



**HAL**  
open science

# Mécanodétection des forces hémodynamiques lors du développement endocardique chez l'espèce *Danio rerio*

Emilie Heckel

► **To cite this version:**

Emilie Heckel. Mécanodétection des forces hémodynamiques lors du développement endocardique chez l'espèce *Danio rerio*. Embryologie et organogenèse. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ103 . tel-01191465

**HAL Id: tel-01191465**

**<https://theses.hal.science/tel-01191465>**

Submitted on 2 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



**ÉCOLE DOCTORALE ED 414**

CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

**THÈSE** présentée par :

**Emilie HECKEL**

soutenue le : **21 octobre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie du développement

**Mécanodétection des forces  
hémodynamiques lors du  
développement endocardique chez  
l'espèce *Danio rerio*.**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr VERMOT Julien**

**Mme JARRIAULT Sophie**

CR, université de Strasbourg

CR, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme MEILHAC Sigolène**

**Mr BLADER Patrick**

CR, Institut Pasteur Paris

DR, Université de Toulouse

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr RIVELINE Daniel**

**Mr HERBOMEL Philippe**

DR, ISIS Strasbourg

DR, Institut Pasteur Paris

A mon papi Mousse,

A mes parents

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse et Julien pour m'avoir permis de la réaliser au sein de son laboratoire malgré une connaissance nulle dans le domaine de la biologie du développement lors de mon entretien, il y a déjà quatre années de cela. Je tiens particulièrement à remercier Sophie d'avoir accepté de me prendre sous son aile le temps que Julien passe son HDR, mais aussi pour ses encouragements lors de l'écriture du manuscrit, de même que Daniel, pour s'être intéressé de près à mon sujet lors des diverses présentations que j'ai pu faire, sa grande disponibilité mais également pour sa gentillesse, son enthousiasme communicatif et ses retours si bien expérimentaux que généraux quant à mon sujet.

Je souhaite aussi adresser un remerciement aux personnes m'ayant entourée lors de ces quatre années, Stéphane bien entendu, sans qui je n'aurais pas forcément mené à bien toutes mes expériences mais surtout parce que sans lui je n'aurais pas progressé dans le combat journalier contre ma peur phobique des poissons (eh oui il faut bien prendre son courage à deux mains et les rattraper lorsqu'ils sautent hors du bac de croisement quand tu n'es pas là!). Un grand merci aux filles du laboratoire, Emily, Rita et Caro pour avoir entretenu mon moral au beau fixe à coup de tartes, cupcakes, et autres gâteaux délicieux lors de ma rédaction, mais également pour leur conseils et soutien lors des expériences menées. Il en va de même pour Francesco qui a toujours une petite histoire à raconter pendant les repas pour nous faire rire et qui fournit un travail sur mes données calciques, à l'aide de Fabien, qui semble à mes yeux plus que prometteur. Enfin, un grand merci à Halina,

avec qui j'ai passé beaucoup de temps et sans qui l'histoire des cils n'aurait très certainement pas vu le jour au labo, mais on se rappellera surtout de l'expédition punitive de « nourrissage de poisson »...et on en rigole bien plus maintenant ! Enfin je tiens à remercier Sylvie et Sandrine pour les soins apportés à nos « précieux bébés ».

Non loin du laboratoire mais tout aussi importants pour ma thèse, je tiens à mentionner Pascal et Marc, du centre d'imagerie, qui m'ont dépannée à mainte et mainte reprise lors des problèmes microscopiques... autant dire que sans eux je serais encore en train de chercher comment mettre au point les longueurs d'ondes et autres outils indispensables à mes images! Du même côté de l'ICS, je tiens à remercier Yannick pour avoir réalisé la microscopie électronique et Coralie pour son aide sur le même sujet. J'ajoute également un grand merci à Nadia, qui m'a beaucoup soutenue lors de mon écriture et a su comprendre mes doutes.

Je tiens également à remercier Helena, Joanna, Ana, Joëlle, Adam, Maria-Elena et Andrei pour les moments passés à rigoler lors des repas mais aussi pour les petits mots de sympathie glissés à mon égard lors de cette thèse. Merci aussi à Elodie d'avoir pris du temps pour m'écouter et vérifier si mon introduction était « lisible ».

