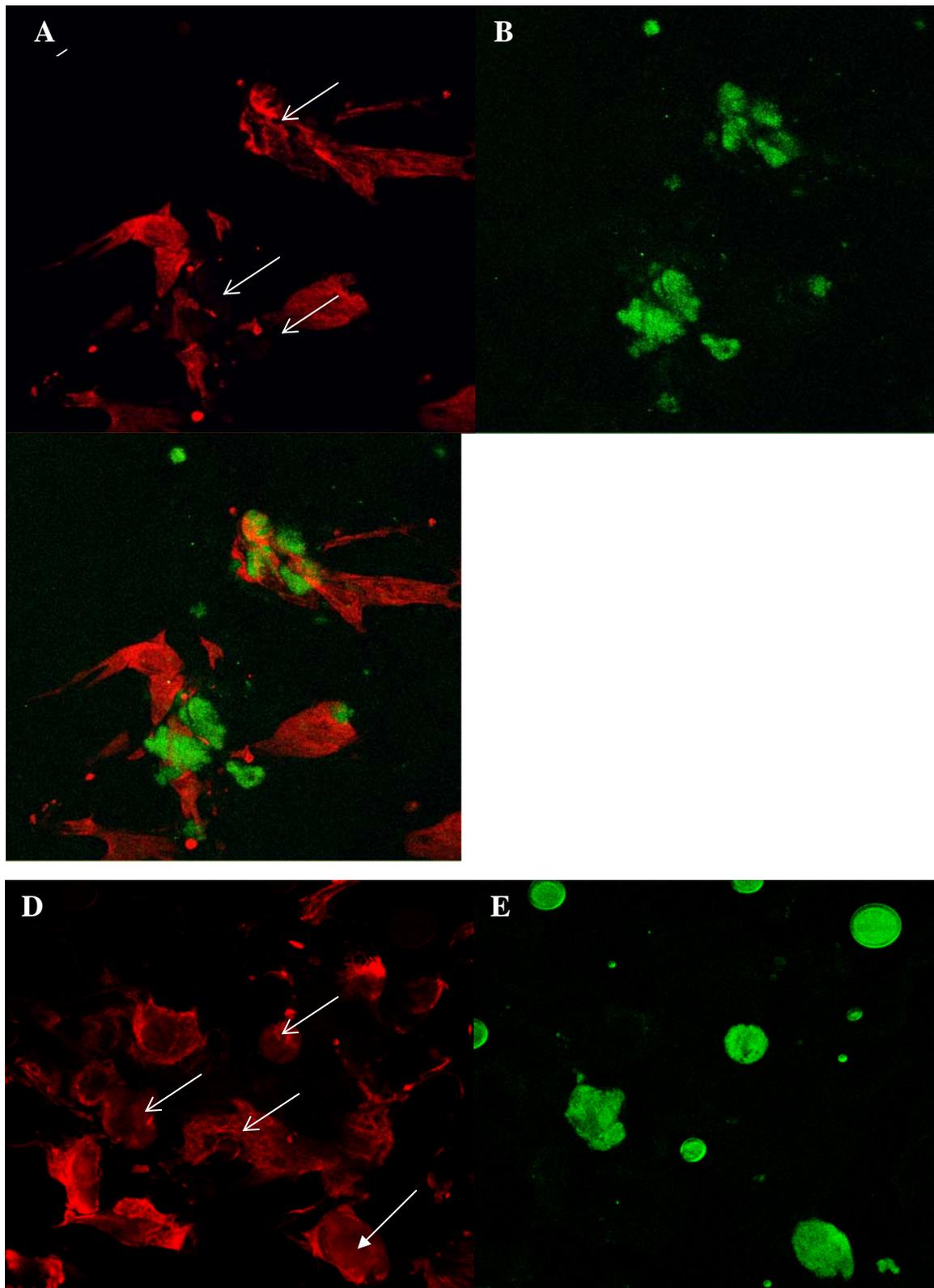
Néanmoins, la sonde CFDA-SE réagissant avec toutes les protéines du cytoplasme des cellules cardiaques, le marquage avec l'anticorps dirigé contre MLC2v est peut-être masqué. Par ailleurs, une foisensemencées, peu de cellules se sont implantées sur les

cellules néonatales ventriculaires, quelque soit le stade de différenciation. Ceci résulte d'un taux de mortalité important dans nos conditions. Cette mortalité peut s'expliquer par le degré de différenciation de nos cellules. En effet, il est connu que, plus les cellules cardiaques sont différenciées et moins, il est facile de les isoler. Dans ce cadre, nos résultats suggèrent que les cellules cardiaques hautement différenciées ont pu être perdues ; les cellules les moins différenciées pouvant probablement s'apparenter à des cellules de type pacemaker ou progéniteurs cardiaques précoces, se sont implantées.

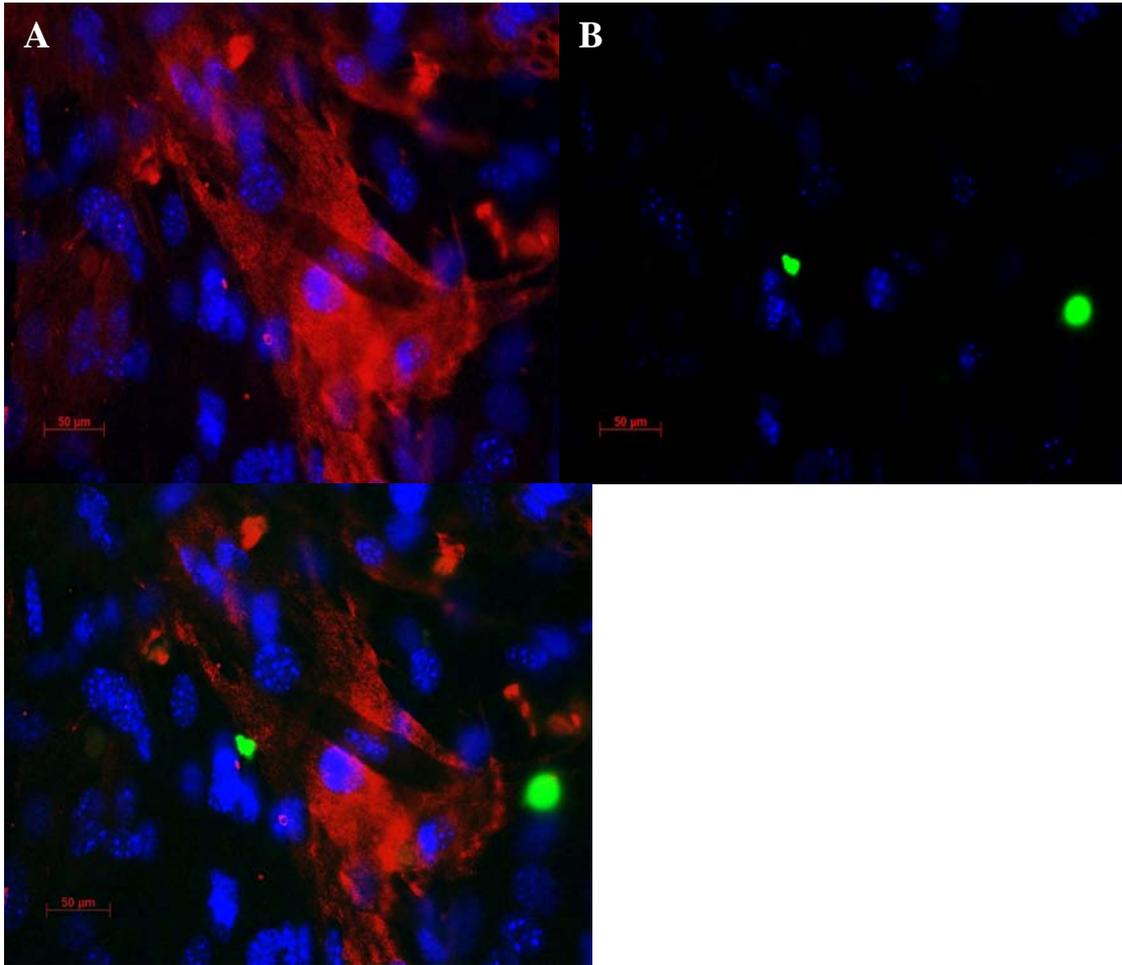


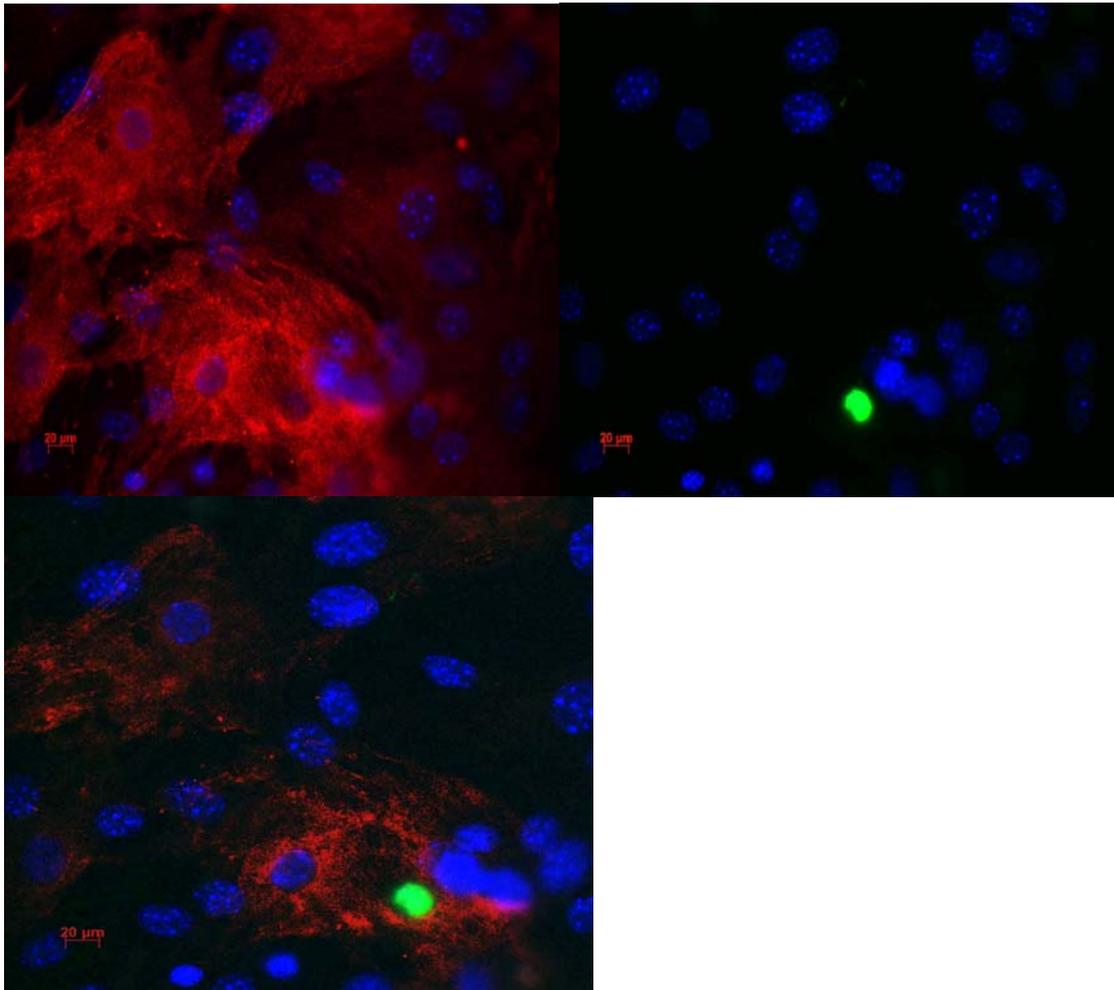


**Figure 50: Co-culture de cellules néonatales ventriculaires avec des cellules cardiaques dérivées de cellules ES isolées à 11 jours de différenciation et marquées au CFDA-SE, après 3 jours de culture.** En A) culture de cellules ventriculaires en contraste de phase (grossissement x 20), B et D) Cellules cardiaques à 11 jours de différenciation marquées au CFDA-SE. Cet E) superposition des deux images. En bas, (grossissement x 40). Les flèches indiquent la position des cellules cardiaques dérivées des ES.

