

## Souris invalidées pour le facteur de transcription *HF-1b* : un modèle de mort subite

La mort subite est une cause de mortalité cardiovasculaire importante responsable de 400 000 décès par an aux États-Unis et environ 70 000 en France. L'arrêt circulatoire survient en général à l'occasion d'un épisode brutal de trouble du rythme (arythmie) ventriculaire imprévu. En outre, il n'existe actuellement pas de traitement pharmacologique totalement préventif de la mort subite ce qui conduit parfois à recourir à une thérapie palliative fondée sur l'implantation d'un défibrillateur. La compréhension des mécanismes responsables de cette pathologie ainsi que l'obtention de modèles expérimentaux de mort subite semblent donc des prérequis nécessaires à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La pathogénie de la mort subite est multifactorielle et les mécanismes impliqués n'ont pas encore été totalement identifiés à ce jour. Récemment, des mutations dans des gènes codant pour des canaux sodiques et potassiques cardiaques ont été identifiées chez des patients présentant des arythmies ventriculaires associées à un allongement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme. Cet allongement de l'intervalle QT, appelé syndrome du QT long, est le témoin d'un ralentissement de la repolarisation ventriculaire qui entraîne une augmentation de la durée du potentiel d'action pouvant constituer un substrat pro-arythmogène important [1-3]. Cependant, parmi les membres des familles affectées par ces mutations et présentant des épisodes d'arythmies ventriculaires, seuls 20 % des individus présenteront une mort subite. Ceci suggère que d'autres anomalies génétiques que celles responsables du syndrome du QT long

sont associées à une mort subite, surtout si l'on considère que seulement 1 % des cas de mort subite constatée est dû à des mutations dans des protéines constitutives des canaux ioniques.

Dans ce contexte, l'équipe de Kenneth Chien (Université de San Diego, Californie) a développé un modèle de souris modifiée génétiquement qui présente un phénotype cardiaque de mort subite par arythmies ventriculaires [4]. Le gène inactivé code le facteur de transcription *HF-1b*, une protéine en doigt-de-zinc apparentée à la famille des facteurs *Sp1* [5], qui semble impliquée dans la différenciation des cellules du système de conduction à partir des cellules souches communes aux myocytes ventriculaires. La fonction de pompe phasique du cœur, muscle animé de contractions régulières, nécessite en effet le développement d'un système *pacemaker* et de conduction spécialisé. Ces structures permettent le démarrage puis la propagation de l'influx cardiaque de façon à aboutir à la contraction pratiquement synchronisée de tous les myocytes des ventricules. On sait depuis peu que les cellules responsables de la conduction cardiaque dérivent des myocytes, mais les mécanismes impliqués dans cette transition phénotypique et fonctionnelle n'étaient jusqu'à présent pas connus.

### Phénotype cardiaque des souris *HF-1b*<sup>-/-</sup>

Les souris mutantes sont principalement caractérisées par un fort taux de mortalité post-natale : 11 % dans les premiers jours après la naissance, 32 % à l'âge de 4 semaines et 15 %

vers 6-8 mois. Finalement, seulement 40 % des souris mutantes arrivent à l'âge adulte. Les souris, qui ne présentent aucune pathologie décelable, meurent toutes de mort subite inexplicable.

Les études échocardiographiques n'ont révélé aucune anomalie morphologique cardiaque : le volume des cavités et l'épaisseur des parois sont normaux. Aucun infarctus n'a été retrouvé. Des investigations électrophysiologiques ont donc été réalisées dans le groupe de souris atteignant l'âge adulte pour tenter de comprendre les bases de ce phénotype de mort subite. L'électrocardiogramme montre que ni la fréquence cardiaque ni l'intervalle PR, qui traduit le délai de conduction de l'influx entre les oreillettes et les ventricules, ne sont modifiés. En revanche, la stimulation des ventricules des souris mutantes à l'aide d'électrodes miniaturisées a permis de mettre en évidence leur grande susceptibilité à déclencher des tachycardies ventriculaires essentiellement monomorphes et non soutenues (se terminant spontanément en moins d'une seconde). L'application d'un stimulus prématuré unique au cours de la diastole (phase de relaxation ventriculaire) conduit en effet systématiquement au déclenchement d'un épisode arythmique, et ce, chez toutes les souris mutantes homozygotes.