Je n'oublie pas ma partenaire de rugby Carmen, mieux connue sous le surnom de Mémé, qui, dans les jours de « j'ai pas le temps, je dois finir cette partie » ou encore dans les jours de « sans nom descriptible » m'a préparé de nombreux petits plats afin de pouvoir continuer à écrire sans perdre de temps ou m'a confiée Crunch (mon super coach sportif canin !) pour me défouler pendant des heures en footing.

Enfin, je tiens plus que tout à remercier ma famille, principalement mes parents pour avoir toujours cru en moi, quel que soit mon parcours ou mes choix, souvent divergents les

uns des autres. Papa, merci pour cet esprit de compétition sans lequel je ne serais pas là où j'en suis actuellement, parce qu'il est vrai que lorsque l'on travaille dur et que l'on met toutes les chances de son côté on parvient à ce que l'on veut, mais surtout parce que chez nous, si on tombe, on se relève et on y retourne avec deux fois plus d'envie. Maman, merci d'avoir toujours su trouver le bon mot pour me remonter le moral dans les moments les plus durs et d'avoir pu rester des heures au téléphone à faire « chauffer l'oreille ». Quoi qu'il en soit soyez sûr que, du fait de ces expériences, j'en ressors chaque jour un peu plus grandie. Je tiens également à envoyer un merci à ma mamie, sur lequel mon caractère, paraît-il, déteint de trop mais sans lequel cette histoire n'aurait sans doute pas été la même. Bien qu'il soit bien trempé, voire trop par moments, il m'a énormément servi tout au long de ces quatre années... et j'ai même réussi (un peu) à mettre de l'eau dans mon vin !

# Table des Matières

REMERCIEMENTS .....	- 3 -
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	- 9 -
LISTE DES GRAPHES .....	- 14 -
LISTE DES FIGURES .....	- 17 -
LISTE DES VIDEOS .....	- 20 -
LISTE DES TABLEAUX .....	- 22 -
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	- 23 -
RÉSUMÉ .....	- 43 -
<b>INTRODUCTION</b> .....	- 53 -
1 La formation cardiaque humaine .....	- 54 -
2 Les maladies cardiaques congénitales .....	- 61 -
3 Un modèle d'étude du développement cardiaque : le poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> )	- 62 -
4 La formation cardiaque chez le poisson zèbre .....	- 65 -
5 Expression génique et changements cellulaires lors de la cardiogénèse du poisson zèbre .....	- 70 -
6 Dynamique cardiaque et valvulaire .....	- 82 -
7 Implication des forces hémodynamiques .....	- 85 -
8 La famille des Krüppel-like factor ; le cas <i>klf2a</i> .....	- 88 -
9 Projet de la thèse .....	- 90 -
<b>RÉSULTATS</b> .....	96
<b>CHAPITRE 1: Constructions et caractérisation de lignées transgéniques <i>Tg(klf2a :h2b-eGFP)</i></b> .....	- 93 -
1 Introduction .....	- 94 -
2 La lignée <i>Tg(klf2a_6kb: h2b-eGFP)</i> ; un bon outil d'étude pour l'expression endocardique du gène <i>klf2a</i> .....	- 95 -