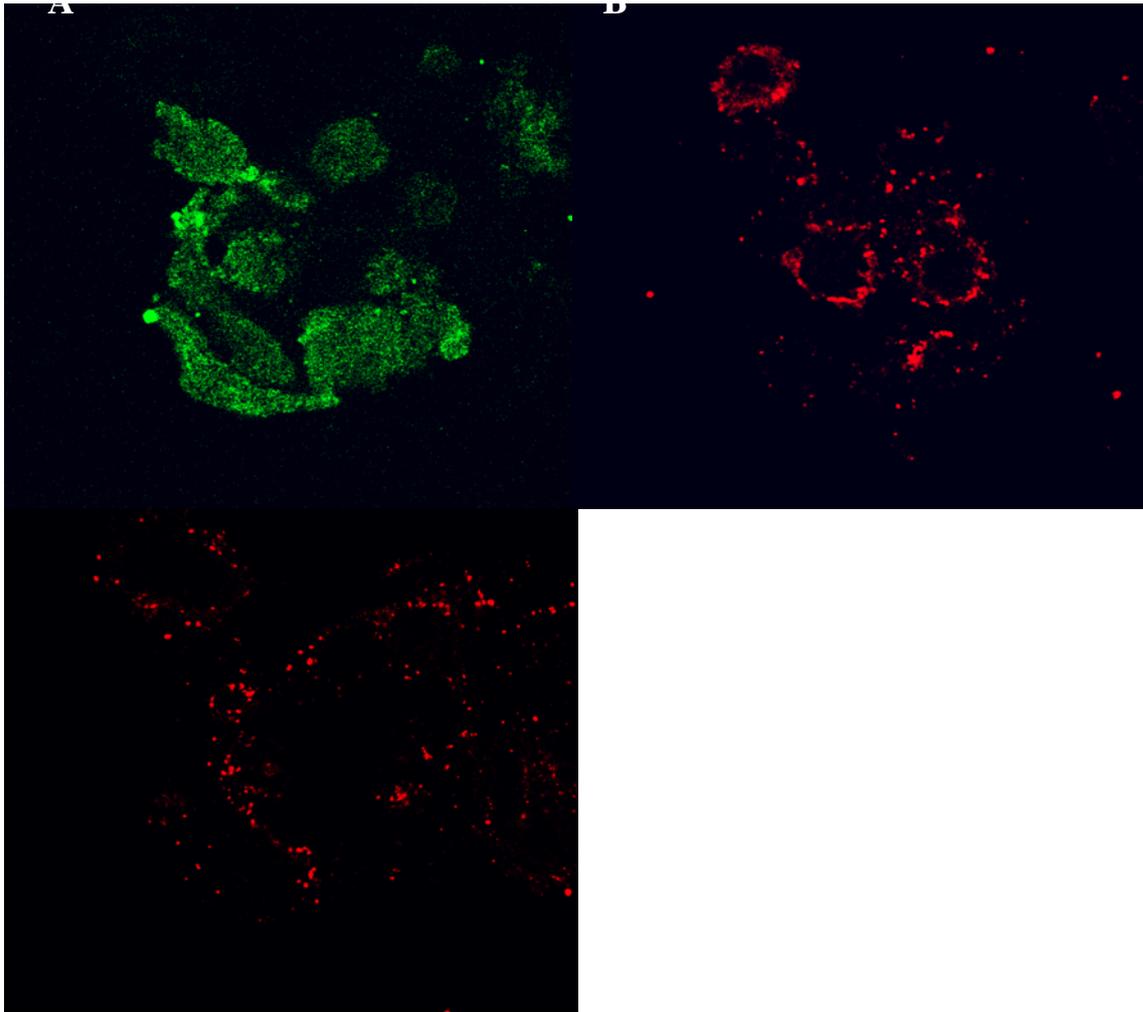


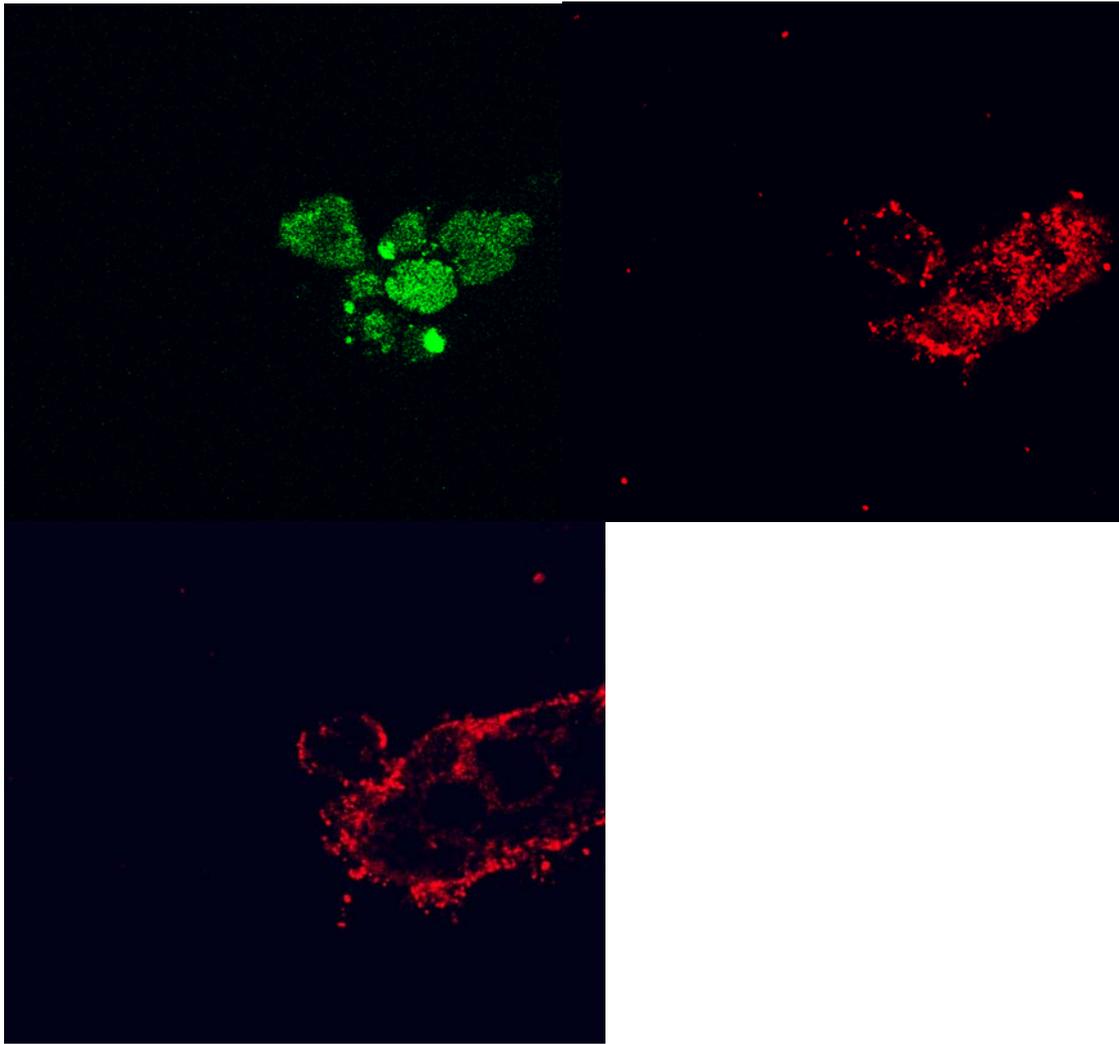
**Figure 52 : Co-culture de cellules cardiaques isolées à 11 jours de différenciation et de cellules cardiaques néonatales ventriculaires marquées avec un anticorps dirigé contre MLC2v.** Les figures ont été réalisées en microscopie confocale, selon un axe horizontal (grossissement x 63). En A et D) cellules néonatales marquées avec MLC2v (en rouge). B et E) cellules cardiaques dérivées des cellules ES isolées à 11 jours de différenciation et marquées au CFDA-SE (en vert). C) superposition des deux images. Les flèches indiquent la localisation des cellules cardiaques dérivées des cellules ES.



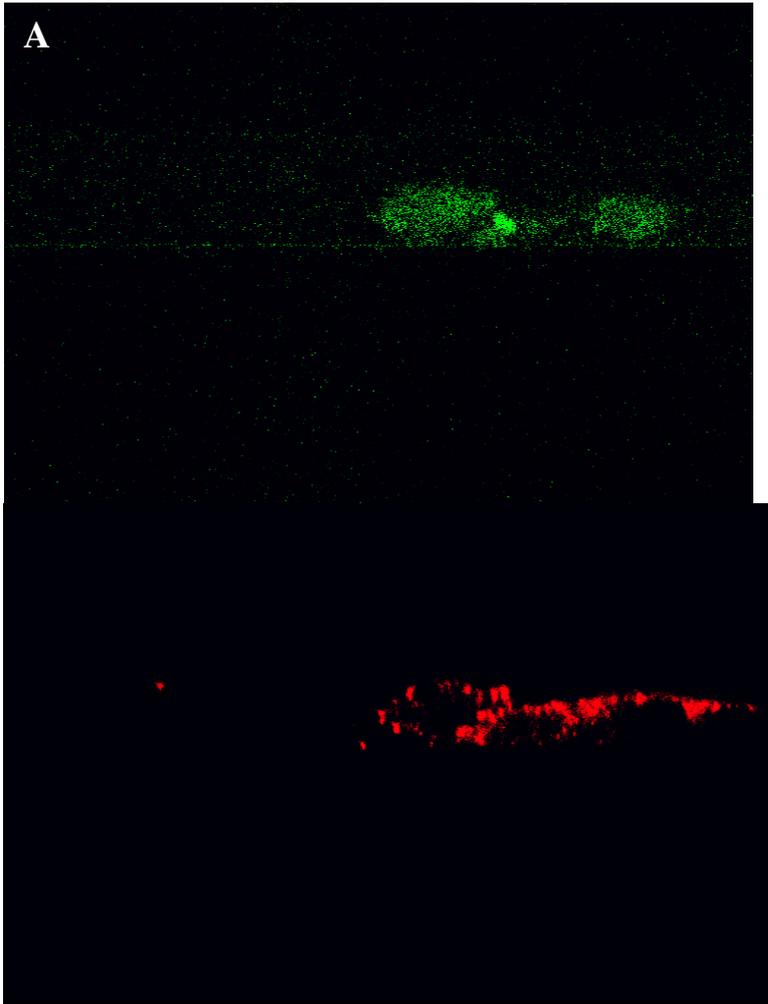


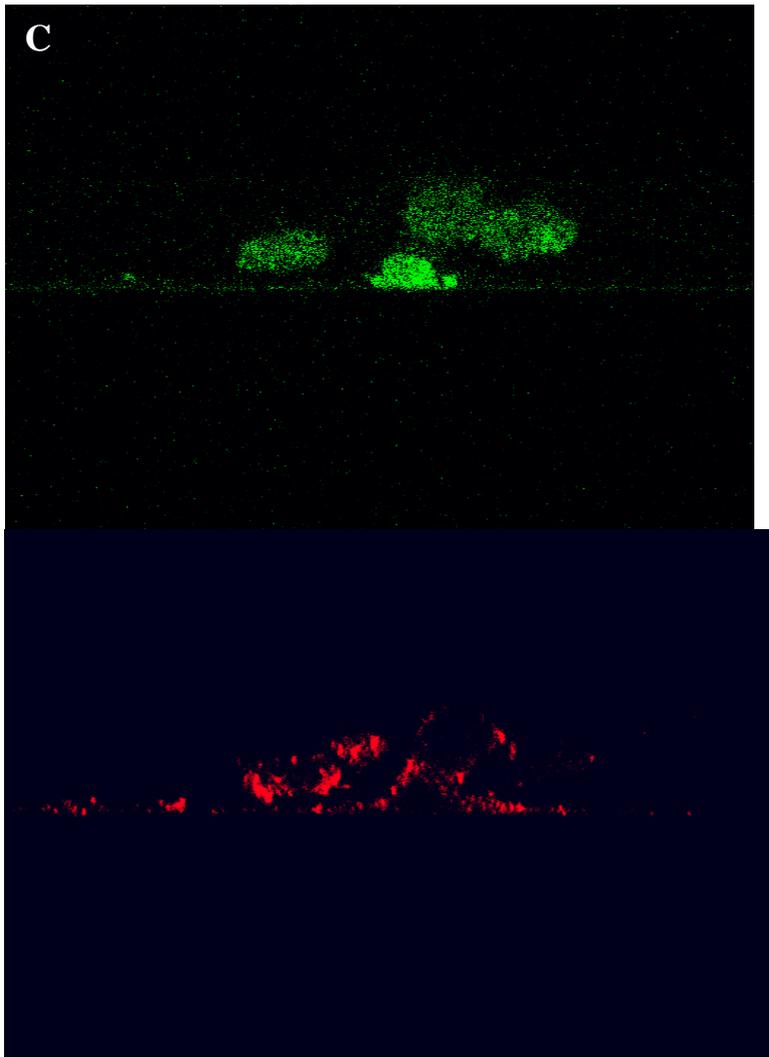
**Figure 53 : Co-culture de cardiomyocytes à 15 jours de différenciation et de cardiomyocytes néonataux ventriculaires marqués avec un anticorps dirigé contre MLC2v.** Les figures ont été réalisées en microscopie à épifluorescence (grossissement x 63). En A et D) les cardiomyocytes néonataux sont marqués avec MLC2v (en rouge) B et E) cellules cardiaques dérivées des ES isolées à 15 jours et marquées avec la sonde CFDA-SE (en vert). C et F) superposition des deux images. Les noyaux sont marqués avec le DAPI (bleu).





**Figure 54: Co-culture de cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation avec des cardiomyocytes néonataux ventriculaires marqués avec la connexine 43.** Les figures ont été réalisées en microscopie confocale, selon un axe horizontal (grossissement x63). En A et D) cellules cardiaques dérivées des ES marquées avec la sonde CFDA-SE. B et E) ces figures illustrent le couplage des cellules cardiaques dérivées des ES entre elles par la connexine 43 (en rouge). C et F) les figures illustrent la présence de connexine 43 dans les cellules cardiaques dérivées des ES et les cellules néonatales ventriculaires.





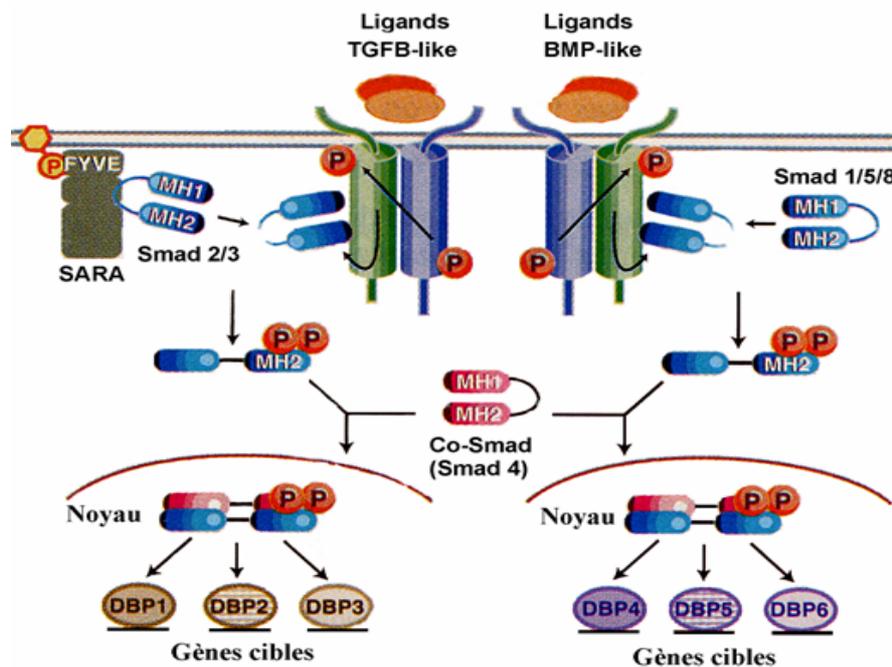
**Figure 55 : Co-culture cardiomyocytes isolés à 11 jours de différenciation avec des cardiomyocytes néonataux ventriculaires marqués avec un anticorps dirigé contre la connexine 43.** Ces figures ont été réalisées, par empilement de coupes sériées virtuels « Z-stac », en microscopie confocale selon un axe verticale. En A et C) La membrane des cellules cardiaques dérivées des ES marquées avec la sonde CFDA-SE. B et D) les figures illustrent les contacts entre les membranes des cellules cardiaques dérivées des cellules ES et celles des cellules néonatales.

## **Partie III**

# Effets du TGF- $\beta$ sur la différenciation des cellules ES

Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance synthétisé par de nombreux types cellulaires comprenant les plaquettes, les cellules du placenta, les cellules de l'os et les cellules rénales (Attisano et Wrana, 2002 ; Cavaillon, 1996). Il appartient à une superfamille comprenant entre autres les « Bone Morphogenetic Protein » (BMPs), et l'activine. Il existe chez les mammifères trois isoformes de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  1, 2 et 3). Le TGF- $\beta$ 1 assure de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaire (Itoh *et al.*, 2000). Toutefois, les effets du TGF- $\beta$  dépendent à la fois de la cible cellulaire et des facteurs de croissance présents dans l'environnement cellulaire. En effet, le TGF- $\beta$ 1 peut soit stimuler la prolifération cellulaire, soit inhiber cette croissance. Un effet prolifératif de cette substance a été démontré dans le cas des fibroblastes (Roberts *et al.*, 1998). Inversement dans les cellules épithéliales, une diminution de la croissance est constatée en présence de TGF- $\beta$ 1 (Cavaillon, 1996, Massague et Wotton, 2000). Par ailleurs, le TGF- $\beta$ 1 est indispensable au développement embryonnaire normal (Miyazono, 2000). En effet, l'inactivation du gène codant pour TGF- $\beta$ 1 chez la souris est létale au stade embryonnaire 10,5 jours. Cette mortalité résulte d'une vascularisation anormale du sac

vitellin (Dickson *et al.*, 1995). Les effets du TGF- $\beta$ 1 mettent en jeu la voie de signalisation impliquant les facteurs de transcription, smads (figure 56).



**Figure 56 : Voies de signalisation du TGF- $\beta$ .** La superfamille du TGF- $\beta$  comprenant entre autres les BMPs se lie à des complexes de récepteurs distincts qui phosphorylent des R-Smads différentes (smads 2 et 3 dans le cadre de la voie du TGF- $\beta$ , et smads 1/5/8 dans celle impliquant les BMPs). Ces derniers forment des complexes hétéromériques avec smad 4. Ces complexes sont ensuite transloqués dans le noyau. Les R-smads reconnaissent différentes protéines de liaison à l'ADN et régulent les gènes-cibles et génèrent des réponses biologiques diverses (d'après Attisano et Wrana, 2002).

Les récepteurs au TGF- $\beta$ 1 sont des récepteurs sérine/thréonine kinases de type I (R $\beta$ I), et de type II (R $\beta$ II). La fixation du TGF- $\beta$  sur R $\beta$ II induit la formation d'un complexe hétérotétramérique composé de deux molécules de chaque type (R $\beta$ I et R $\beta$ II), (Miyazawa *et al.*, 2002). R $\beta$ II confère la spécificité du ligand alors que R $\beta$ I joue le rôle d'effecteur de la réponse au TGF- $\beta$  (Derynck et Feng, 1997). La kinase constitutivement active de R $\beta$ II phosphoryle le R $\beta$ I. Ceci induit l'activation de la kinase de R $\beta$ I, permettant ainsi la transmission du signal à une famille de facteurs de transcription, les smads. Le R $\beta$ I active des R-smads (smad 2 et 3) qui forment des complexes hétéromériques avec une co-smad (smad 4). Ce complexe est transloqué au

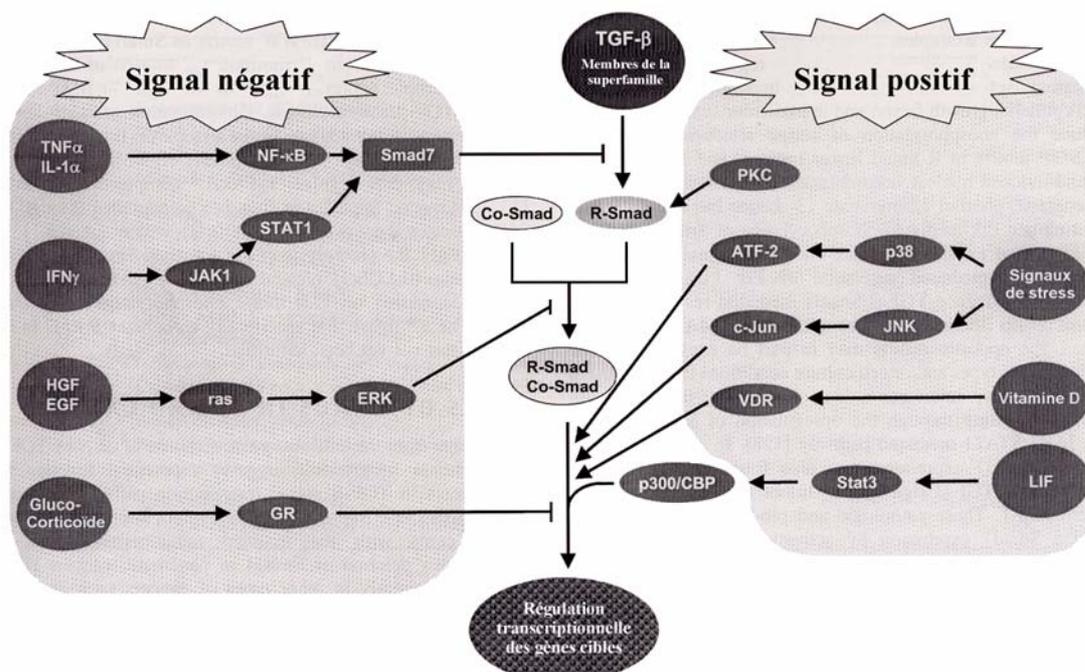
niveau du noyau, où les smads peuvent se lier à des séquences d'ADN consensus, interagir avec des facteurs de transcription et recruter des coactivateurs (CBP/P300) ou corepresseurs transcriptionnels (TGIF, c-Ski et Sno N ; Massague et Chen, 2000). Ceux-ci régulent positivement ou négativement l'expression de gènes-cibles (Attisano et Wrana, 2000, Miyazawa *et al.*, 2002).