Afin de déterminer une éventuelle corrélation entre arythmies ventriculaires et mort subite, un enregistrement électrocardiographique continu de l'activité cardiaque des souris mutantes et sauvages a été réalisé. L'utilisation d'un système miniaturisé de radio-télémetrie implantable a permis de faire cette étude sur des

souris conscientes, non anesthésiées, sur une période cumulée de 166 jours. L'analyse des tracés montre une corrélation entre mort subite et épisodes d'arythmie ventriculaire. Si aucune anomalie de conduction n'a été détectée chez les souris témoins, le cœur des souris mutantes homozygotes présente en revanche des anomalies aux différents étages du système de conduction : nœuds sinusal (qui détermine le rythme cardiaque) et auriculo-ventriculaire, faisceau de His et réseau de Purkinje (qui délivrent la dépolarisation indispensable à la genèse du potentiel d'action des myocytes contractiles de la paroi des ventricules). Ceci se traduit par des bradycardies et des pauses sinusales, des blocs auriculo-ventriculaires fréquents, ainsi que des arythmies ventriculaires spontanées. L'absence d'anomalie cardiaque intrinsèque montre bien qu'il s'agit d'un défaut primitivement électrophysiologique. L'analyse des cellules isolées du cœur de ces souris révèle en effet des anomalies de la repolarisation ventriculaire : les potentiels d'action sont allongés et l'on observe une forte dispersion de leur durée, en particulier au niveau des myocytes du ventricule gauche. Il existe de plus une hétérogénéité transmural de la repolarisation. La durée du potentiel d'action est contrôlée en grande partie par des conductances potassiques qui permettent la repolarisation, en particulier un courant  $K^+$  transitoire sortant indépendant du  $Ca^{2+}$ , et un courant rectifiant retardé s'activant rapidement et s'inactivant lentement,  $I_{K, \text{lent}}$  [6, 7]. Chez les souris mutantes, seul ce courant rectifiant retardé est diminué, sans changement significatif du courant transitoire, ni de celui qui contrôle le potentiel de membrane ( $I_{K1}$ ).

### Un défaut de lignage des cellules du système de conduction

Le remplacement du gène *HF-1b* par celui de la  $\beta$ -galactosidase (*knockin lacZ*) révèle qu'au cours du développement, *HF-1b* s'exprime de façon prépondérante dans le cerveau et le cœur, plus particulièrement dans les zones du septum interventriculaire qui coïncident avec le tissu de

conduction (mais également dans la paroi libre des ventricules gauche et droit) [4]. Ceci est un argument supplémentaire pour penser que ce facteur puisse jouer un rôle dans la différenciation des cellules responsables de la conduction cardiaque.