3	<i>Tg(klf2a_6kb: h2b-eGFP)</i> récapitule l'expression endogène de <i>klf2a</i> .....	- 98 -
4	Dépendance au flux de la lignée <i>Tg(klf2a: h2b-eGFP)</i> .....	- 99 -
4.1	La lignée <i>Tg(klf2a_6kb :h2b-eGFP)</i> semble répondre au flux.....	- 100 -
4.2	Modification de la vélocité de la contraction cardiaque et expression de <i>klf2a</i> .....	- 102 -
4.3	Modification de la viscosité cardiaque et expression de <i>klf2a</i> .....	- 118 -
5	Conclusion .....	- 124 -
<b>CHAPITRE 2: Mécanodétection endocardique ; le cil primaire</b> .....		- 125 -
1	Introduction.....	- 126 -
2	L'endocarde du poisson zèbre est cilié .....	- 128 -
2.1	Validation des lignées transgéniques .....	- 129 -
2.2	Observation des cils dans l'endocarde .....	- 130 -
3	Le cil primaire, mécanodétecteur endocardique mineur .....	- 135 -
4	Conclusion .....	- 137 -
<b>CHAPITRE 3: Mécanodétection endocardique : le cas TRPV4-TRPP2</b> .....		- 140 -
1	Transient Receptor Potential cation channel Vanilloid member 4 : TRPV4 .....	- 141 -
1.1	TRPV4, un mécanodétecteur endocardique potentiel .....	- 145 -
2	Etude approfondie de TRPV4 .....	- 146 -
2.1	TRPV4 est localisé à la surface membranaire des cellules endocardiques .....	- 146 -
2.2	TRPV4 affecte l'expression de <i>klf2a</i> .....	- 149 -
2.3	L'absence de TRPV4 affecte la valvulogénèse .....	- 153 -
3	Conclusion .....	- 156 -
4	Etude approfondie de TRPP2 .....	- 157 -
4.1	Introduction à TRPP2 .....	- 157 -
4.2	TRPP2 est localisé dans le cytoplasme cellulaire des cellules endocardiques .....	- 163 -
4.3	TRPP2 affecte l'expression de <i>klf2a</i> .....	- 165 -



---

4.4	L'absence de TRPP2 affecte la valvulogénèse .....	- 170 -
4.5	TRPP2 est flux-dépendant.....	- 172 -
4.6	TRPP2 et TRPV4 affectent l'expression de <i>klf2a</i> .....	- 177 -
5	Conclusion .....	- 181 -
<b>CHAPITRE 4: Le calcium, élément indispensable à la mécanodétection .....</b>		<b>- 184 -</b>
1	Introduction.....	- 185 -
2	Visualisation du calcium endocardique : description d'un poisson contrôle .....	- 188 -
3	Le calcium dépend du flux et de la contraction cardiaque .....	- 192 -
4	Dépendance du calcium à TRPP2 et TRPV4 .....	- 197 -
5	Conclusion .....	- 202 -
<b>CHAPITRE 5: Mécanotransduction endocardique .....</b>		<b>- 204 -</b>
1	Introduction.....	- 205 -
2	La protéine kinase C intervient dans la régulation de l'expression de <i>klf2a</i> .....	- 210 -
3	PrKD2, composant indispensable à l'expression cardiaque de <i>klf2a</i> .....	- 216 -
4	HDAC5 joue un rôle dans la voie moléculaire amenant à l'expression <i>klf2a</i> .....	- 219 -
5	Conclusion .....	- 223 -
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>- 225 -</b>
<b>REFERENCES .....</b>		<b>- 243 -</b>
<b>ANNEXE 1 .....</b>		<b>- 268 -</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>		<b>- 273 -</b>

# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

## Mots généraux

aA	Aminoacides
ADN	Acide désoxyribonucléique
APKD	Polykystose rénale autosomique doïnante
ALPM	Plaque mésodermique latérale antérieure
ARN	Acide ribonucléique
AVC / AV canal	Canal atrioventriculaire
bpm	Battement par minute
C-c	Domaine Coiled-coil
CT	Contrôle
dpf	Jour post fertilisation
ECs	Coussinets endocardiques
ECM	Matrice extracellulaire
EMT	Transition épithéliale à mésenchymateuse
ER/RE	Réticulum endoplasmique
FS%	Efficacité de contraction cardiaque en pourcentage ou fractional shortening
GFP	Green fluorescent protein
GSK3	Site de phosphorylation de la protéine TRPP2

---

HUVECS	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
hpf	Heure post-fertilisation
ICs	Courbure interne des chambres cardiaques
IP3	Inositol-triphosphate
IP3R	Récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate
ISH	Hybridation <i>in situ</i>
Jogging	Rotation cardiaque
Kb	Kilobase
MDCK	Madin-Dabry Canine Kidney cells
MET	Microscopie électronique à transmission
miRNA	Micro acide ribonucléique
Mo	Morpholino
OCs	Courbure externe des chambres cardiaques
OT	Outflow tract ou tractus efferent
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acétate
PRD	Domaine riche en proline
RA	Acide rétinoïque
RFP	Red fluorescent protein
RYR	Récepteur à la ryanodine
Ser	Sérine
TM	Domaine transmembranaire
WT	Souche sauvage
4 $\alpha$ PDD	4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Concentration calcique intracellulaire