D'autre part, cette voie de signalisation est régulée par deux mécanismes différents:

1) Une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant les I-smads (smad 7 et smad 6). Ces protéines conduisent à une modulation de l'intensité et de la durée des réponses de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1. En effet, smad 7 inhibe la phosphorylation des smads 2 et 3 par R $\beta$ I en se liant aux sites de fixation des smads sur ce récepteur (Miyazawa *et al.*, 2002). Le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression de smad 7, contribuant ainsi à la modulation de l'intensité des effets de la voie de signalisation smad 2 et 3 (Attisano *et al.*, 2001 ; Miyazono, 2000).

2) La dégradation rapide des R-smads (smad 2 et 3) par le protéasome est un élément permettant de limiter dans le temps la signalisation activée par le TGF- $\beta$ 1. Ce mécanisme participe donc également à la modulation de cette voie de signalisation (Miyazono, 2000).

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est également finement régulée par des interactions avec d'autres voies de transduction, telles que les voies MAPK, P38 MAPK, JNK et JAK/STAT (Figure 57).



**Figure 57 : Les smads comme intégrateurs du signal.** Le dialogue avec les autres voies de signalisation peut réguler la voie du TGF- $\beta$  négativement ou positivement. Abréviations: ATF: Activating Transcription Factor, CBP CREB Binding Protein, EGF :Epidermal Growth Factor, ERK: Extracellular Regulated Kinase, GR : Glucocorticoïdes Receptor, HGF: Hepatocyte Growth Factor, IFN: Interferon, JNK: c-Jun N-terminal Kinase, LIF : Leukemia Inhibitory Factor, PKC: Protein Kinase C, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, TGF-beta: Transforming Growth Factor, TNF:Tumor Necrosis Factor, VDR: Vitamin D Receptor (D'après Itoh *et al.*, 2000)

Les voies Erk et smads interagissent à différents niveaux. Par exemple, Erk régule négativement l'accumulation nucléaire des R-Smads en phosphorylant leur région « linker ». Par ailleurs, les smads eux-mêmes peuvent être phosphorylés par la mise en jeu de la voie JNK (Massagué et Wotton, 2000). De plus, il existe une boucle de régulation positive des effets de ce facteur de croissance par les facteurs TGF- $\beta$  eux-mêmes. En effet, le TGF- $\beta$ 1 peut agir par une boucle de rétrocontrôle positif sur son expression, mais également sur l'expression de TGF- $\beta$ 2 et 3 (Miyazono, 2000). Les smads jouent donc un rôle important dans l'intégration des multiples stimuli que la cellule reçoit (Itoh *et al.*, 2000).

La voie de signalisation activée par le TGF- $\beta$ 1 est impliquée dans les stades précoces du développement embryonnaire. L'inactivation de gène codant pour des protéines impliquées en aval de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 est létale au stade embryonnaire. En effet, il a été montré que l'épiblaste d'embryons de souris smad 2  $\gamma$  perd son pouvoir de différenciation en endoderme, mésoderme et ectoderme. Chez ces embryons, l'épiblaste se différencie exclusivement en mésoderme extraembryonnaire (Heyer *et al.*, 1999, Waldrip *et al.*, 1998). D'autre part, dans ces embryons de souris déficients pour smad 2 (smad 2  $\gamma$ ), l'absence du feuillet endodermique est constatée, suggérant l'implication de cette voie de signalisation dans la différenciation des cellules ES en cellules endodermiques (Tremblay *et al.*, 2000). Le TGF- $\beta$  pourrait donc contribuer indirectement à la différenciation du mésoderme précardiaque. Par ailleurs, différents travaux mettent en évidence le rôle indispensable de l'endoderme dans la formation du mésoderme cardiogène (Marvin *et al.*, 2001, Tzahor et Lassar., 2001). De plus, le TGF- $\beta$ 1 a été identifié par hybridation *in situ* dans le mésoderme cardiaque à 7 jours (Akhurst *et al.*, 1999). Différents travaux *in vitro* ont également montré que le TGF- $\beta$ 1 pouvait stimuler les capacités de différenciation des cellules ES murines et des cellules carcinomiales P19 en cardiomyocytes (Slager *et al.*, 1993,

Behfar *et al.*, 2002). Behfar *et al* ont montré que le niveau d'expression des principaux gènes cardiaques est augmenté dans les corps embryoïdes dérivés des cellules ES murines CGR8 ayant été soumises à un prétraitement de 24h avec du TGF- $\beta$ 1. Ceci conduit à un accroissement des aires présentant une activité contractile spontanée.

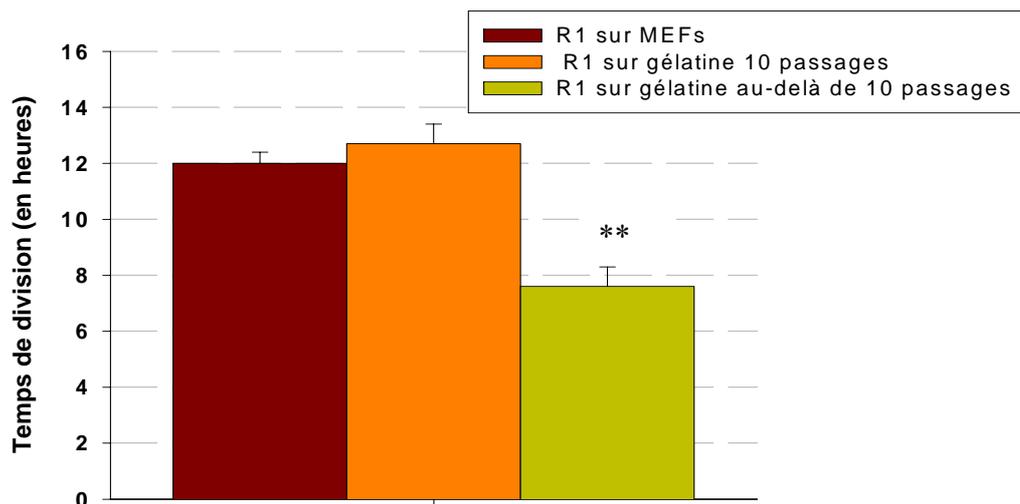
Cependant, la caractérisation des gènes induits par le TGF- $\beta$ 1 et pouvant expliquer ce phénomène se produisant au cours de cette phase de prédifférenciation des cellules ES, n'a pas été à notre connaissance, mise en évidence. L'objectif de ce travail est d'étudier les effets du TGF- $\beta$ 1 sur les cellules ES R1 en analysant de manière comparative le profil transcriptionnel des cellules ES prétraitées ou non par le TGF- $\beta$ 1, en utilisant des puces à ADN pangénomique. Ceci afin de rechercher les gènes impliqués au cours de cette phase de prédifférenciation, et de définir la voie de signalisation préférentiellement activée dans les cellules ES par le TGF- $\beta$ .

## **I. Culture des cellules ES en l'absence de cellules nourricières**

Afin de nous affranchir des effets du TGF- $\beta$  sur les MEFs, nous avons maintenu les cellules ES en l'absence de cellules nourricières sur un support gélatiné. Comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes paragraphe II.3, l'adhésion différentielle sur plastique des cellules ES et des MEFs a été utilisée afin d'éliminer les fibroblastes. Puis, les cellules ES sontensemencées dans une boîte de Pétri gélatinée en présence de milieu de croissance (paragraphe II.2.1 du Matériel et Méthodes). Afin de pallier l'absence des facteurs de croissance sécrétés par les fibroblastes et en particulier du LIF, la concentration de cette cytokine dans le milieu a été augmentée à 2000 unités/ml.

### **I.1 Analyse des paramètres liés à la prolifération**

Afin d'étudier si l'adaptation des cellules ES sur gélatine ne modifie pas la prolifération cellulaire, nous avons déterminé le temps de division des cellules ES cultivées sur gélatine après deux jours de culture, et nous l'avons comparé à celui des cellules ES cultivées sur MEFs (figure 58).

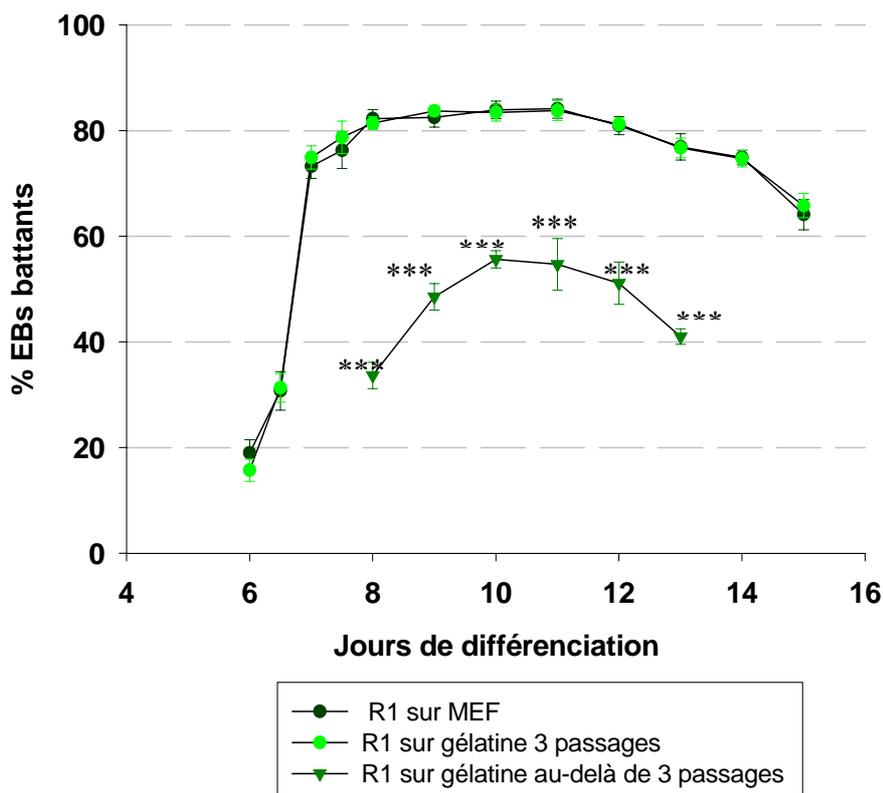


**Figure 58 : Modifications du temps de division des cellules ES R1 en fonction des conditions de culture et du nombre de passages.** Les valeurs sont exprimées  $\pm$  SEM avec  $n = 8$  pour les cellules ES cultivées sur MEFs, et celles cultivées sur gélatine. Un test Anova est réalisé \*\*  $p < 0,005$ ).

Pour une adaptation sur gélatine de courte durée, n'excédant pas 10 passages, ce temps de division est de  $12,7 \pm 0,8$  h ( $n = 8$ ) pour les cellules ES cultivées sur gélatine, ce qui n'est pas significativement différent de celui observé dans les cellules R1 cultivées sur MEFs ( $12 \pm 0,4$  h ;  $n = 8$ ). Pour une période plus longue de culture, ce temps de division diminue significativement ( $7,6 \pm 0,7$  h ;  $n = 8$ ).

## I.2 Analyse des paramètres liés à la différenciation

Afin d'analyser les effets de l'adaptation des cellules ES sur gélatine, nous avons étudié l'évolution du pourcentage des EBs battants obtenus par différenciation des cellules ES cultivées sur gélatine (figure 59).



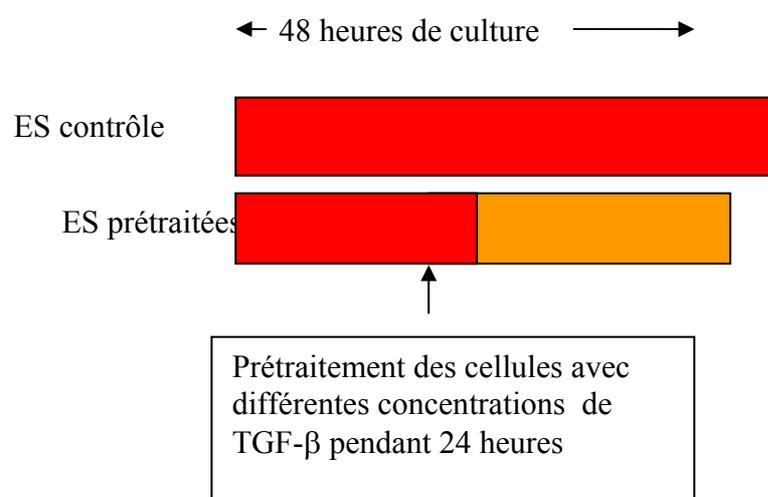
**Figure 59 : Effets de l'adaptation sur gélatine sur l'évolution du pourcentage d'EBs présentant une activité contractile spontanée en fonction du temps de différenciation.** Pour chaque condition, n = 8 cultures pour R1/MEFs et n = 4 cultures pour R1/gélatine.

Pour une adaptation de très courte durée sur gélatine, n'excédant pas 3 passages, soit 6 jours, l'évolution du pourcentage d'EBs battants en fonction des jours de différenciation, est similaire à celle observée pour des EBs obtenus par différenciation des cellules ES cultivées sur MEFs (figure 59). A l'inverse, pour des périodes de culture plus longues, au-delà de 3 passages, l'apparition des premiers foyers battants est retardée dans les EBs dérivés de ces cellules. Les foyers apparaissent à 7,5 jours au lieu de 6,5 jours pour les EBs dérivés des cellules ES cultivées sur MEFs. Par ailleurs, le pourcentage maximum d'EBs battants à 10 jours de différenciation atteint  $55,6 \pm 1,6$  %. Il est à noter que l'évolution du pourcentage d'EBs battants est significativement différent de celle des EBs dérivés des cellules ES cultivées sur MEFs, suggérant une perte du potentiel de différenciation des cellules ES dans ces conditions. Afin de calculer, le nombre de cellules cardiaques obtenues par EB, nous avons dissocié enzymatiquement à 15 jours de différenciation, les EBs dérivées de cellules ES cultivées sur gélatine au-delà de 3 passages. Le nombre de cellules cardiaques

obtenus/EB est de  $2\,900 \pm 340$  cellules ( $n = 8$  cultures). Cette quantité n'est pas significativement différente de celle obtenue pour des cellules ES cultivées sur MEFs ( $3\,342 \pm 350$  ;  $n = 8$  cultures). Ces résultats montrent que la culture des cellules ES sur gélatine modifie l'évolution du pourcentage d'EBs battants ainsi que le pourcentage de ces derniers mais n'entraîne pas de changement dans le rendement en cardiomyocytes obtenus par différenciation. Le TGF- $\beta$ 1 étant connu pour stimuler la différenciation cardiaque, nous avons analysé ces effets sur des cellules ES cultivées sur gélatine.

## II. Effets du TGF- $\beta$ 1 sur la croissance et la différenciation des cellules ES

Afin d'étudier les effets du TGF- $\beta$ 1, un prétraitement des cellules ES avec différentes concentrations de TGF- $\beta$ 1 (de 2,5 ng/ml à 10 ng/ml) est réalisé 24 heures avant l'initiation de la différenciation des cellules ES. Le protocole expérimental utilisé est schématisé dans la figure 60.

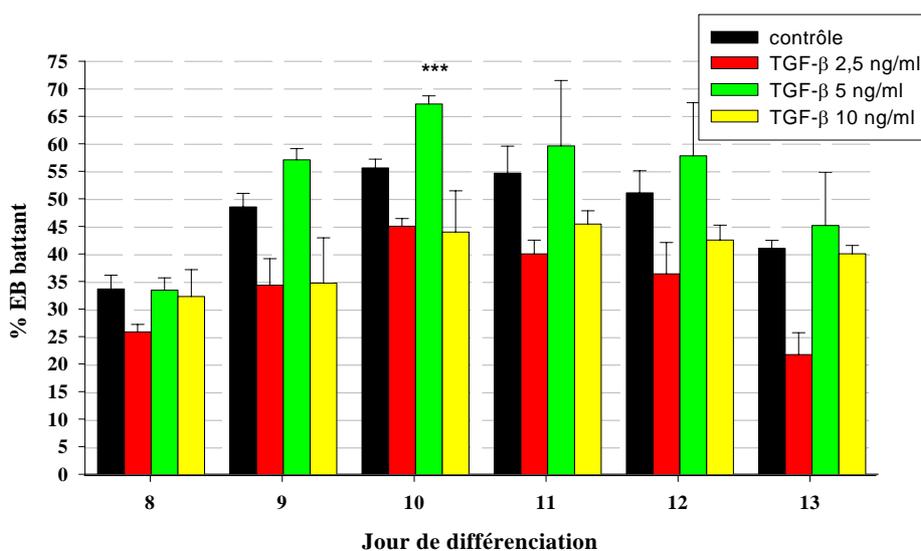


**Figure 60: Protocole expérimental utilisé pour l'étude du TGF- $\beta$ .** Les cellules ES contrôles sont cultivées pendant 48 heures. Les cellules prétraitées sont cultivées pendant 24 heures dans les mêmes conditions que les contrôles, puis traitées 24 heures avec du TGF- $\beta$  à différentes concentrations, avant l'induction de la différenciation.

### II.1 Analyse des paramètres liés à la différenciation

Afin d'analyser les effets du TGF- $\beta$  sur les paramètres de différenciation, nous avons étudié l'évolution du pourcentage d'EBs battants obtenus par différenciation des cellules ES contrôles et des cellules ES prétraitées avec trois concentrations de TGF- $\beta$ .