Le profil d'expression de ces cellules diffère selon leur phénotype électrophysiologique. La connexine 40 (Cx40) est un bon marqueur des systèmes de conduction central et périphérique du cœur de souris [8, 9]. Elle est localisée au niveau des disques intercalaires au cours des trois semaines postnatales jusqu'à la différenciation terminale des myocytes ventriculaires et des cellules du réseau de Purkinje distal [10]. Au cours du développement, elle est exprimée dans les mêmes régions que HF-1b (déterminée par le marquage Lac Z). L'absence de HF-1b ne modifie pas l'expression de la Cx40 dans les cellules conductrices en dehors des cellules de Purkinje distales qui sont beaucoup moins nombreuses à exprimer la protéine (45 % versus 84 % chez les souris sauvages) [4]. On observe en outre des anomalies franches de sa distribution cellulaire. Pendant le développement postnatal précoce, les Cx se redistribuent en effet du cytoplasme vers la membrane cellulaire pour former les jonctions communicantes [11]. Ainsi, dans les cœurs de souris adultes sauvages, la Cx40 est localisée préférentiellement au niveau de la membrane cellulaire des cellules de Purkinje. En revanche, ce taux est beaucoup plus faible pour les souris mutantes. Il apparaît donc que HF-1b joue un rôle dans l'adressage de cette protéine vers les jonctions communicantes. Ces résultats renforcent aussi l'hypothèse d'une distribution anormale des connexines dans la pathogénie de certains troubles du rythme ([12-14] et *m/s* 1997, n° 8-9, p. 1043). Une autre protéine, minK, constitue aussi un marqueur du système de conduction cardiaque murin [15]. Elle s'associe avec KvLQT1 pour former des canaux potassiques produisant un courant rectifiant retardé ( $I_{K, \text{slent}}$ ) participant à la repolarisation des myocytes cardiaques de mammifères [16]. Chez le souriceau sauvage, cette protéine est normalement

exprimée au niveau de la jonction auriculo-ventriculaire et le long des voies de conduction du septum interventriculaire. En l'absence de HF-1b, son expression est intense et désorganisée dans toute la paroi ventriculaire et surtout, elle persiste de façon anormale à l'âge adulte (à l'exception de la zone septale).

### Conclusions

Ces travaux montrent le rôle essentiel du facteur de transcription HF-1b dans la transition phénotypique qui conduit soit aux myocytes ventriculaires, soit aux cellules du système de conduction, en intervenant notamment dans la mise en place des canaux ioniques et des connexines. Tout se passe comme si l'absence de ce facteur provoque une « confusion » de phénotype entre ces deux lignées, responsable d'un allongement et d'une hétérogénéité de la durée du potentiel d'action, et finalement des arythmies ventriculaires.

Ces souris invalidées pour HF-1b constituent un modèle génétique d'étude de la mort subite caractérisée par des arythmies ventriculaires. Son intérêt majeur est qu'il ne s'inscrit ni dans le contexte d'une cardiopathie particulière ni dans celui de l'insuffisance cardiaque, ce qui suggère que la cascade impliquant HF-1b joue un rôle majeur dans le déterminisme de la mort subite. L'analyse de cette voie, aussi bien en amont qu'en aval, devrait permettre d'identifier des cibles biologiques éventuelles pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1. Curran ME, Sanguinetti MC, Keating MT. Molecular basis of inherited cardiac arrhythmias. In: Chien K, ed. *Molecular basis of cardiovascular*. Cambridge, MA: Saunders Co, 1999: 302-11.
2. Roden DM, Spooner PM. Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; 10: 1664-83.
3. Guicheney P, Barhanin J, Le Marec H. Bases moléculaires des arythmies héréditaires. *Med Sci* 1998; 14: 1025-35.
4. Nguyen-Tran VT, Kubalak SW, Minamisawa S, et al. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell* 2000; 102: 671-82.

5. Zhu H, Nguyen VT, Brown AB, *et al.* A novel, tissue restricted zinc finger protein (HF1b) binds to the cardiac regulatory element (HF-1b - MEF-2) in the rat myosin light chain-2 gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4432-44.

6. Zhou J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 1998; 83: 806-14.

7. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation and triggered activity in mice expressing a dominant negative Kv2 a subunit. *Circ Res* 1999; 85: 623-33.

8. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, *et al.* Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn* 1995; 204: 358-71.

9. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin-40 and connexin-43 correlate to functional properties of components of the cardiac

atrioventricular conduction system. *J Cell Sci* 1993; 105: 985-91.

10. Angst BD, Khan LU, Severs NJ, *et al.* Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res* 1997; 80: 88-94.

11. Litchenberg WH, Norman LW, Holwell AK, Martin KL, Hewett KW, Gourdie RG. The rate of anisotropy of impulse propagation in the postnatal terminal crest are correlated with remodeling of Cx43 gap junction pattern. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 379-87.