## Gènes et protéines et voies moléculaires

amhc	<i>Atrial myosin heavy chain</i>
arl13b	ADP-ribosylation factor-like protein 13B
Bmp	Bone morphogenic protein
<i>bmp4</i>	<i>bone morphogenic protein 4</i>
camKII	calmoduline kinase II
<i>cmlc1</i>	<i>cardiac myosin light chain 1</i>
<i>cmlc2</i>	<i>cardiac myosin light chain 2</i>
<i>cox2</i>	cyclooxygenase 2
Dm-grasp	Molécule d'adhésion à la surface membranaire
<i>end1</i>	<i>endothelin 1</i>
<i>flt</i>	<i>fms-related tyrosine kinase 1</i>
<i>Foxn4</i>	<i>forkhead box N4</i>
<i>gata1</i>	<i>GATA binding protein 1</i> ou <i>Erythroid transcription factor 1</i>
<i>gata2</i>	<i>GATA binding protein 2</i> ou <i>Erythroid transcription factor 2</i>
<i>has2</i>	<i>hyaluronan synthase 2</i>
HDAC	histone déacétylase
HDAC5	histone déacétylase 5
<i>isl1</i>	<i>islet 1</i>

KLF	Krüppel Like Factor
<i>klf2a</i>	<i>krüppel like factor 2</i>
MAD box	MCM1 agamous, deficiens, serum response factor
MEF2C	<i>myocyte enhancer factor 2C</i>
NFATs	nuclear factor of activated T-cells
<i>notch1b</i>	<i>notch homolog 1b</i>
<i>nppa</i>	<i>natriuretic polypeptide a</i>
Oep	<i>one eyed pinhead</i>
PACS	phosphofurin acid cluster protein
<i>pdcd4b</i>	<i>programmed cell death 4</i>
PDGF	platelet-derived growth factor
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PKC	protein kinase C
PKD	protein kinase D
<i>Pkd</i>	polycystic kidney disease
<i>Pkd1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>Pkd2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
PrKD2	protein kinase D2
<i>Rac1</i>	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Robo	Roundabout receptor
<i>Sih</i>	<i>silent heart</i>
<i>Slit</i>	<i>slit homolog 1b</i>
<i>tbx2</i>	<i>T-box transcription factor 2</i>

<i>tbx5</i>	<i>T-box transcription factor 5</i>
TGFβ	Transforming Growth Factor β
<i>Tmem2</i>	<i>transmembrane protein 2</i>
TRP	Transient Receptor Potential cation channel
TRPC	Canonical TRP
TRPM	Melastatin TRP
TRPP2	Transient Receptor Potential Polycystin 2
TRPV	Vanilloid TRP
TRPV4	Transient Receptor Potential vanilloid member 4
TXA2	Thromboxane A2
<i>vcam-1</i>	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
<i>vegf</i>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<i>vmhc</i>	<i>ventricular myosin heavy chain</i>