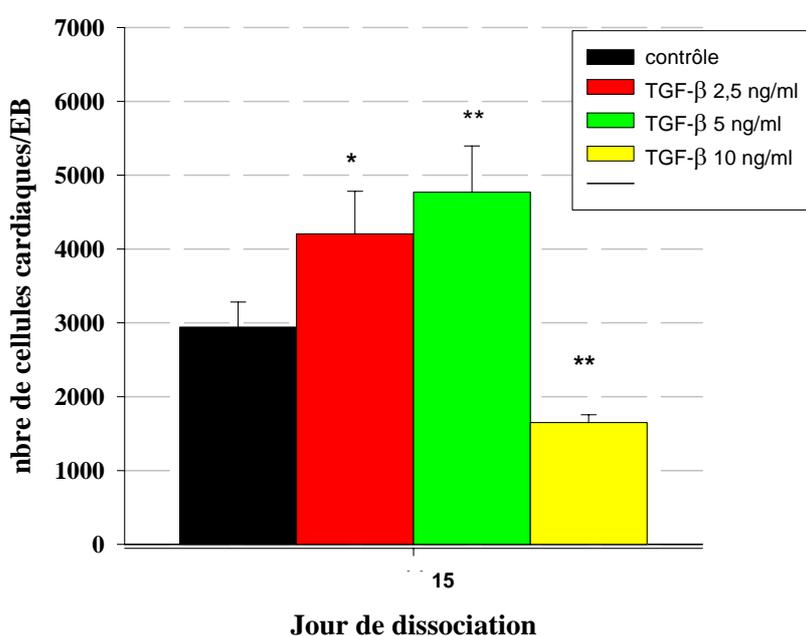
Comme montré précédemment, les foyers battants dans les EBs dérivés des cellules ES contrôles apparaissent à 7,5 jours et le pourcentage maximum d'EBs battants à 10 jours de différenciation atteint  $55,6 \pm 1,6\%$  (figure 60). A l'inverse, les trois concentrations de TGF- $\beta$  testées sur ces cultures, conduisent à une apparition plus précoce des premiers foyers battants : 7 jours au lieu de 7,5. Cependant, ceci est plus tardif que les EBs dérivés des cellules ES maintenues en culture sur MEFs (6 jours) (figure 61). Le pourcentage d'EBs battants maximum obtenu à 10 jours de différenciation, est respectivement de  $67 \pm 1,5 \%$  et  $45 \pm 1,4\%$  pour les cellules prétraitées avec 2,5 et 5 ng/ml de TGF- $\beta$ . A l'inverse, cet effet bénéfique du TGF- $\beta$  devient moindre pour les cellules ayant été prétraitées avec 10 ng/ml, le pourcentage d'EBs battants est dans ces conditions de  $43,9 \pm 7,5\%$ . Il est à noter que le pourcentage maximum d'EBs battants à 10 jours de différenciation pour des cellules ES ayant été traitées avec 5 ng/ml de TGF- $\beta$  est significativement différent.



**Figure 61: Modification par le TGF- $\beta$  de l'évolution du pourcentage d'EBs présentant une activité contractile spontanée en fonction du temps de différenciation.** Pour chaque condition, les valeurs sont exprimées  $\pm$  SEM n = 4 cultures Différence significative déterminée par le test Anova \*\*\* p < 0,0001.

L'effet du TGF- $\beta$  sur l'évolution du pourcentage d'EBs battants est donc dépendant de la concentration. Un accroissement de l'aire des surfaces battantes par rapport à celle des contrôles, a également été observé, sans être quantifié, suggérant une augmentation du nombre de cellules cardiaques. Afin de vérifier cette hypothèse, les EBs sont dissociés enzymatiquement à 15 jours de différenciation et le nombre de

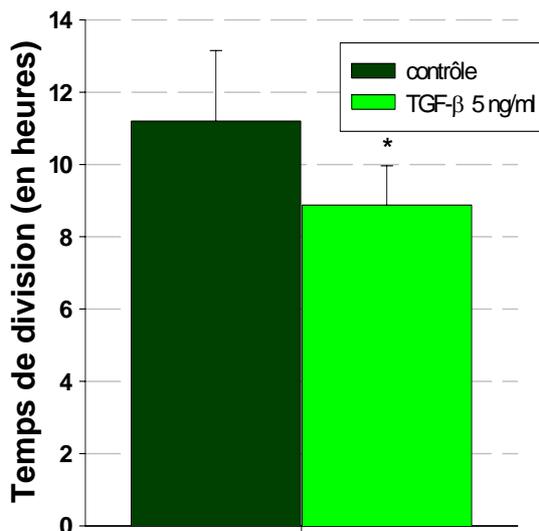
cardiomyocytes obtenus par EB, est calculé (figure 62). Le nombre de cellules cardiaques obtenues par différenciation des cellules ES contrôles est de  $2\,900 \pm 340$  cellules. Le prétraitement des cellules ES avec des concentrations de 2,5 ng/ml et 5 ng/ml permet d'augmenter significativement le nombre de cellules cardiaques/EB, et d'obtenir respectivement  $4\,203 \pm 576$ , et  $4\,769 \pm 625$ , soit 1,45 et 1,6 fois plus de cardiomyocytes. A l'inverse, la concentration de 10 ng/ml de TGF- $\beta$  semble délétère pour les cellules. En effet, le nombre de cellules est moindre dans ces conditions que celui obtenu dans les conditions contrôles ( $1\,600 \pm 140$  cellules).



**Figure 62: Evolution du nombre de cardiomyocytes obtenu par EB en fonction de la concentration en TGF- $\beta$  utilisée.** Pour chaque condition, les valeurs sont exprimées  $\pm$  SEM avec  $n = 5$  pour les contrôles,  $n = 4$  pour les cellules ES prétraitées (\*  $p = 0,05$ , \*\*  $p = 0,005$ )

## II.2 Analyse des paramètres liés à la prolifération cellulaire

Nous avons déterminé le temps de division des cellules ES contrôles et des cellules ES prétraitées pendant 24h avec 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1. Le calcul du temps de division est effectué après deux jours de culture. Ce dernier est de  $11 \pm 0,7$ h pour les ES contrôles et de  $7,5 \pm 0,8$  h pour les cellules ES prétraitées avec du TGF- $\beta$ 1, (figure 63). Ces résultats montrent qu'une concentration de 5 ng/ml de TGF- $\beta$  induit une diminution du temps de division.



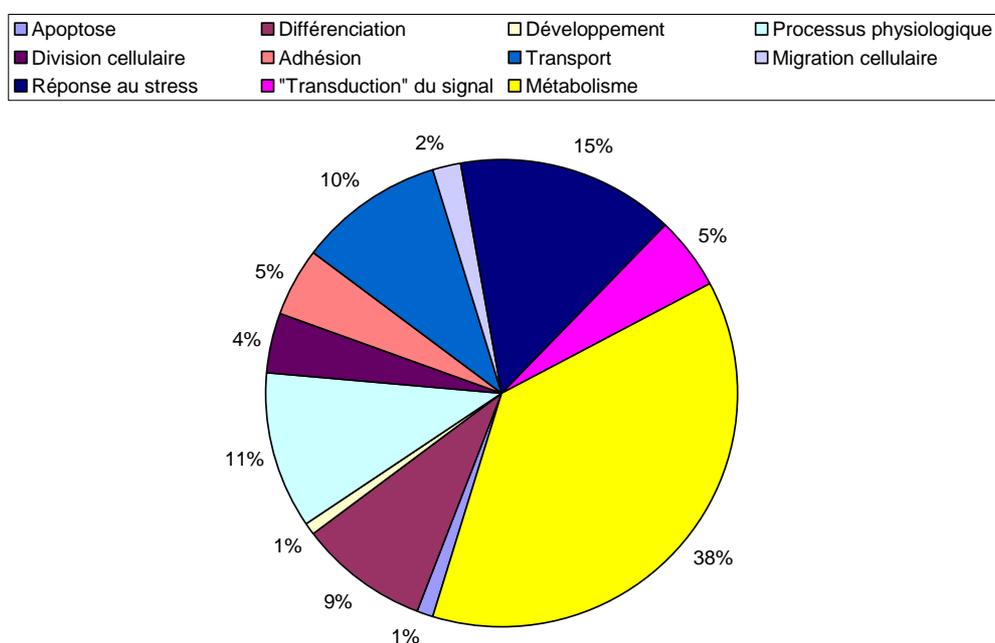
**Figure 63: Détermination du temps de division dans les cellules ES contrôles et prétraitées par une concentration de 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 pendant 24 heures.** Pour chaque condition n = 4 cultures. \* p=0,05

Afin de rechercher quels pouvaient être les gènes impliqués dans les effets décrits ci-dessus, nous avons comparé le profil transcriptionnel des cellules ES prétraitées avec une dose de 5 ng/ml de TGF- $\beta$  à celui des cellules ES contrôles. Ceci a été réalisé en utilisant une puce à ADN « pangénomique » comprenant 30 000 gènes répartis sur 3 puces à ADN distinctes. L'étude de ces derniers nous a permis d'obtenir des informations sur les gènes induits par le TGF- $\beta$  au cours de cette phase de prédifférenciation, et de rechercher si une voie préférentielle du TGF- $\beta$  pouvait rendre compte de ces effets.

### III. Analyse des résultats des puces à ADN

Les cibles sont constituées de l'ARN total extrait de nos différentes conditions. Une étape de transcription inverse permet de générer des fragments d'ADNc marqués par incorporation de nucléotides couplés à un fluorochrome (cyanine 3 ou 5) comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes paragraphe VII. Ces molécules émettent un signal lumineux après excitation par un faisceau laser à une longueur d'onde donnée. Un couple de cibles complexes est constitué ; il résulte du mélange en proportions équivalentes de 2 cibles complexes marquées avec des cyanines différentes. Après

dénaturation, ce couple de cibles est déposé sur la puce pour réaliser l'hybridation spécifique sonde/cible. Un lavage des lames est réalisé à stringence croissante pour éliminer les hybridations non spécifiques. Le signal est ensuite analysé par un logiciel de traitement d'images. Les données obtenues sont exportées en utilisant le programme MADSCAN « Microarray Data Suites of Computed Analysis ». Ce programme développé au sein du laboratoire par Nolwenn Le Meur permet d'analyser les données des puces selon trois étapes. Après celles de filtration et de normalisation selon la méthode décrite dans les Matériels et Méthodes paragraphe VII.3.2, l'analyse des gènes est effectuée. Afin d'améliorer la visualisation des résultats, le logarithme du rapport de fluorescence CY3/CY5 est calculé. Seuls les gènes dont le log de ce rapport d'intensité est supérieur à 0,5 sont considérés comme surexprimés, et ceux dont le log est inférieur à -0,5 sont considérés comme étant sous-exprimés. Nos résultats montrent que 76 gènes sont modifiés différenciellement après un prétraitement au TGF- $\beta$ . Nous avons ensuite recensé les fonctions biologiques connues dans lesquelles ces gènes différenciellement exprimés étaient impliqués. Cette répartition des gènes est illustrée dans la figure 64.



**Figure 64 : Diagramme représentant les gènes différenciellement exprimés au cours de la phase de prétraitement des cellules ES. Ces gènes se répartissent dans différentes fonctions cellulaires.**

Parmi les 76 gènes modifiés différenciellement, 30,3 % sont surexprimés et 69,7% sont sous-exprimés.

Le gène codant pour *bcl2* est le plus fortement modifié dans nos conditions. Son expression est amplifiée 1,47 fois. De plus, l'expression d'un autre gène codant pour la cycline L2 est également augmentée par 0,8. Cette cycline interviendrait dans la régulation des protéines apoptotiques au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. En effet, sa surexpression dans des cellules cancéreuses hépatiques humaines conduit à une inhibition de croissance de ces cellules et induit le programme apoptotique (Yang *et al.*, 2004).

D'autre part, les gènes codant respectivement pour MEKK et JNK/SAPK sont également surexprimés. Leur expression est accrue 1,25 fois. BRCA1 est le quatrième gène fortement augmenté d'un facteur 1,17. L'expression de ce gène est indispensable au développement embryonnaire chez la souris. En effet, chez cette espèce, une mutation dans ce gène conduit à la mort de l'embryon au stade postimplantatoire (Snouwaert JN *et al.*, 1998). Parmi les autres gènes sous-exprimés, l'expression du gène codant pour le facteur de transcription *Wnt2b*, est diminuée 1,25 fois. Ce facteur de transcription intervient dans la différenciation des cellules ES en cellules hématopoïétiques. De plus, un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire sont également fortement diminués, dont la choline acétyl transférase. Par ailleurs, les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'ubiquitination des R-smads sont également fortement diminués (3,1 fois).

A l'inverse, les principaux gènes impliqués dans la différenciation cardiaque et la voie des smads ne sont pas modifiés au cours de cette phase de prédifférenciation. Il est toutefois important de préciser, que chacune des trois puces a été réalisée en un seul exemplaire, et chaque gène présent une seule fois sur les lames hybridées. Cependant, ces résultats nous ont permis de réaliser un premier criblage.

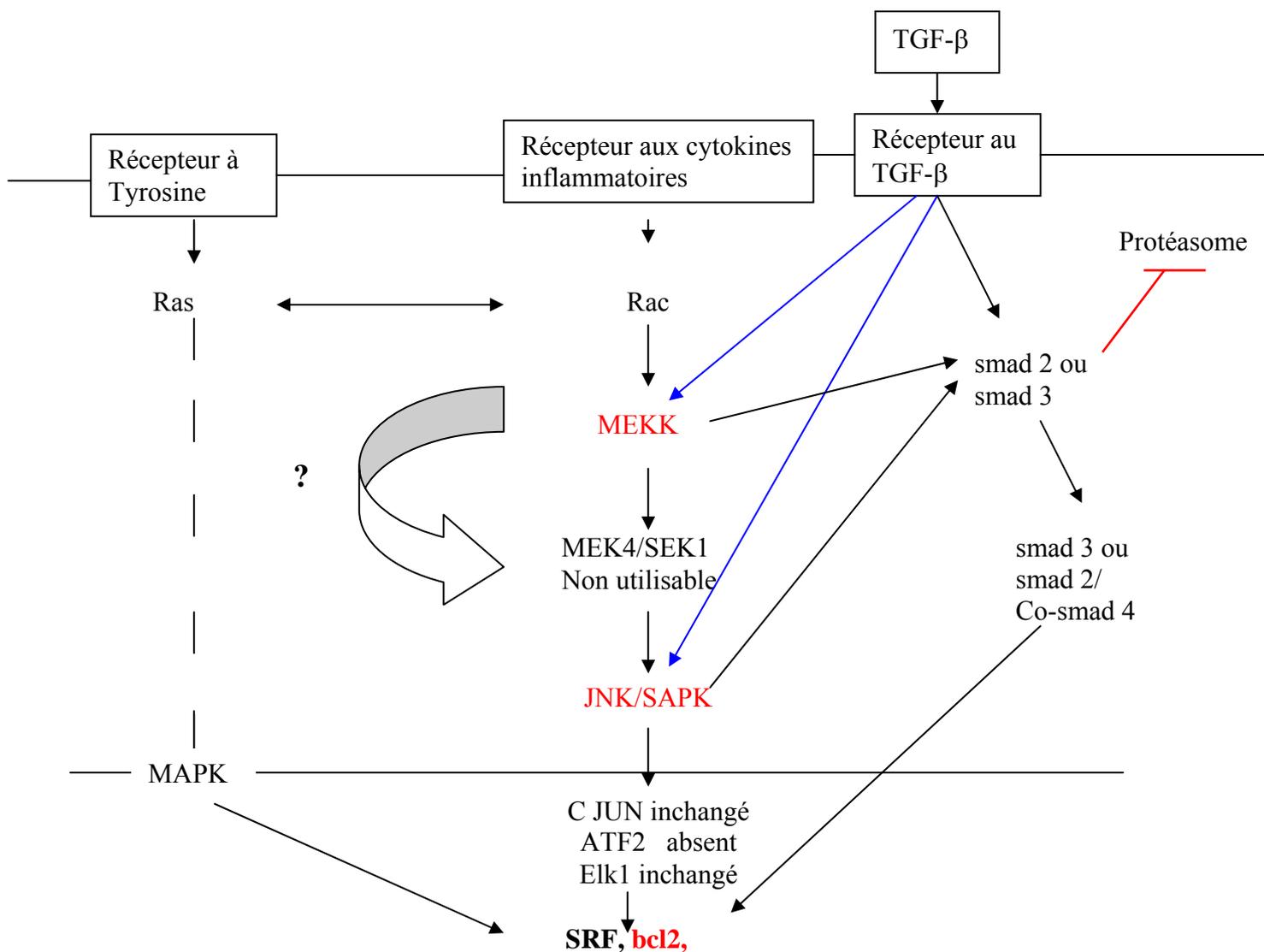
### **III. Commentaire et Discussion**

- Dans nos conditions de culture, le prétraitement des cellules ES avec du TGF- $\beta$  conduit à une diminution du temps de division des cellules ES prétraitées, ce qui suggère une augmentation de la prolifération cellulaire. Une telle augmentation a pu

être observée dans des cellules épithéliales (Assoian *et al.*, 1984). Dans ces conditions, la prolifération cellulaire accrue peut s'expliquer, soit par une stimulation des facteurs de croissance endogènes tels que PDGF, soit par l'activation des récepteurs de l'EGF (Leof *et al.*, 1986 ; Assoian *et al.*, 1984 ; Roberts *et al.*, 1992). Cependant, l'action du TGF- $\beta$  ne se limite pas à ces seuls effets, TGF- $\beta$  peut agir sur la matrice extracellulaire en contrôlant la synthèse ou la dégradation des protéines de cette matrice (Verrecchia et Mauviel, 2002). En effet, le TGF- $\beta$  induit l'expression des intégrines, qui peuvent se rassembler, constituer un point d'adhésion focal, et recruter une FAK « Focal Adhesion Kinase ». Cette dernière, active la voie des MAPKs et aboutit à la prolifération cellulaire. Dans nos conditions, l'expression des intégrines est augmentée de 0,6 fois. Le TGF- $\beta$  induisant la synthèse de ces protéines, il peut ainsi accroître la croissance cellulaire. Toutefois, il est à noter que le TGF- $\beta$  est décrit le plus souvent comme un inhibiteur du cycle cellulaire, en diminuant l'expression des cdk2 /4 ou en augmentant l'expression des gènes codant pour des protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que P21 et P15 (Huang et Huang, 2005). Dans nos conditions, ces protéines ne sont pas modifiées, et n'interviennent probablement pas.