12. Kirchhoff S, Nelles E, Hagedorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin-40 deficient mice. *Curr Biol* 1998; 8: 299-302.

13. Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin 40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* 1998; 8: 295-8.

14. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, *et al.* Altered pattern of connexin 40 distribu-

tion in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; 9: 596-607.

15. Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wesels A, *et al.* Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999; 84: 146-52.

16. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996; 384: 78-80.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Abl a peut-être trouvé son Caïn ! Efficacité *in vivo* de l'inhibiteur d'Abelson.** Récemment, un composé de la famille des phénylaminopyrimidines, le STI571, a suscité un gros espoir thérapeutique en tant que puissant inhibiteur de l'activité tyrosine kinase portée par la protéine Abelson (Abl) [1]. En effet, dans les leucémies myéloïdes chroniques, la translocation chromosomique t(9;22) produit un gène de fusion BCR-ABL dont le produit exerce une activité tyrosine kinase constitutive (*voir m/s 1995, n° 12, p. 1669*). Toutes les lignées contenant BCR-ABL ou cellules issues de patients atteints de LMC n'offrent pas la même sensibilité à cet inhibiteur. Cette disparité provient souvent d'une amplification variable du gène *BCR-ABL*, un phénomène qui se rajoute à la translocation activatrice [2]. A présent, une collaboration de groupes milanais indique [3] que, dans un modèle tumoral par injection de cellules BCR-ABL positives, l'efficacité du STI571 est fonction de la grosseur de la tumeur induite. En revanche, les cellules tumorales *ex*

*in vivo* sont toujours sensibles à l'inhibiteur. Ceci prouve que le phénomène de résistance *in vivo* n'est pas forcément lié aux cellules tumorales. En fait, il est dû à la protéine plasmatique alpha-1 glycoprotéine acide (AGP) : *in vivo*, les concentrations circulantes d'AGP augmentent en effet avec la charge tumorale induite, et surtout, l'AGP est capable *in vitro* de fixer l'inhibiteur et de bloquer de façon dépendante de la dose son action inhibitrice sur l'activité tyrosine kinase. Un espoir supplémentaire est apporté par l'érythromycine qui est capable d'augmenter de façon considérable, chez l'animal, l'efficacité du STI571 sur les grosses tumeurs en rentrant en compétition avec lui pour la fixation d'AGP.

- [1. Druker BJ, *et al.* *Nat Med* 1996; 2: 561-6.]  
 [2. Mahon FX, *et al.* *Blood* 2000; 96: 1070-9.]  
 [3. Gambacorti-Passerini C, *et al.* *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1641-50.]

### Stéphanie Barrère-Lemaire

*Institut de génétique humaine, CNRS UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France.*

**Association Française  
des Sciences et Techniques  
de l'Animal de Laboratoire  
28, rue Saint-Dominique  
75007 Paris  
Tél. et Fax : 01 45 56 91 16**

L'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire (anciennement SFEA) organise sous la présidence de Mme Françoise Barrère-Sinoussi, les 26, 27, 28 et 29 juin 2001 au Centre Léonard-de-Vinci, Tours, ses 28<sup>es</sup> Journées d'Études Scientifiques et Techniques sur le thème :

**« Modèles animaux en pathologie humaine et animale : intérêt scientifique et spécificités techniques »**

#### Sessions

- Maladies cardiovasculaires (Président M.L. Hittinger)
- Maladies du système nerveux central (Président : M.M. Peschanski)
- Infectiologie (Présidente : Mme F. Barré Sinoussi)
- Maladies métaboliques et endocriniennes (Président : M.W. Pralong)
- Oncologie (Présidente : Mme F. Quintin-Colonna)

#### Renseignements

Alpha Visa Congrès/AFSTAL2000  
 624, rue des Grèzes  
 34070 Montpellier cedex  
 Tél. : +33 (0)4 67 03 03 00  
 Fax : +33 (0)4 67 45 57 97  
 afstal2001@alphavisa.com