# LISTE DES GRAPHES

---

<b>Graphe 1:</b> Efficacité de la contraction cardiaque après traitement en lidocaïne à 0,02%.-	103
-	
<b>Graphe 2:</b> Comptage cellulaire après traitement des poissons en lidocaïne 0,02%. .....	105 -
<b>Graphe 3:</b> L'intensité du transgène <i>klf2a</i> nucléaire est diminuée chez les poissons traités en lidocaïne 0,02% .....	106 -
<b>Graphe 4:</b> Efficacité de contraction cardiaque des morphants <i>amhc</i> et <i>vmhc</i> à 48hpf. ....	108 -
<b>Graphe 5:</b> Comptage cellulaire après injection des poissons avec les morpholinos <i>vmhc</i> et <i>amhc</i> .....	111 -
<b>Graphe 6:</b> L'intensité du transgène <i>klf2a</i> nucléaire est diminuée dans l'atrium et le ventricule des morphants <i>vmhc</i> et <i>amhc</i> .....	111 -
<b>Graphe 7:</b> L'efficacité de contraction est diminuée chez les morphants <i>cmlc1</i> et <i>cmlc2</i> à 48hpf .....	113 -
<b>Graphe 8:</b> Comptage cellulaire après injection des poissons avec les morpholinos <i>cmlc1</i> et <i>cmlc2</i> .....	115 -
<b>Graphe 9:</b> L'intensité du transgène nucléaire <i>klf2a</i> est diminuée chez les morphants <i>cmlc1</i> et <i>cmlc2</i> , à 48hpf. ....	116 -
<b>Graphe 10:</b> L'intensité du transgène <i>flt</i> mesurée dans l'endocarde des morphants est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf .....	117 -
<b>Graphe 11:</b> Mesure de l'efficacité de contraction cardiaque des morphants <i>gata1</i> et <i>gata2</i> à 48hpf .....	119 -
<b>Graphe 12:</b> Comptage cellulaire après injection des poissons avec <i>gata1Mo</i> et <i>gata2Mo</i> , à 48hpf. ....	121 -
<b>Graphe 13:</b> L'intensité du transgène nucléaire <i>klf2a</i> est diminuée chez les morphants <i>gata2</i> et non chez les morphants <i>gata1</i> .....	122 -
<b>Graphe 14:</b> L'intensité <i>flt</i> mesurée dans l'endocarde des morphants <i>gata1</i> et <i>gata2</i> est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf. ....	123 -
<b>Graphe 15:</b> Quantification ciliaire et nucléaire dans l'endocarde à 48hpf.....	136 -
<b>Graphe 16:</b> Efficacité de contraction du morphant <i>trpv4</i> , à 48hpf .....	150 -

<b>Graphe 17:</b> Comptage cellulaire après injection du morpholino <i>trpv4</i> .....	- 152 -
<b>Graphe 18:</b> L'intensité du transgène <i>klf2a</i> nucléaire est diminuée chez les morphants <i>trpv4</i> , à 48hpf. ....	- 153 -
<b>Graphe 19:</b> Efficacité de contraction cardiaque du morphant <i>trpp2</i> à 48hpf. ....	- 166 -
<b>Graphe 20:</b> Comptage cellulaire après injection du morpholino <i>trpp2</i> , à 48hpf .....	- 168 -
<b>Graphe 21:</b> Mesure de l'intensité de fluorescence du transgène <i>klf2a</i> dans les noyaux endocardiques des morphant <i>trpp2</i> , à 48hpf .....	- 169 -
<b>Graphe 22:</b> Efficacité de la contraction cardiaque à 48hpf chez les doubles morphants <i>gata1-TRPP2</i> .....	- 173 -
<b>Graphe 23:</b> Comptage cellulaire après injection du double morpholino <i>gata1-TRPP2</i> , à 48hpf. ....	- 175 -
<b>Graphe 24:</b> L'intensité de fluorescence <i>gfp</i> relevée par le transgène <i>klf2a</i> nucléaire est diminuée dans les morphants <i>gata1-TRPP2</i> , à 48hpf.....	- 176 -
<b>Graphe 25:</b> Efficacité de contraction cardiaque du double morphant <i>TRPP2-TRPV4</i> , à 48hpf.. ....	- 178 -
<b>Graphe 26:</b> Comptage cellulaire après injection du double morpholino <i>TRPP2-TRPV4</i> , à 48hpf. ....	- 180 -
<b>Graphe 27:</b> L'intensité de fluorescence relevée par le transgène <i>klf2a</i> nucléaire est diminuée dans les morphants <i>TRPP2-TRPV4</i> , à 48hpf .....	- 181 -
<b>Graphe 28:</b> Mesure de l'intensité calcique après atteinte de la vélocité fluidique à 48hpf .....	- 195 -
<b>Graphe 29:</b> Mesure de l'intensité calcique après atteinte de la viscosité fluidique à 48hpf .....	- 196 -
<b>Graphe 30:</b> Mesure de l'intensité calcique après blocage du canal calcique <i>TRPP2</i> à 48hpf .....	- 198 -
<b>Graphe 31:</b> Mesure de l'intensité calcique après traitement en $4\alpha$ PDD à 48hpf. ....	- 201 -
<b>Graphe 32:</b> Comptage cellulaire après traitement des poissons en PMA à 75nM, à 48hpf- 213 -	
<b>Graphe 33:</b> Mesure de l'intensité du transgène <i>klf2a</i> nuclaire après traitement en PMA, à 48hpf. ....	- 215 -
<b>Graphe 34:</b> Comptage cellulaire après traitement des poissons contrôles en CID à 180 $\mu$ M. ....	- 218 -