- Une augmentation du pourcentage d'EBs présentant une activité contractile spontanée et un accroissement du nombre de cellules cardiaques obtenues quelque soit le stade de différenciation, est observée consécutivement au prétraitement des cellules ES avec du TGF- $\beta$ . Par ailleurs, l'expression du gène codant pour SRF est accrue de 0,6 fois. Deux hypothèses peuvent être émises. (1) Le facteur de réponse au sérum (SRF) pourrait agir de concert avec la protéine anti-apoptotique bcl2 pour assurer la survie des cellules dérivées des feuillets mésodermique et endodermique dans les corps embryoïdes. En effet, des embryons de souris ou des ES déficientes pour SRF présentent une absence de feuillet mésodermique et du facteur de transcription impliqué dans la différenciation cardiaque, BMP2 sécrété par l'endoderme. Par ailleurs, SRF intervient également pour réguler la transcription des facteurs anti-apoptotiques, dont bcl2 (Schratt *et al.*, 2004). De plus, le gène codant pour JNK est augmenté de 1,25 fois. Ainsi, le TGF- $\beta$  pourrait activer la voie JNK, et induire l'expression de SRF qui permettrait à son tour d'activer bcl2.

(2) La voie de signalisation des smads pourrait agir de façon indirecte en favorisant la formation de l'endoderme *in vivo* (Sirard *et al.*, 1998). En effet, des embryons de souris déficients pour smad 2, (smad 2<sup>-/-</sup>), l'absence du feuillet endodermique est constatée, suggérant l'implication de cette voie de signalisation dans la différenciation des cellules ES en cellules endodermiques (Tremblay *et al.*, 2000). Le TGF- $\beta$  pourrait donc contribuer indirectement à la différenciation du mésoderme précardiaque. D'autre part, des embryons de souris déficients pour le gène codant pour smad 4 présentent une absence de mésoderme. Dans nos conditions, le niveau d'expression des smads 2 et 4 n'est pas modifié. Toutefois, les protéines impliquées dans leur ubiquitination, entraînant leur dégradation par le protéasome, sont fortement inhibées, suggérant un maintien de cette voie de signalisation. Par ailleurs, il a été montré que MEKK et JNK pouvaient phosphoryler ces smads, et entraîner une augmentation des transcriptions induites par ces effecteurs. De ce fait, une voie de signalisation possible peut être envisagée et est résumée dans la figure 65.



**Figure 65: Voies de signalisation possibles mises en jeu dans les cellules ES prétraitées par le TGF- $\beta$ .** En rouge sont représentés les gènes fortement exprimés. MEKK et JNK peuvent activer la voie des smads en phosphorylant smad 2 ou 3 permettant une liaison avec leur cosmad 4, et la transcription des gènes-cibles. En bleu sont représentés les modes d'activation possibles du TGF- $\beta$ .

- La conservation du potentiel de différenciation de nos cellules ES R1 sur gélatine à long terme, reste difficile dans nos conditions de culture. En effet, le pouvoir de différenciation des cellules ES cultivées en l'absence de cellules nourricières, sur support gélatiné, décroît rapidement au cours des passages successifs. Les premiers battements apparaissent à 7,5 jours et le pourcentage maximum d'EBs battants à 10 jours n'atteint plus que 55,6 % contre 86% pour des cellules ES cultivées sur MEFs. Le TGF- $\beta$  tend à compenser une partie de cette perte du potentiel de différenciation en

l'absence de cellules nourricières. En effet, les premiers EBs battants sont observés à 7 jours et le pourcentage maximum d'EBs battants atteint 67% à 10 jours. Le TGF- $\beta$  pourrait agir sur le niveau d'expression du gène codant pour la protéine anti-apoptotique *bcl2*, directement ou indirectement par la voie JNK/SAPK. Cet accroissement du niveau d'expression de *bcl2* permettrait une augmentation du nombre de cellules endodermiques et mésodermiques. La libération des facteurs indispensables au développement cardiaque par ces deux types cellulaires, assurerait le maintien du potentiel de différenciation cardiaque des cellules ES. Néanmoins, cette compensation est de courte durée, et ne peut subsister au-delà de 7 passages.

L'utilisation d'une puce à ADN pangénomique nous a permis de réaliser un criblage des gènes impliqués dans les effets du TGF- $\beta$ . Cependant, d'autres puces pangénomiques et des analyses de RT-PCR semi-quantitative, seront nécessaires pour confirmer ces différentes données, et les hypothèses émises plus haut. L'utilisation d'une telle technologie présente des limites, notamment en ce qui concerne la détection des faibles variations d'expression des gènes, qui peuvent avoir un impact important sur le remodelage cellulaire. Des puces dédiées ou des cartes microfluides restreintes aux gènes impliqués dans les voies de signalisation du TGF- $\beta$  ou des facteurs de transcription cardiaque, devraient mieux cibler ces variations et apporter des éléments permettant de mieux rendre compte des effets du TGF- $\beta$ . Ce travail a servi de base afin (1) de « screener » les gènes les plus modifiés par ce prétraitement et (2) de pouvoir ensuite aborder par d'autres outils les cascades de signalisation pouvant rendre compte de l'effet bénéfique du TGF- $\beta$ .

## **Conclusions et Perspectives**

L'obtention d'un pacemaker biologique pouvant se substituer à un pacemaker artificiel suscite un intérêt grandissant. En effet, le pacemaker artificiel présente un certain nombre d'inconvénients dont une absence de modulation du rythme cardiaque lors de l'exercice physique, et une durée de vie limitée des batteries. Un pacemaker biologique devrait pouvoir surmonter ces divers inconvénients. Cet axe de recherche, bien que très récent, a été abordé par une approche de thérapie génique ou cellulaire. Une modification d'expression génique permettant la réalisation d'un pacemaker cardiaque ectopique pouvant pallier aux troubles du rythme, consécutifs à une déficience du pacemaker naturel, a été réalisée. Les travaux ont plus particulièrement concerné la surexpression de trois gènes cardiaques codant pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique, HCN2 et Kir 2.1 (Edelberg *et al.*, 1998 ; Qu *et al.*, 2003 ; Miake *et al.*, 2002, et 2003). En effet, les produits de ces différents gènes interviennent en modulant l'activité rythmique cardiaque. Dans le premier cas, l'injection d'un plasmide incorporant le gène codant pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique, dans l'atrium de porc conduit à la formation d'un pacemaker atrial, 48 heures après injection (Edelberg *et al.*, 1998). Cependant, cet effet ne peut être maintenu au-delà de 24 heures. De plus, ce modèle ne permet pas de contrebalancer un bloc sino-atrial ou atrio-ventriculaire. D'autre part, la réalisation d'un pacemaker biologique par surexpression du gène HCN2, permettant ainsi une élévation du courant pacemaker  $I_f$ , au niveau atrial ou ventriculaire, a été entreprise. Un adénovirus contenant un plasmide codant pour HCN2 est injecté dans l'atrium gauche d'un chien, dont le nœud sinusal a été supprimé par stimulation vagale, induit 4 jours plus tard une activité pacemaker atrial. Les myocytes atriaux isolés de ces animaux, présentent une très forte augmentation de l'amplitude du courant  $I_f$  (x100) (Qu *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que cette approche de thérapie génique permet de contrebalancer les effets d'un bloc atrio-ventriculaire transitoire induit par stimulation vagale (Plotnikov *et al.*, 2004). Cependant, les résultats obtenus ne mentionnent pas si ces effets perdurent. Enfin, dans les cellules myocardiques, une forte diminution du courant  $I_{K1}$  conduit à une dépolarisation membranaire compatible avec l'activation du courant pacemaker  $I_f$ . Ceci a été réalisé à l'aide d'une construction plasmidique dont l'injection dans les cellules ventriculaires induit l'expression d'un dominant négatif du gène KCNJ2, gène codant pour la sous-unité  $\alpha$ , Kir 2.1, responsable du courant  $I_{K1}$  (Miake *et al.*, 2002,

2003). Une telle expression dans la cavité ventriculaire gauche d'un porc conduit à une dépolarisation lente diastolique des cellules cardiaques de la zone injectée. Cependant, cette approche technologique a montré l'induction de plusieurs foyers pacemakers ectopiques dans le ventricule de ces animaux traités, aboutissant à des troubles du rythme. Une deuxième voie a été envisagée, celle de la thérapie cellulaire. La source cellulaire la mieux adaptée pour cette thérapie correspond aux cellules souches. Celles-ci sont de deux types : les cellules souches adultes et les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches ont fait l'objet de travaux concernant la thérapie cellulaire cardiaque. Cependant très peu de ces travaux de thérapie cellulaire avaient pour but la création d'un pacemaker cardiaque.

A ce jour, et à notre connaissance, un seul travail a tenté de créer un tel pacemaker *in vivo* et *in vitro* en différenciant des cellules souches embryonnaires humaines (Kehat *et al.*, 2004). Des cellules cardiaques dérivées de ces cellules ES ont pu s'incorporer dans les cultures de cardiomyocytes de rats, et d'autre part ont permis d'induire une activité rythmique dans un cœur de porc ayant un bloc auriculo-ventriculaire persistant (Kehat *et al.*, 2004). Ces résultats mettent en évidence que les cardiomyocytes dérivés des cellules ES humaines peuvent se comporter comme un pacemaker biologique. De plus, les cellules cardiaques dérivées des cellules ES possèdent des récepteurs adrénergiques et cholinergiques fonctionnels (Maltsev *et al.*, 1994, Kehat *et al.*, 2001). Ce qui suggère que ce pacemaker biologique implanté pourrait être régulé de manière identique à celui du pacemaker natif. Cependant, il est à noter qu'un grand nombre d'animaux ainsi traités présentent des arythmies épisodiques. Ceci pourrait résulter de la maturation *in vivo* des cellules cardiaques transplantées et de la perte progressive de leur potentiel pacemaker. Ceci suggère qu'il faille coupler thérapie génique et cellulaire afin de développer un modèle cellulaire permettant de conserver à long terme les propriétés pacemaker de ces cellules. Ceci nécessite de définir à quel stade de différenciation ces cellules de pacemaker apparaissent. Dans ce cadre, les travaux *in vitro* de White et Claycomb en 2005 vont dans cette direction. Dans cette étude, ils ont utilisé comme marqueur, le promoteur du gène GATA 6. Ce dernier a été montré pour permettre *in vivo* une visualisation au cours de la cardiogénèse des régions sinusales et atrio-ventriculaires (Davies *et al.*, 2001). La transfection des cellules ES murines avec un tel promoteur a permis d'isoler des cellules cardiaques de type pacemaker.

Nos travaux montrent qu'à des stades précoces de différenciation, (11 jours), nous obtenons des cellules cardiaques de type « pacemaker atrial-like ». La sélection d'une population pure de cellules de type pacemaker se pose. Deux possibilités s'ouvrent à nous soit isoler les cellules cardiaques à un stade encore plus précoce (8 jours de différenciation) soit maintenir leur potentiel pacemaker à long terme. Ceci peut être réalisé par transfection d'un dominant négatif de Kir 2.1 afin d'empêcher le développement d'un courant  $I_{K1}$ , connu pour être responsable du maintien du potentiel de repos membranaire cardiaque à une valeur très négative (-70 mV), incompatible avec une activité pacemaker. Ceci peut être réalisé en utilisant des cellules ES transfectées avec un dominant négatif de Kir2.1. L'obtention de telles populations nous permettrait d'aborder le profil génomique, électrophysiologique et phénotypique de ces cellules. Dans ce cadre, nous avons entrepris de créer une lignée de cellules ES exprimant le dominant négatif de Kir2.1 sous le contrôle du promoteur  $\alpha$  MHC. A cette fin, nous nous sommes procurés ce plasmide auprès d'Anatoli Lopatin, et nous l'avons modifié pour pouvoir réaliser une sélection des cellules ES transfectées. Les résultats préliminaires montrent clairement que les corps embryoides dérivés de cellules ES transfectées avec un tel plasmide conduisent à un maintien de la contraction, et à une fréquence cardiaque plus élevée en comparaison d'EBs à 17 jours de différenciation. Une autre possibilité pour sélectionner une population pure de progéniteurs cardiaques à un stade précoce, serait de créer des lignées de cellules ES transfectées avec un plasmide EGFP sous le contrôle du promoteur Nkx2.5. Les progéniteurs cardiaques, à un stade très précoce, peuvent être ensuite triés par FACS.

Après l'étape de création d'un pacemaker biologique vont se poser les questions de la transplantation et du rejet immunologique. La transplantation des cellules ou progéniteurs cardiaques nécessite une quantité suffisante de cellules. En effet, la mortalité importante (90%), survenant lors de l'injection des cellules dans le cœur et le rendement faible en cardiomyocytes obtenus par différenciation des cellules ES murines et humaines, ont contraint à rechercher des agents permettant d'améliorer ce processus. A cette fin, différents composés tels que le TGF- $\beta$ , l'acide rétinoïque ou l'acide ascorbique ont été utilisés (Befhar *et al.*, 2002, Takahshi *et al.*, 2003, Wobus *et al.*, 1997). Par ailleurs, pour introduire les cellules progénitrices cardiaques à un site précis et pour limiter la perte cellulaire, l'utilisation de matrice artificielle

biologiquement dégradable peut être envisagée. Par ailleurs, les cellules ES humaines expriment peu de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I, même après différenciation. Pour pallier les risques de rejet, trois possibilités peuvent être envisagées : (1) Créer une banque de « donneur universel » de cellules ES avec des CMH chimériques. (2) Réaliser un clonage thérapeutique (3) Induire une tolérance immunologique en différenciant à partir des mêmes cellules ES, des cellules cardiaques, des cellules hématopoïétiques et des cellules dendritiques, aboutissant ainsi à la création d'une moelle osseuse chimérique (Pour revue, Odorico *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les travaux « génotypiques », électrophysiologiques et phénotypiques des cardiomyocytes à des stades précoces et plus tardifs de différenciation, constituent une base pour étudier des cardiomyopathies congénitales induites par une mutation ponctuelle. Dans ce cadre, nous avons débuté une collaboration avec Jean-Jacques Schott dans le laboratoire concernant le gène codant pour l'ankyrine B. Les cellules ES de par leur pluripotente se présentent donc comme un excellent modèle pour étudier ces maladies congénitales. En effet, des études pharmacologiques et toxicologiques pourront être réalisées sur les cardiomyocytes obtenus par différenciation des cellules ES transfectées avec de telles mutations. Ce champ d'investigation est naissant et prometteur.

## **REFERENCES**

- Akazawa H., Komuro I (2005): Cardiac transcription factor Csx/NKx2.5 :its role in cardiac development and diseases. *Pharmacology and Therapeutics*.5-17
- Akhurst RJ, Lehner SA, Faissner A, Duffie E (1990): TGFbeta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis.*Development*.**108**.645-56
- Alcolea S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB (1999): Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res*. **84**(12):1365-79.
- Alsan BH, Schultheiss TM (2002): Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development*. **129**(8):1935-43.
- Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor (2004): Feeder layer-and serum-free culture of human embryonic stem cells.*Biol Reprod*. **70**:837-45
- Anegon, I., J. F. Moreau, Godard A, Jacques Y, Peyrat MA, Hallet MM, Wong G, Soullillou JP (1990) : Production of human interleukin for DA cells (HILDA)/leukemia inhibitory factor (LIF) by activated monocytes. *Cell Immunol* **130**(1): 50-65.
- Anger M, Lompré A.M, Vallot O, Samuel J.L et al (1998): Cellular distribution of ca<sup>2+</sup> pumps and Ca<sup>2+</sup> release channels in rat cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis.*Circulation*.98:2477-2486.
- Anisimov S V., Tarasov K.V., Tweedie D., Stern M.D., Wobus A.M., Boheler K.R (2002): SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells.*Genomics*. **79**:169-176.
- Anumonwo JM, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J (2001) : Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circ Res*. **89**(4):329-35.
- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB (1993): Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol*. **13**(4):2235-46.
- Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihrmann I, Robitaille L, Drouin J, Nemer M(1994) : Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol*. **14**(1):777-90.
- Arrigo AP (2005) : [Heat shock proteins as molecular chaperones] *Med Sci (Paris)*. **21**(6-7):619-25
- Assoian R.K., Frolik A.B., Roberts D.M., Miller M.B (1984): Transforming growth factor-b controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts.*Cell*.**36**:35-41.
- Attisano L., Wrana J.L(2002) : Signal transduction by the TGF β superfamily. *Sciences*. 296 (5573): 1646-1647.
- Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A (2002): Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation.*Nature Biotech*.**20**:1240-45
- Bao Z.Z., Bruneau B.G., Sedman J.G., Seidman C.E., Cepko C.L (1999): Irx4 regulates chamber-specific gene expression in the developing heart.*Science*.**283**:1161-64.
- Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M(2002) : Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J*. **16**(12):1558-66.

- Berger CN, Sturm KS (1997): Self renewal of embryonic stem cells in the absence of feeder cells and exogenous leukaemia inhibitory. *Growth Factors*. **14**(2-3):145-59.
- Biben C, Harvey RP (1997): Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev*. **11**(11):1357-69.
- Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott DA, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP.(2000) : Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ Res*. **87**(10):888-95.
- Billette J (1987) : Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium. *Am J Physiol*. **252**(1 Pt 2):H163-77.
- Boeuf H, Hauss C, Giraeve FD, Baran N, Kedinger C (1997): Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol*. **138**:1207-17
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*. **91**(3):189-201.
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N (2000) : Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett*. **481**(1):73-6.
- Bou-Abboud E, Li H, Nerbonne JM (2000): Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> currents in mouse atrial cells. *J Physiol*. **529**:345-58
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) : Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. **122**(6):947-56.
- Boyett MR, Harrison SM, Janvier NC, McMorn SO, Owen JM, Shui Z (1996): A list of vertebrate cardiac ionic currents nomenclature, properties, function and cloned equivalents. *Cardiovasc Res*. **32**(3):455-81.
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I (2000): The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*. **47**:658-87
- Brandenberg R, Wei H, Zhang S, Lei S, et al (2004): Transcriptome characterization elucidates signalling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nature Biotech*. **22**:707-16
- Brown J.D., Dichiara M.R., Anderson K.R., Gimbrone M.A., Topper J.N (1999): MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-jun-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J.Biol.Chem*. **274**: 8797-8805.
- Bruneau B.G., Bao Z.Z., Fatkin D., Xavier-Neto J et al (2001) : Cardiomyopathy in Irx4-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol*. **21** :1730-36.
- Bruneau B.G., Bao Z.Z., Tanaka M., Schott J.J., Izumo S. , Seidman J.G., Seidman C.E (2000): Cardiac expression of ventricle-specific homeobox gene Irx4 is modulated by Nkx2.5 and dHand. *Dev Biol*. **217**:266-77.

- Bruneau B.G., Logan M., Davis N., Levis T., Tabin C.E., Seidman J.G., Seidman C.E (1999) : Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* **211**:100-08.
- Bruneau B.G., Nemer G., Charron F., Robitaille L., Caron S., Conner D.A, et al (2001) : A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell.* **106**:709-21.
- Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM (2004) : Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol.* **559**(Pt 1):103-20.
- Burdon T, Smith A, Savatier P (2002) : Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* **12**(9):432-8.
- Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) : Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* **5**(6):877-89.
- Carpenter MK et al (2004): Properties of four human embryonic stem cells lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn.* **229**:243-258
- Catterall WA (2000) : Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**:521-55.
- Cavaillon J.M. (1996.) Le TGF beta. Les Cytokines. 2ème édition. Paris : Masson.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* **113**(5):643-55.
- Charron F., Nemer M (1999):GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* **10**:85-91.
- Chen C.Y., and Schwartz R.J (1995): Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor nkx2.5. *J Biol Chem.* **270**:15628-33
- Cheng G, Hagen TP, Dawson ML, Barnes KV, Menick DR (1999): The role of GATA, CArG, E-box, and a novel element in the regulation of cardiac expression of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger gene. *J Biol Chem.* **274**(18):12819-26.
- Cheng G, Litchenberg W.H, Cole G.J, Mikawa T, Thompson R.P, Gourdie R.G (1999): Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development.* **126**:5041-49.
- Cho HS, Takano M, Noma A (2003): The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol.* **550**:169-80
- Chu PJ, Robertson HM, Best PM (2001): Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene.* **280**(1-2):37-48.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, et al (1997): Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* **278**.1803-1805.

- Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR (2004): A rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286**:H1757-66.
- Cohen, A. S., A. J. Bourque,. (1997): A nonradioisotope approach to study the in vivo metabolism of phosphorothioate oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**(1): 13-22.
- Conway SJ, Kruzynska-Frejtag A, Wang J, Rogers R, Kneer PL, Chen H, Creazzo T, Menick DR, Koushik SV (2002): Role of sodium-calcium exchanger (Ncx1) in embryonic heart development: a transgenic rescue? *Ann N Y Acad Sci.* **976**:268-81.
- Coppen SR, Kaba RA, Halliday D, Dupont E, Skepper JN, Elneil S, Severs NJ (2003) : Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart. *Mol Cell Biochem.* **242**(1-2):121-7.
- Cribbs LL, Martin BL, Schroder EA, Keller BB, Delisle BP, Satin J (2001) : Identification of the t-type calcium channel (Ca(v)3.1d) in developing mouse heart. *Circ Res.* **88**(4):403-7.
- Dagouassat M, Naud P, Lemarchand P, Escande D, Jourdon P (2004). Murine embryonic stem cells differentiate into cardiac pacemakers. *Circ Res.* **110**:219
- Dani C, Chambers I, Johnstone S, Robertson M, Ebrahimi B, Saito M, Taga T, Li M, Burdon T, Nichols J, Smith A (1998): Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev Biol.* **203**(1):149-62
- Darnell, J. E., Jr. (1997) :STATs and gene regulation. *Science* **277**(5332): 1630-5.
- Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS (1996) : Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circ Res.* **78**(1):15-25.
- Davis DL, Edwards AV, Juraszek AL, Phelps A, Wessels A, Burch JB (2001): A GATA-6 gene heart-region-specific enhancer provides a novel means to mark and probe a discrete component of the mouse cardiac conduction system. *Mech Dev.* **108**(1-2):105-19.
- Decher N, Maier M, Dittrich W, Gassenhuber J, Bruggemann A, Busch AE, Steinmeyer K (2001): Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* **492**(1-2):84-9.
- Derynck R., Feng X.H( 1997) TGF  $\beta$  receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1333** (2): 105-150.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarsi AB, Karlsson A, Akhurst RJ (1995): Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor b1 knock out mice. *Development.* **121**:1845-54.
- Di Lisi R, Millino C, Calabria E, Altruda F, Schiaffino S, Ausoni S (1998): Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **273**(39):25371-80.
- Di Lisi R, Sandri C, Franco D, Ausoni S, Moorman AF, Schiaffino S (2000): An atrioventricular canal domain defined by cardiac troponin I transgene expression in the embryonic myocardium. *Anat Embryol (Berl).* **202**(2):95-101.
- DiFrancesco D, Tortora P (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* **351**:145-7.

- Dobrzynski H, Marples DD, Musa H, Yamanushi TT, Henderson Z, Takagishi Y, Honjo H, Kodama I, Boyett MR (2001): Distribution of the muscarinic K<sup>+</sup> channel proteins Kir3.1 and Kir3.4 in the ventricle, atrium, and sinoatrial node of heart. *J Histochem Cytochem.* **49**(10):1221-34.
- Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL(2004) : Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development.* **131**(16):3931-42.
- Dominguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aranega AE (2005) : Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovasc Res.* **65**(4):842-50.
- Duncan JC, Fletcher WH (2002): alpha 1 Connexin (connexin43) gap junctions and activities of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in developing mouse heart. *Dev Dyn.* **223**(1):96-107.
- Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997): TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* **16**(17):5464-71.
- Durocher D, Chen CY, Ardati A, Schwartz RJ, Nemer M (1996) : The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol Cell Biol.* **16**(9):4648-55.
- Duval, D., B. Reinhardt, Keding C, Boeuf H. (2000) : Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *Faseb J* **14**(11): 1577-84.
- Edelberg, J. M., W. C. Aird, Rosenberg RD (1998): Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest.* **101**(2): 337-43
- Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN (1994): Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development.* **120**(5):1251-63.
- Elliott ST, Crider DG, Garham CP, Boheler KR, Van Eyk JE (2004):Two-dimensional gel electrophoresis database of murine R1 embryonic stem cells.*Proteomics.***4**:4032
- Engel M.E., McDonnell M.A., Law B., Moses H.L (1999): Interdependant SMAD and JNK signalling in transforming growth factor- $\beta$ -mediated transcription. *J.Biol.Chem.* **274**: 37413-20
- Evans M.J and Kaufman M.H (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.***292**: 154-156
- Fishman MC, Olson EN (1997) : Parsing the heart: genetic modules for organ assembly.*Cell.* **91**(2):153-6.
- Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Dominguez JN, Roden D, Antzelevitch C, Escande D, Moorman AF (2001) : Divergent expression of delayed rectifier K(+) channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res.* **52**(1):65-75.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F (1997) : Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.***77**(3):699-729.

- Freise D, Himmerkus N, Schroth G, Trost C, Weissgerber P, Freichel M, Flockerzi V (1999): Mutations of calcium channel beta subunit genes in mice. *Biol Chem.* **380**(7-8):897-902.
- Gao B, Sekido Y, Maximov A, Saad M, Forgacs E, Latif F, Wei MH, Lerman M, Lee JH, Perez-Reyes E, Bezprozvanny I, Minna JD (2000) : Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem.* **275**(16):12237-42.
- Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM (2003) : Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns.* **3**(6):777-83.
- Gassanov, N., F. Er, et al. (2004): Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *Faseb J.* **18**(14): 1710-2.
- Gearing, D. P., C. J. Thut, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP. (1991): Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *Embo J* **10**(10): 2839-48.
- Gearing, D. P., N. M. Gough, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. (1987): Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J.* **6**(13): 3995-4002.
- Gepstein, L. (2002): Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res.* **91**(10): 866-76.
- Gilbert S.F (2000). *Developmental Biology.* (Sunderland,MA:Sinauer Associates)
- Gorza L, Schiaffino S, Vitadello M (1988) : Heart conduction system: a neural crest derivative? *Brain Res.* **457**(2):360-6.
- Gorza L, Vettore S, Tessaro A, Sorrentino V, Vitadello M (1997): Regional and age-related differences in mRNA composition of intracellular Ca(2+)-release channels of rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **29**(3):1023-36.
- Gough, N. M., D. P. Gearing, King JA, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. (1988): Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8): 2623-7
- Gourdie R. G., Wei Y., Kim D., Klatt S.C., Mikawa T (1998): Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting purkinje fibers. *Proc. Natl.Sci.* **95**:6815-18.
- Graves KH, Moreadith RW (1993): Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev.* **36**:424:433
- Grepin C., Robitaille L., Antakly T., Nemer G. (1995) : Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* **15** :4095-4102.
- Guo L, Lynch J, Nakamura K, Fliegel L, Kasahara H, Izumo S, Komuro I, Agellon LB, Michalak M (2001): COUP-TF1 antagonizes Nkx2.5-mediated activation of the calreticulin gene during cardiac development. *J Biol Chem.* **276**(4):2797-801

- Gutstein DE, Morley GE, Vaidya D, Liu F, Chen FL, Stuhlmann H, Fishman GI (2001): Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation*. **104**(10):1194-9.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. **391**(2):85-100.
- Han W, Wang Z, Nattel S (2000): A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **279**(2):H466-74.
- Han W, Wang Z, Nattel S (2001): Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **280**(3):H1075-80.
- Hancox JC, Mitcheson JS (1997): Ion channel and exchange currents in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Can J Cardiol*. **13**(12):1175-82.
- Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, Scammell-La Fleur T, Dixon IM(1999) : Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *J Mol Cell Cardiol*. **31**(3):667-78.
- Hao J, Li TG, Qi X, Zhao DF, Zhao GQ (2006): WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. **290**(1):81-91.
- Hardouin S, Bourgeois F, Toraasson M, Oubenaissa A, Elalouf JM, Fellmann D, Dakhli T, Swynghedauw B, Moalic JM (1998) : Beta-adrenergic and muscarinic receptor mRNA accumulation in the sinoatrial node area of adult and senescent rat hearts. *Mech Ageing Dev*. **100**(3):277-97.
- Harvey RP (1999) : Seeking a regulatory roadmap for heart morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. **10**(1):99-107.
- Hatcher C.J., Goldstein M.M., Mah C.S., Delia C.S., Basson C.T (2000):Identification and localisation of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis.*Dev Dyn*.**21**:90-95.
- Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K (2004) : Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*. **279**(17):17063-9
- Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T (2004) : Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. **22**(2):225-35.
- Heyer J, Escalante-Alcade D, Lia M, Boettinger E, Edelmann W, Stewart CI, Kucherlapati R (1999): Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis.*Proc.Nat.Acad.Sci.USA*.**96**:12595-600.
- Hilton DJ (1999): Negative regulators of cytokine signal transduction.*Cell Mol Life Sci*.**55**:1568-77.
- Hiroi Y., Kudoh S., Monzen K., Ikeda Y., Yazaki Y., Nagai R., Komuro I (2001): Tbx5 associates with Nkx2.5 and synergically promotes cardiomyocytes differentiation.*Nat genet*.**28**:276-80.

Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM (2004) : The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res.* **62**(3):489-99

Horb ME, Thomsen GH (1999): Tbx5 is essential for heart development. *Development.* **126**(8):1739-51.

Huang B, El-Sherif T, Gidh-Jain M, Qin D, El-Sherif N (2001): Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **12**(2):218-25.

Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, Timchenko NA. (2004) : Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J.* **23**(2):406-17

Ismat FA, Zhang M, Kook H, Huang B, Zhou R, Ferrari VA, Epstein JA, Patel VV (2005): Homeobox protein Hop functions in the adult cardiac conduction system. *Circ Res.* **96**(8):898-903.

Isom LL (2001) : Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist.* **7**(1):42-54.

Itoh S., Itoh F., Goumans M.T., ten Dijke P. (2000): Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smads proteins. *Eur. J. Biochem.*; **267**: 6954-6967.

Ivanova NB, et al (2002): A stem cell molecular signature. *Science.* **298**:601-4

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989) : Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* **342**(6245):90-2

Jirmanova L, Afanassieff M, Gobert-Gosse S, Markossian S, Savatier P (2002) : Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene.* **15**;21(36):5515-28.

John LM, Lechleiter JD, Camacho P (1998) : Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol.* **142**(4):963-73.

Johnson SE, Rothstein JL, Knowles BB (1994): Expression of epidermal growth factor family gene members in early mouse development. *Dev Dyn.* **201**(3):216-26.

Kaba RA, Coppen SR, Dupont E, Skepper JN, Elneil S, Haw MP, Pepper JR, Yacoub MH, Rothery S, Severs NJ (2001): Comparison of connexin 43, 40 and 45 expression patterns in the developing human and mouse hearts. *Cell Commun Adhes.* **8**(4-6):339-43.

Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa P (2005) : Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res.* **96**(1):127-37.

Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K (2005) : Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **19**(4):489-501.

Kastner P., Grondona J.M., Mark M., Gansmuller A., LeMeur M., Decimo D., Vonesch J.L., Dolle P., Chambon P (1994): Genetic analysis of RXRa developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Genes Dev.* **8**:1007-18.

- Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001): Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* **108**(3): 407-14.
- Kehat, I., L. Khimovich, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2004): Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* **22**(10): 1282-9.
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME (2001): The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.***1**(3):435-40.
- Kelly RG, Buckingham ME (2002): The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet.***18**(4):210-6.
- Kim Y, Bang H, Kim D (1999) : TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J Physiol.* **277**(5 Pt 2):H1669-78.
- Kim Y, Bang H, Kim D (2000) : TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem.* **275**(13):9340-7.
- Kiriazis H, Kranias EG (2000): Genetically engineered models with alterations in cardiac membrane calcium-handling proteins. *Annu Rev Physiol.* **62**:321-51.
- Kitajima S., Takagi A., Inoue T., Saga Y (2000): MesP1 and Mesp2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development.***127**:3215-26.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa, et al. (1996). "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts." *J Clin Invest* **98**(1): 216-24.
- Ko LJ, Engel JD (1993) : DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol.* **13**(7):4011-22.
- Kolossov, E., Z. Lu, et al. (2005): Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *Faseb J.* **19**(6): 577-9.
- Komuro I., and Izumo S (1993): Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 8145-49.
- Koss KL, Ponniah S, Jones WK, Grupp IL, Kranias EG (1995): Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. Molecular and physiological analyses. *Circ Res.*; **77**(2):342-53.
- Kubalak SW, Miller-Hance WC, O'Brien TX, Dyson E, Chien KR (1994): Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J Biol Chem.* **269**(24):16961-70.
- Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM (1999): Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res.***84**(2):146-52.

- Kurisaki A, Hamazaki TS, Okabayashi K, Iida T, Nishine T, Chonan R, Kido H, Tsunasawa S, Nishimura O, Asashima M, Sugino H (2005) : Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**(3):667-75.
- Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F (2000): Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys.* **19**(2):121-36.
- Lees-Miller JP, Guo J, Somers JR, Roach DE, Sheldon RS, Rancourt DE, Duff HJ (2003) : Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates I(Kr) in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. *Mol Cell Biol.* **23**(6):1856-62.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999): Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev.* **79**(4):1317-72.
- Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SK, Noble D, Boyett MR (2004): Requirement of neuronal- and cardiac type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol.* **559**:835-48
- Leof E.B., Proper J.A., Goustin G.D., Shipley P.E., DiCorleto H.L., Moses (1986): Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**: 2453-57.
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S (2000): Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* **102**:III56-61
- Li J, Puceat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME (2002): Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biol.* **158**(1):103-13
- Li M, Li YH, Hou Y, et al (2004) : Isolation and culture of pluripotent cells from in vitro produced porcine embryos. *Zygote.* **12**:43-48.
- Liang HM, Tang M, Liu CJ, Luo HY, Song YL, Hu XW, Xi JY, Gao LL, Nie B, Li SY, Lai LL, Hescheler J (2004): Muscarinic cholinergic regulation of L-type calcium channel in heart of embryonic mice at different developmental stages. *Acta Pharmacol Sin.* **25**(11):1450-7.
- Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN (1999) : Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development.* **126**(1):75-84.
- Linask KK, Han MD, Artman M, Ludwig CA (2001):Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. *Dev Dyn.* **221**(3):249-64.
- Linask KK, Yu X, Chen Y, Han MD (2002) : Directionality of heart looping: effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev Biol.* **246**(2):407-17.
- Liu, J., N. Hadjokas, Mosley B, Estrov Z, Spence MJ, Vestal RE. (1998): Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* **10**(4): 295-302
- Livak, Schmittgen T.D (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**:402-8.