**Graphe 35:** Mesure de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire après traitement des poissons contrôles en CID à 180µM..... - 218 -

**Graphe 36:** Comptage cellulaire après traitement des poissons contrôles en TSA 500nM ou après injection avec le morpholino HDAC5 ..... - 222 -

Graphe 37: Mesure de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire après traitement des poissons contrôles en TSA 500nM ou après injection avec le morpholino HDAC5, à 48hpf.....  
..... - 223 -

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1 :</b> Acquisition et synchronisation d'images en mouvement.....	- 38 -
<b>Figure 2 :</b> Mesure de la dispersion périodique .....	- 38 -
<b>Figure 3:</b> Mesure de l'efficacité de contraction de l'atrium chez un poisson contrôle à 48hpf. -	40 -
<b>Figure 4:</b> Comparaison d'un cœur de poissons contrôle avant-après un seuillage de 70 pour le comptage cellulaire dans l'atrium, l'AVC et le ventricule. ....	- 41 -
<b>Figure 5 :</b> Formation du tube cardiaque primitif chez l'humain .....	- 56 -
<b>Figure 6 :</b> Formation des cavités du cœur primitif.....	- 57 -
<b>Figure 7:</b> Formation du cœur primitif .....	- 58 -
<b>Figure 8:</b> Aboutissement de la formation cardiaque après huit semaines de développement embryonnaire .....	- 60 -
<b>Figure 9:</b> Observation du cœur par transparence chez le poisson zèbre .....	- 63 -
<b>Figure 10:</b> Représentation schématique du développement cardiaque chez le poisson zèbre. -	67 -
<b>Figure 11:</b> Formation de l'endocarde.....	- 68 -
<b>Figure 12:</b> Définition des courbures interne et externe du cœur et expression myocardique du gène <i>nppa</i> .....	- 74 -
<b>Figure 13:</b> Morphogénèse des bourrelets endocardiques chez un poisson WT .....	- 79 -
<b>Figure 14:</b> Observation du blocage du flux sur la valvulogénèse .....	- 86 -
<b>Figure 15:</b> Création des lignées transgéniques <i>Tg(klf2a : h2b-eGFP)</i> .....	- 95 -
<b>Figure 16:</b> Expression du promoteur <i>klf2a</i> dans le cœur embryonnaire à 48hpf et 72hpf des diverses lignées transgéniques créées au laboratoire .....	- 97 -
<b>Figure 17:</b> La lignée <i>Tg(klf2a_6kb :h2b-eGFP)</i> récapitule l'expression endogène de <i>klf2a</i> à 48hpf .....	- 99 -
<b>Figure 18:</b> La lignée transgénique <i>Tg(klf2a_6kb : h2b-eGFP)</i> semble répondre au flux, à 48hpf .....	- 100 -
<b>Figure 19:</b> Visualisation de l'expression du gène <i>klf2a</i> et du nombre total de cellules dans le cœur des poissons traités en lidocaïne 0,02% .....	- 104 -