- Lomax AE, Kondo CS, Giles WR (2003): Comparison of time- and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **285**:H1837-48
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990): Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol*. **111**(6 Pt 1):2427-36.
- Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP (1995): Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*. **9**(13):1654-66.
- Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA (2004) : Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*. **109**(11):1421-7.
- Maier SK, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA (2002): An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:4073-8
- Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, Scheuer T (2003) : An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(6):3507-12.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993): Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev*. **144**(1):41-50.
- Maltsev, V. A., A. M. Wobus, Fleischmann B. K., Hescheler J. (1999): Establishment of b-Adrenergic Modulation of L-Type Ca<sup>2+</sup> Current in the Early Stages of Cardiomyocytes Development. *Circ Res*. **84**:136-45.
- Maltsev, V. A., A. M. Wobus, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. (1994): Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res*. **75**(2): 233-44.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J (2003): Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**:5543-8
- Mangoni ME, Nargeot J (2001): Properties of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res*. **52**. 51-64
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S (2005) : Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. **562**(Pt 1):223-34.
- Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB (2001) : Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev*. **15**(3):316-27.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. **101**(4):365-76.

- Masaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause K-H, Opas M, MacLennan D.H., Michalak M (1999): Calreticulin is essential for cardiac development. *J. Cell. Biol.* **144**: 857-68.
- Massagué J., Chen Y.G. (2000) : Controlling TGF  $\beta$  signaling. *Genes Dev.* 41: 627-644.
- Massagué J., Wotton D. (2000 )Transcriptional control by the TGF  $\beta$ /Smad signaling system. *Eur. Mol. Biol. Organization (the EMBO journal)*; 19: 1745-1754.
- Masumiya H, Yamamoto H, Hemberger M, Tanaka H, Shigenobu K, Chen SR, Furukawa T (2003): The mouse sino-atrial node expresses both the type 2 and type 3 Ca(2+) release channels/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* **553**(1-2):141-4.
- Matsuda, T., T. Nakamura, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. (1999): STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* **18**(15): 4261-9.
- McFadden DG, Charite J, Richardson JA, Srivastava D, Firulli AB, Olson EN (2000): A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development.* **127**:5331-41.
- Medkour D, Becker AE, Khalife K, Billette J (1998) : Anatomic and functional characteristics of a slow posterior AV nodal pathway: role in dual-pathway physiology and reentry. *Circulation.* **98**(2):164-74.
- Meijler FL, Janse MJ (1988): Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node. *Physiol Rev.* **68**(2):608-47.
- Menard C, Hagege AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puceat M, Menasche P(2005) Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet.* **366**(9490):1005-12.
- Mery, A., F. Aimond, et al. (2005): Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Mol Biol Cell.* **16**(5): 2414-23
- Miake, J., E. Marban, Nuss HB (2003): Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest.* **111**(10): 1529-36.
- Miake, J., E. Marban, Nuss HB. (2002): Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature.* **419**(6903): 132-3.
- Michalak M, Corbett EF, Masaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) : Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **344** Pt 2:281-92.
- Michalak M, Corbett EF, Masaeli N, Nakamura K, Opas M (1999): Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **344** Pt 2:281-92.
- Michalak, M and al (2002): *Biochimica and Biophysica Acta.* **1600**:32-37.
- Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien KR (1993): In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J Biol Chem.* **268**(33):25244-52.

- Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF (2002): Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* **92**(1):288-96.
- Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR, Matsuoka R (2003): Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *J Biol Chem.* **278**(11):9570-5.
- Miquerol L, Dupays L, Theveniau-Ruissy M, Alcolea S, Jarry-Guichard T, Abran P, Gros D (2003) : Gap junctional connexins in the developing mouse cardiac conduction system. *Novartis Found Symp.* **250**:80-98; discussion 98-109, 276-9.
- Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P, Jongsma H, Nargeot J, Gros D (2004): Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res.* **63**(1):77-86.
- Mitcheson JS, Hancox JC (1999): Characteristics of a transient outward current (sensitive to 4-aminopyridine) in Ca<sup>2+</sup>-tolerant myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Pflugers Arch.* **438**(1):68-78.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) : The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* **113**(5):631-42
- Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A (2000) : Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res.* **87**(2):88-91.
- Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T., Furuya T., Miyazono K (2002). The major Smad pathways in TGF  $\beta$  superfamily signaling. *Genes Cells.* **7** (12): 1191-1204.
- Miyazono K (2000): Positive and negative regulation of TGF $\beta$  signalling. *J. Cell. Sci.* **113**:1101-09.
- Miyazono K. (2000) Positive and negative regulation of TGF  $\beta$  signaling. *J. Cell. Sci.*; **113**: 1101-1109.
- Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE (1994): Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol.* **14**(7):4947-57
- Moller JV, Juul B, le Maire M (1996) : Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta.* **1286**(1):1-51.
- Monzen K, Nagai R, Komuro I (2002): A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med.* **12**(6):263-9.
- Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I (1999) : Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol.* **19**(10):7096-105.
- Moorman AF, de Jong F, Denyn MM, Lamers WH (1998): Development of the cardiac conduction system. *Circ Res.* **82**(6):629-44.

- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001): Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem.* **268**(6):1646-52.
- Morrisey EE, Tang Z, Sigrist K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS (1998) : GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**(22):3579-90.
- Morrison D (1994) : 14-3-3: modulators of signaling proteins? *Science.* **266**(5182):56-7.
- Moskowitz I. G, Pizard A., Patel V.V., Bruneau B. G., Kim J. B., Kupershmidt S., Roden D., Berul C.I., Seidman C.E., Seidman J.G. (2004): The T-box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development.* **131**:4107-16.
- Muller JG, Thompson JT, Edmonson AM, Rackley MS, Kasahara H, Izumo S, McQuinn TC, Menick DR, O'Brien TX (2002) : Differential regulation of the cardiac sodium calcium exchanger promoter in adult and neonatal cardiomyocytes by Nkx2.5 and serum response factor. *J Mol Cell Cardiol.* **34**(7):807-21.
- Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A (1996): Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol.* **493** ( Pt 3):801-18.
- Munoz-Sanjuan I, Brivanlou AH (2002): Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci.* **(4)**:271-80.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003): Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J (1990): Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development.* **110**(3):815-21.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) : Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(18):8424-8.
- Nakamura K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ, Duff HJ, Opas M, Kavanagh K, Michalak M (2001): Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest.* **107**(10):1245-53.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H et al (1999). *Science.* **284**:479-82
- Narita N., Bielinska M., Wilson D.B (1997): Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development.* **124**:3755-64
- Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* **260**(5554):799-802.
- Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D (2001): Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res.* **89**(11):944-56.

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) : Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.*(4):328-30.
- Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005) : Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell.* **2**;123(5):917-29.
- Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. (2004) : Cav3.2 subunit underlies the functional T-type Ca<sup>2+</sup> channel in murine hearts during the embryonic period. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286**(6):H2257-63.
- Norton JD (2000) : ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* **113** ( Pt 22):3897-905.
- Nuss HB, Houser SR (1993): T-type Ca<sup>2+</sup> current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res.* **73**(4):777-82.
- Nuss HB, Marban E (1994): Electrophysiological properties of neonatal mouse cardiac myocytes in primary culture. *J Physiol.* **479** ( Pt 2):265-79.
- O'Brien TX, Lee KJ, Chien KR (1993): Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A.***90**(11):5157-61.
- Olson N.E, Srivastava D (1996): Molecular pathway controlling heart development.*Science.***272**:671-78.
- Orkin SH (2005) : Chipping away at the embryonic stem cell network. *Cell.***122**(6):828-30.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2002): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(18):10344-9.
- Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M.(1996): Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res.* **229**(2):318-26.
- Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ (2004): Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem.* **12**;279(46):48063-70.
- Pawson T, Scott JD (1997): Signaling through scaffold, anchoring , and adaptor proteins.*Science.***278**:2075-80
- Pechan PM (1991) : Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett.* **280**(1):1-4.
- Pellegrini, S. and I. Dusanter-Fourt (1997): The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem.* **248**(3): 615-33.
- Pelton TA., Bettess MD., Lake I., Rathjen., Rathjen PD (1998) : Developmental complexity of early mammalian pluripotent cell populations in vivo and in vitro. *Reprod.Fertil.Dev.* **10**: 535-549

- Pera MF, Trounson AO (2004): Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development*. **131**(22):5515-25.
- Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE (1999): Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem*. **274**(4):2556-62.
- Pesce M., Scholer H.R (2001): Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells*.**19**:271-78.
- Pinto JM, Sosunov EA, Gainullin RZ, Rosen MR, Boyden PA (1999): Effects of mibefradil, a T-type calcium current antagonist, on electrophysiology of Purkinje fibers that survived in the infarcted canine heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **10**(9):1224-35.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*. **105**(4):511-9.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000): Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*. **102**(1):89-97.
- Plotnikov, A. N., E. A. Sosunov, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L, Janse MJ, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB, Danilo P Jr, Rosen MR (2004): Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation*. **109**(4): 506-12.
- Poelmann RE, Jongbloed MR, Molin DG, Fekkes ML, Wang Z, Fishman GI, Doetschman T, Azhar M, Gittenberger-de Groot AC (2004): The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? *Anat Embryol (Berl)*. **208**(5):389-93
- Potapova, I., A. Plotnikov, Lu Z, Danilo P Jr, Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR, Cohen IS. (2004): Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*. **94**(7): 952-9.
- Qu, J., A. N. Plotnikov, Danilo P Jr, Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB, Rosen MR (2003): Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation*. **107**(8): 1106-9.
- Ramalho-Santos M, Yoo S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA (2002): Stemness: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*.**298**:597-600
- Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH (1998): The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature*. **392**(6672):186-90.
- Rentschler S, Vaidya D.M., Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley G.E, Jalife J, Fishman G.I. (2001): Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*.**128**:1785-92.

- Rentschler S, Zander J, Meyers K, France D, Levine R, Porter G, Rivkees SA, Morley GE, Fishman GI (2002) : Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(16):10464-9.
- Richards M, Tan S.P., Tan J.H., Chan W.K., Bongso A (2004): The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells.* **22**: 51-64.
- Riley P.R., Gertenstein M., Dawson K., Cross J.C (2000): Early exclusion of Hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos. *Dev Biol.* **227**:156-68
- Rindt H, Gulick J, Knotts S, Neumann J, Robbins J(1993) : In vivo analysis of the murine beta-myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem.* **268**(7):5332-8.
- Roberts A.B., McCune B.K., Sporn M.B (1992): TGF $\beta$ : regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* **41**:557-59.
- Rosen, M. R., P. R. Brink, Cohen IS, Robinson RB (2004): Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc Res.* **64**(1): 12-23.
- Rosoff ML, Nathanson NM (1998) : GATA factor-dependent regulation of cardiac m2 muscarinic acetylcholine gene transcription. *J Biol Chem.* **273**(15):9124-9.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L et al (2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signalling by a pharmacological GSK-3 specific inhibitor. *Nat Med.* **10**:55-63
- Sato N, Tanaka H, Habuchi Y, Giles WR (2000) : Electrophysiological effects of ibutilide on the delayed rectifier K(+) current in rabbit sinoatrial and atrioventricular node cells. *Eur J Pharmacol.* **404**(3):281-8
- Sauer H, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M (2001): Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **281**(1):H411-21
- Savatier P, Huang S, Szekely L, Wiman KG, Samarut J (1994) : Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene.* **9**(3):809-18
- Schott J.J., Benson D.W., Basson C.T., Pease W., Silberbach G.M., Moak J.P., Maron B., Seidman C.E., Seidman J.G (1998): Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2.5. *Science.* **281**:108-11.
- Schram G, Pourrier M, Melnyck P, Nattel S (2002): Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* **90**:939-50.
- Schratt G., Philippar U., Hockemeyer D., Schwarz H., Alberti S., Nordheim A (2004) : SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *EMBO.* **23**:1834-44.
- Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB (1995) : Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development.* **121**(12):4203-14.

- Searcy RD, Vincent EB, Liberatore CM, Yutzey KE (1998): A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development*. **125**(22):4461-70.
- Seino S (1999) : ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol*. **61**:337-62.
- Severs N.J (1990): The cardiac gap junction and intercalated disk. *Int.J.Cardiol*. **26**:127-173.
- Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, Falco G, Martin PR, Stagg CA, Basseley UC, Wang Y, Carter MG, Hamatani T, Aiba K, Akutsu H, Sharova L, Tanaka TS, Kimber WL, Yoshikawa T, Jaradat SA, Pantano S, Nagaraja R, Boheler KR, Taub D, Hodes RJ, Longo DL, Schlessinger D, Keller J, Klotz E, Kelsoe G, Umezawa A, Vescovi AL, Rossant J, Kunath T, Hogan BL, Curci A, D'Urso M, Kelso J, Hide W, Ko MS (2003): Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol*. **1**(3):E74
- Sirard C., Pompa J.L., Elia A., Itie A., Mirtsos C., Cheung A., Hahn S., Wakeham A., Schwartz L., Kern S.E., Rossant J., Mak T.W (1998): the tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes and Development*. **12**:107-119.
- Slager HG, van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-van Raaij AJM, Mummery CL (1993): TGF-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet*. **14**:212-224.
- Smith, A. G. (2001): Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 435-62.
- Smith, A.G. (1991): Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J.Tissue Cult.Methods*. **13**
- Snouwaert JN, Gowen LC, Lee V, Koller BH(1998) : Characterization of Brca1 deficient mice. *Breast Dis*. **10**(1-2):33-44.
- Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN (1995): A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*. **270**(5244):1995-9
- Stanley EG, Biben C, Elefanty A, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Harvey RP (2002): Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5. *Int J Dev Biol*. **46**(4):431-9.
- Starr R, Hilton DJ (1999): Negative regulation of the Jak/STAT pathway. *BioEssays*. **21**:47-52
- Starr, R., U. Novak, et al. (1997): Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain and gp130 in cell type-specific signal transduction. *J Biol Chem*. **272**(32): 19982-6.
- Stewart CL (2000) : Oct-4, scene 1: the drama of mouse development. *Nat Genet*. **(4)**:372-6
- Stewart, C. L., P. Kaspar, et al. (1992): Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* .**359**(6390): 76-9.
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003): The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(25):15235-40.

Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Chawengsaksophak K, Beck K, Rossant J (2005): Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. **132**: 2093-2102.

Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT(2003): Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation*. **107**(14):1912-6.

Takahara Y, Matsuda Y, Irie K, Matsumoto K, Hara J (2000) : 14-3-3 protein family members have a regulatory role in retinoic acid-mediated induction of cytokeratins in F9 cells. *Exp Cell Res*. **260**(1):96-104.

Ten Dijke P., Goumans M.J., Itoh F., Itoh S (2002): Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J.Cell.Physiol*.**19**:1-16.

Thomas PS, Kasahara H, Edmonson AM, Izumo S, Yacoub MH, Barton PJ, Gourdie RG (2001) : Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells. *Anat Rec*. **263**(3):307-13.

Thomas T, Yamagashi H, Overbeck P.A., Olson E.N, Srivastava D (1998) : The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness.*Dev Biol*.**196**:228-36.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM ( 1998) : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*.**6**;282(5391):1145-7.

Thomson JA, Marshall VS (1998): Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*. **38**:133-65.

Thuerauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC (1994): Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem*. **269**(27):17772-5.

Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR (1996) : Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature*. **383**(6603):837-40.

Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH (2001) : Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res*. **29**(12):2549-57.

Tsuda T, Philp N, Zile MH, Linask KK (1996): Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev Biol*. **173**(1):39-50.

Tzahor E and Lassar AB (2001): Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis.*Genes Dev*.**15**:255-60

Ueyama T, Kasahara H, Ishiwata T, Nie Q, Izumo S (2003): Myocardin expression is regulated by Nkx2.5, and its function is required for cardiomyogenesis. *Mol Cell Biol*. **23**(24):9222-32.

van Kempen M, van Ginneken A, de Grijs I, Mutsaers N, Opthof T, Jongsma H, van der Heyden M.(2003): Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cell Physiol Biochem*. **13**(5):263-70.

- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woschloski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001): *Annu.Rev.Biochem.* **70**:5535-602.
- Vassilieva S, Guan K, Pich U, et al (2000): Establishment of SSEA-1 and Oct4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the Il-6 family on clonal growth. *Exp Cell Res.* **258**:361-373.
- Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ, Bouman LN (2001): Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res.* **52**:40-50.
- Vernallis AB, Hudson KR, Heath JK (1997): An antagonist for the leukaemia inhibitory factor receptor inhibits leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1, ciliary neurotrophic factor, and oncostatin M. *J Biol Chem.* **272**:26947-52
- Verrecchia F., Mauviel A (2002): Transforming growth factor signalling through the smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation *J.Invest.dermatol.* **118**:211-5.
- von Both I, Silvestri C, Erdemir T, Lickert H, Walls JR, Henkelman RM, Rossant J, Harvey RP, Attisano L, Wrana JL (2004): Foxh1 is essential for development of the anterior heart field. *Dev Cell.* **7**(3):331-45.
- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML (2001): Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development.* **128**(16):3179-88.
- Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ (1998): Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell.* **92**:797-808.
- Wang D., Chang P.S., Wang Z, Sutherland L, Richardson J.A., Small E, Krieg P.A., Olson E.N (2001): Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell.* **105**:851-62.
- Wang DZ, Reiter RS, Lin JL, Wang Q, Williams HS, Krob SL, Schultheiss TM, Evans S, Lin JJ (1999): Requirement of a novel gene, Xin, in cardiac morphogenesis. *Development.* **126**(6):1281-94.
- Wang G.F., Nikovits W, Schleinitz M., Stockdale F.E (1996): Atrial chamber specific expression of the slow myosin heavy chain 3 gene in the embryonic heart. *J Biol Chem.* **271**:198836-45.
- White SM, Claycomb WC (2005): Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **288**(2):H670-9.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Tagliatela M, Brown AM (1995) : Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res.* **76**(3):343-50.
- Wickman K, Nemej J, Gendler SJ, Clapham DE (1998) : Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron.* **20**(1):103-14
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM(1997): Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **29**(6):1525-39.

- Xu C, Liguori G, Adamson ED, Persico MG (1998): Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol.* **196**(2):237-47.
- Xu C, Liguori G, Persico MG, Adamson ED (1999) : Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development.* **126**(3):483-94.
- Xu H, Guo W, Nerbonne JM (1999) : Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* **113**(5):661-78.
- Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vazquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N (2003): Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem.***278**:49085-94.
- Xu, R. H., R. M. Peck, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005): Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods.* **2**(3): 185-90.
- Xu, R. H., X. Chen, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA. (2002): BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol.* **20**(12): 1261-4.
- Yamagishi H., Yamagishi C., Nakagawa O., Harvey R.P., Olson E.N., Srivastava D (2001) :The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation.*Dev Biol.***239**:156-68.
- Yang HT, Tweedie D, Wang S, Guia A, Vinogradova T, Bogdanov K, Allen PD, Stern MD, Lakatta EG, Boheler KR (2002) :The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(14):9225-30
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003): BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* **115**(3):281-92.
- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R (2003) : Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci.* **23**(20):7577-85.
- Yue J., Mulder K.M (2000): Requirement of ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor b for transforming growth factor β1 production in a smad dependent pathway.*J.B.C.***275**:30765-7
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL (2001): The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol.* **533**(Pt 3):697-710.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN(2001) : minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res.* **88**(10):1012-9.
- Zhang YM, Shang L, Hartzell C, Narlow M, Cribbs L, Dudley SC Jr (2003): Characterization and regulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**(6):H2770-9.

Zhang Z, Xu Y, Song H, Rodriguez J, Tuteja D, Namkung Y, Shin HS, Chiamvimonvat N (2002) : Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res.* **90**(9):981-7.

Zimmer T, Bollensdorff C, Haufe V, Birch-Hirschfeld E, Benndorf K (2002): Mouse heart Na<sup>+</sup> channels: primary structure and function of two isoforms and alternatively spliced variants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**(3):H1007-17.

Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR (1997) : CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development.* **124**(4):793-804.

## **ANNEXES**

- **Annexe : Liste des essais TaqMan (TaqMan gene expression Assays, Applied Biosystems) utilisés en RT-PCR semi-quantitative**

**Low density Arrays dédiées aux canaux ioniques**

Sondes TaqMan	Nom du gène	Nom de la protéine	Fonctions
Mm00803450_m1	Abcc8	Sur1, ATP binding cassette, sub family C (CFTR/MRP) member 8	sous-unité régulatrice, du courant $I_{K_{ATP}}$
Mm00441638_m1	Abcc9	Sur2, ATP binding cassette, sub family C (CFTR/MRP) member 9	sous unité régulatrice, du courant $I_{K_{ATP}}$
Mm00808218_g1	Acta1	Actin $\alpha$ 1, squeletal muscle	
Mm00477277_g1	Actc1	Actin $\alpha$ cardiac	
Mm00618325_m1	Ank2	Ankyrin 2, brain	
Mm00523255_m1	Atp1a1	ATPase $Na^+/K^+$ transporting alpha 1 polypeptide	Pompe $Na/K$ ATPase sous-unité $\alpha$ 1
Mm00437612_m1	Atp1b1	ATPase $Na^+/K^+$ transporting beta 1 polypeptide	Pompe $Na/K$ ATPase sous- unité $\beta$ 1
Mm00437634_m1	SERCA 2	ATPase $Ca^{2+}$ transporting cardiac muscle, slow twitch 2	Pompe calcique
Mm00551384_m1	Cacna1d	Cav 1.2, calcium channel voltage dependant, L type, alpha 1d subunit	sous-unité $\alpha$ canal calcique de type L
Mm00437917_m1	Cacna1c	Cav 1.3, calcium channel voltage dependant, L type, alpha 1C subunit	sous-unité $\alpha$ canal calcique de type L
Mm00486549_m1	Cacna1g	Cav 3.1 calcium channel voltage dependant, L type, alpha 1g subunit	sous-unité $\alpha$ canal calcique de typeT
Mm00445369_m1	Cacna1h	Cav 3.2 calcium channel voltage dependant, L type, alpha 1h subunit	sous-unité $\alpha$ canal calcique de typeT
Mm00486607_m1	Cacna2d1	Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 calcium channel voltage dependant, $\alpha$ 2 $\delta$ 1	subunit sous-unité régulatrice calcique
Mm00457825_m1	Cacna2d2	Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 calcium channel voltage dependant, $\alpha$ 2 $\delta$ 2 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00486613_m1	Cacna2d3	Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 3 calcium channel voltage dependant, $\alpha$ 2 $\delta$ 3 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00518940_m1	Cacnb1	Cav $\beta$ 1, calcium channel voltage dependant, $\beta$ 1 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00659092_m1	Cacnb2	Cav $\beta$ 2 calcium channel voltage dependant, $\beta$ 2 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00432233_m1	Cacnb3	Cav $\beta$ 3, calcium channel voltage dependant, $\beta$ 3 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00519216_m1	Cacng7	Cav $\gamma$ 7 calcium channel voltage dependant, $\gamma$ 7 subunit	sous-unité régulatrice calcique
Mm00486655_m1	Calm1	Calmodulin 1	

Mm00486742_m1	Casq2	Calséquestrin 2 protéine séquestrant le calcium	protéine séquestrant le calcium
Mm00438245_m1	Clcn2	Chloride channel 2	Canaux chlore
Mm00432566_m1	Clcn3	Chloride channel 3	Canaux chlore
Mm00487032_m1	Cnn1	calponine	
Mm00801666_g1	Colla1	Procollagène de type 1, alpha 1	
Mm00439105_m1	Gja1	Gap junction membrane channel protein alpha 1	Connexine 43
Mm01179783_m1	Gja4	Gap junction membrane channel protein alpha 4	Connexine 37
Mm00433619_s1	Gja5	Gap junction membrane channel protein alpha 5	Connexine 40
Mm00433624_m1	Gja7	Gap junction membrane channel protein alpha 5	Connexine 45
Mm00468832_m1	Hcn1	Hyperpolarization –activated cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 1	HCN1 responsable du Courant I <sub>f</sub>
Mm00468538_m1	Hcn2	Hyperpolarization –activated cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 2	HCN2, responsable du Courant I <sub>f</sub>
Mm00468543_m1	Hcn3	Hyperpolarization –activated cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 3	HCN3, responsable du Courant I <sub>f</sub>
Mm01176086_m1	Hcn4	Hyperpolarization –activated cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 4	HCN4, responsable du Courant I <sub>f</sub>
Mm00446190_m1	Il6	Interleukin 6	
Mm00444937_m1	Itrp2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2	Recepteur à l'IP3 (RIP3) de type 2
Mm00439977_s1	Kcna1	Kv 1.1, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 1	canal potassique
Mm01546131_g1	Kcna2	Kv 1.2, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 2	canal potassique
Mm00434599_s1	Kcna3	Kv 1.3, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 2	canal potassique
Mm01336166_m1	Kcna4	Kv 1.4, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 4	canal potassique
Mm00524346_s1	Kcna5	Kv 1.5, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 5	Sous-unité $\alpha$ responsable Du courant I <sub>Kur</sub>
Mm00496625_s1	Kcna6	Kv 1.6, potassium voltage gated channel shaker related subfamily member 6	canal potassique
Mm00440018_m1	Kcnab1	Kv $\beta$ 1, potassium voltage gated channel shaker related subfamily beta member 1	sous-unité régulatrice potassique

Mm00440022_m1	Kcnab2	Kv $\beta$ 2, potassium voltage gated channel shaker related subfamily beta member 2	sous-unité régulatrice potassique
Mm00440034_g1	Kcnab3	Kv $\beta$ 3, potassium voltage gated channel shaker related subfamily beta member 3	sous-unité régulatrice potassique
Mm00492791_m1	Kcnb1	Kv2.1, potassium voltage gated channel shab related subfamily member 1	
Mm00434614_m1	Kcnc3	Kv3.3, potassium voltage gated channel shaw related subfamily member 3	
Mm00492796_m1	Kcnd1	Kv4.1, potassium voltage gated channel Shal related subfamily member 1	
Mm00498065_m1	Kcnd2	Kv4.2, potassium voltage gated channel Shal related subfamily member 2	
Mm00498260_m1	Kcnd3	Kv4.3, potassium voltage gated channel Shal related subfamily member 3	
Mm00517596_s1	Kcne11	potassium voltage gated channel Isk related family member 1 like	Sous-unités régulatrices
Mm01215533_m1	Kcne1		Sous-unités régulatrices
Mm00506492_m1	Kcne2	MIRP1, potassium voltage gated channel Isk related family gene 2	Sous-unités régulatrices
Mm00445120_m1	Kcne3	MIRP2, potassium voltage gated channel Isk related family gene 3	Sous-unités régulatrices
Kcnh2- Mm00465370_m1	Kcnh2	Merg, potassium voltage gated channel subfamily H (eag related) member 1	Sous-unité a responsable courant I <sub>Kr</sub>
Mm00471928_m1	Kcnip1	KCHIP1, Kv channel interacting protein 1	sous-unité régulatrice potassique
Mm00518915_g1	Kcnip2	KCHIP2, Kv channel interacting protein 2	sous-unité $\alpha$ régulatrice potassique
Mm00440050_s1	Kcnj11	Kir 6.2, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant I <sub>KATP</sub>
Mm01237201_m1	Kcnj12	Kir 2.2, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 12	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant I <sub>K1</sub>
Mm00434616_m1	Kcnj2	Kir2.1, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 2	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant I <sub>K1</sub>
Mm00434618_m1	Kcnj3	Kir3.1, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 3	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant I <sub>Ach</sub>
Mm01175829_m1	Kcnj5	Kir 3.4, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 5	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant I <sub>Ach</sub>

Mm00434620_m1	Kcnj8	Kir 6.1, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11	Sous-unité $\alpha$ responsable Courant $I_{K_{ATP}}$
Mm00434624_m1	Kcnk1	TWIK1, potassium channel, subfamily K, member 1	
Mm00440072_m1	Kcnk2	TREK-1, potassium channel, subfamily K, member 2	
Mm00807036_m1	Kcnk3	TASK, potassium channel, subfamily K, member 3	
Mm00498900_m1	Kcnk5	TASK2, potassium channel, subfamily K, member 5	
Mm00446259_m1	Kcnn1	SK1, potassium intermediate/small conductance calcium activated channel, subfamily N member 1	
Mm00446514_m1	Kcnn2	SK2, potassium intermediate/small conductance calcium activated channel, subfamily N member 2	
Mm00446516_m1	Kcnn3	SK3, potassium intermediate/small conductance calcium activated channel, subfamily N member 3	
Mm00434641_m1	Kcnq1	KVLQT1, potassium voltage gated channel, subfamily Q, member 1	Sous-unité $\alpha$ responsable courant $I_{K_s}$
Mm00440354_m1	Myh6	Myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle $\alpha$	Chaîne lourde de la myosine de type $\alpha$ ( $\alpha$ MHC)
Mm00600555_m1	Myh7	Myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle $\beta$	Chaîne lourde de la myosine de type $\beta$ ( $\beta$ MHC)
Mm00440384_m1	Myl2	Myosin, light polypeptide 2 regulatory cardiac slow	Chaîne légère de la myosine de type ventriculaire de type 2 (MLC2v)
Mm00440378_m1	Myl4	Myosin, light polypeptide 4 regulatory cardiac slow	Chaîne légère de la myosine de type atrial de type 1 (MLC1a)
Mm00657783_m1	Nkx2-5	Nkx2.5, NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	Facteur de transcription
Mm00435304_g1	Nppb	Natriuretic peptide precursor type B	Facteur natriurétique de type B (BNP)
Mm00450739_m1	Pias3	Protein inhibitor of activated STAT3	KCHAP sous-unité régulatrice
Mm00452263_m1	Pln	Phospholamban	Phospholamban, régulateur de la SERCA2
Mm00465877_m1	Ryr2	Ryanodine receptor 2, cardiac	Récepteur à la ryanodine (RYR2)
Mm00441210_m1	Scn1b	Nav $\beta$ 1, Sodium channel, voltage-gated, type 1, beta polypeptide	sous-unité régulatrice sodique
Mm00658167_m1	Scn3a	Nav1.3, Sodium channel, voltage-gated, type 3, alpha polypeptide	Sous-unité $\alpha$ Courant $I_{Na}$
Mm00463369_m1	Scn3b	Nav $\beta$ 3, Sodium channel, voltage-	sous-unité

		gated, type 3, beta polypeptide	régulatrice sodique
Mm00500103_m1	Scn4a	Nav1.4, Sodium channel, voltage-gated, type 4, alpha polypeptide	Sous-unité $\alpha$ Responsable du courant $I_{Na}$
Mm00451971_m1	Scn5a	Nav1.5, Sodium channel, voltage-gated, type 5, alpha polypeptide	Sous-unité $\alpha$ Responsable du courant $I_{Na}$
Mm00801952_m1	Scn7a	Nav2.3, Sodium channel, voltage-gated, type 6 alpha polypeptide	Sous-unité $\alpha$
Mm00441524_m1	Slc8a1	NCX1, solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	Échangeur Na/Ca
Mm00803521_m1	Tbx5	Tbx5, T box 5	Facteur de transcription
Mm00502426_m1	Tnni1	Troponin 1, skeletal, slow 1	
Mm00437164_m1	Tnni3	Troponin 1 cardiac	
Mm00495900_m1	Uchl1	Ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1	
Mm99999915_g1	Gapdh	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Gène de référence
Mm00446968_m1	Hprt1	Hypoxantine guanine phosphoribosyl transferase	Gène de référence
Hs99999901_s1	Hs		Gène de référence
Mm00839493_m1	Polr2a	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	Gène de référence
Mm00484689_m1	Gata4	Gata binding protein 4	Facteur de transcription
Mm00658129_gH	Pou5f1	Pou domain, class 5 transcription factor 1	Facteur de transcription
Mm00494246_m1		14.3.3	

### TaqMan assay individuel

Mm00502170	IRX4	Iroquois related homeobox 4 (Drosophila)	Facteur de transcription
Mm00482936	Calr	calréticuline	
Mm01317678	PP3CA	Calcineurine	

## Résumé

---

### **Analyse « génotypique » et fonctionnelle des cardiomyocytes issus de la différenciation précoce des cellules souches embryonnaires murines.**

Les cellules souches embryonnaires (ES) de par leur pluripotence constituent un excellent modèle pour étudier les stades précoces de la différenciation cardiaque. Ce travail a permis la caractérisation phénotypique, « génotypique » et fonctionnelle des cardiomyocytes issus de la différenciation des cellules murines ES R1 à différentes étapes de cette différenciation. D'une part, le profil d'expression génique et les études électrophysiologiques montrent que les progéniteurs cardiaques dérivés des cellules ES à des stades précoces de différenciation présentent les caractéristiques des cellules cardiaques de type pacemaker. D'autre part, les cardiomyocytes isolés à des stades de différenciation plus tardifs présentent un profil génotypique de type atrial. Les résultats obtenus à partir de co-culture de cardiomyocytes dérivés des ES et de cardiomyocytes néonataux d'origine atriale ou ventriculaire suggèrent une capacité d'adaptation de ces cardiomyocytes en fonction de la niche tissulaire.

Mots clés : cellules souches embryonnaires murines - différenciation cardiaque in vitro- électrophysiologie- co-culture ES et cardiomyocytes néonataux- RT PCR semi quantitative- immunomarquage- profil d'expression génique.

### **Abstract**

---

### **“Genomic” and functional study of cardiomyocytes derived from the early differentiation of murine embryonic stem cells.**

The embryonic stem cells (ES) by their pluripotence constitute an appropriate model to study the early events leading to cardiac cellular differentiation. In the present study, we investigated at different steps of the in vitro differentiation, the genomic and functional expression of murine ES-derived cardiomyocytes. The results of gene expression profile by semi quantitative and electrophysiological studies, allowed us to demonstrate that these cardiac cells at an early stage of differentiation have properties similar to those described in native cardiac pacemaker. Moreover, those isolated at a later stage have an atrial-like gene expression profile in our culture conditions. The results obtained by co-culturing neonatal atrial or ventricular cardiomyocytes with ES-derived cardiac cells suggest that cells have the ability to modify their phenotype depending on their environment. This environment may condition the final phenotype expression of ES-derived cardiac cells.

Keywords: embryonic stem cells- cardiac differentiation in vitro- electrophysiology-co-culture ES cells and neonatal cardiomyocytes-semi quantitative RT –PCR-genes expression profile-immunostaining.

Institut du Thorax INSERM U-533, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 01