<b>Figure 20:</b> Visualisation de l'expression du gène <i>klf2a</i> et du nombre total de cellules dans le cœur de morphants <i>amhc</i> et <i>vmhc</i> .....	- 109 -
<b>Figure 21:</b> Visualisation de l'expression génique <i>klf2a</i> et du nombre total de cellules dans l'endocarde des morphants <i>cmlc1</i> et <i>cmlc2</i> à 48hpf. Projection maximale des cœurs à 48hp	- 114 -
<b>Figure 22:</b> Visualisation du gène <i>klf2a</i> et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants <i>gata1</i> et <i>gata2</i> à 48hpf.....	- 120 -
<b>Figure 23:</b> Construction de la lignée <i>Tg(UAS_arl13b-eGFP :cmlc2-eGFP)</i> .....	- 129 -
<b>Figure 24:</b> Validation des lignées transgéniques <i>Tg(UAS_arl13b-eGFP :cmlc2-eGFP)</i> et <i>Tg(UAS_arl13b-RFP :cmlc2-eGFP)</i> .....	- 129 -
<b>Figure 25:</b> Localisation des cils dans l'endocarde embryonnaire à 30hpf et 48hpf .....	- 131 -
<b>Figure 26:</b> Microscopie électronique à transmission de l'endocarde à 48hpf. ....	- 132 -
<b>Figure 27:</b> Les cils sont présents dans l'AVC des poissons présentant une absence ou une forte réduction du flux, à 48hpf .....	- 134 -
<b>Figure 28:</b> Structure de TRPV4 .....	- 142 -
<b>Figure 29:</b> Expression de TRPV4 dans l'endocarde du poisson zèbre.....	- 146 -
<b>Figure 30:</b> Localisation de TRPV4 à la surface des cellules de l'endocarde, à 48hpf.....	- 148 -
<b>Figure 31:</b> Phénotype, à 48hpf, d'un poisson injecté avec le morpholino <i>trpv4</i> .....	- 149 -
<b>Figure 32:</b> Expression du gène <i>klf2a</i> et nombre total de cellules dans l'endocarde des morphants <i>trpv4</i> .....	- 151 -
<b>Figure 33:</b> L'absence de TRPV4 affecte la valvulogénèse .....	- 155 -
<b>Figure 34:</b> Structure de TRPP2 .....	- 158 -
<b>Figure 35:</b> Localisation de TRPP2 dans le cytoplasme des cellules de l'endocarde.....	- 164 -
<b>Figure 36 :</b> Phénotype, à 48hpf, d'un poisson injecté avec le morpholino <i>trpp2</i> .....	- 165 -
<b>Figure 37:</b> Expression du promoteur <i>klf2a_6kb :h2b-eGFP</i> et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants <i>trpp2</i> à 48hpf .....	- 167 -
<b>Figure 38:</b> L'absence de TRPP2 affecte la valvulogénèse .....	- 171 -
<b>Figure 39:</b> Expression du promoteur <i>klf2a_6kb :h2b-eGFP</i> et nombre total de cellules dans le cœur des doubles morphants <i>gata1-TRPP2</i> , à 48hpf .....	- 174 -
<b>Figure 40:</b> Expression du transgène <i>klf2a</i> et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants <i>TRPP2-TRPV4</i> , à 48hpf .....	- 179 -
<b>Figure 41:</b> Représentation schématique de la structure GCamp3.0 .....	- 189 -

<b>Figure 42:</b> Observation de la concentration calcique intracellulaire lors de la contraction cardiaque à 48hpf.....	- 190 -
<b>Figure 43:</b> Observation des pics calciques intervenant lors de la contraction cardiaque à 48hpf .....	- 192 -
Figure 44: Observation du calcium intracellulaire après altération de la vélocité du flux, à 48hpf .....	- 194 -
<b>Figure 45:</b> Observation du calcium intracellulaire après altération de la viscosité du flux, à 48hpf .....	- 196 -
<b>Figure 46:</b> Observation du calcium intracellulaire après blocage du canal calcique TRPP2, à 48hpf .....	- 198 -
<b>Figure 47:</b> Activation des canaux calciques TRPV4 après traitement au 4 $\beta$ PDD à 48hpf..	- 200 -
<b>Figure 48:</b> Schéma proposé amenant à l'activation du gène <i>klf2a</i> .....	- 209 -
<b>Figure 49:</b> Activation de PKC par PMA et effet sur l'expression génique de <i>klf2a</i> à 48hpf-	211
-	
<b>Figure 50:</b> Observation de l'expression du gène <i>klf2a</i> après traitement des poissons contrôles en CID, à 48hp .....	- 217 -
<b>Figure 51:</b> L'expression du promoteur <i>klf2a</i> est augmentée dans le cœur des poissons injectés avec HDAC5Mo et traités avec 500nM de TSA.....	- 221 -
<b>Figure 52:</b> Détection fluidique et activation de <i>klf2a</i> dans l'endocarde .....	- 221 -
<b>Figure 53:</b> Intervention de MEF2 et des miRNAs dans l'expression génique de <i>klf2a</i> .....	- 221 -

# LISTE DES VIDEOS

---

<b>Vidéo n° 1</b> : Présence de flux reversant dans des cœurs de poissons à 48hpf.....	83
<b>Vidéo n° 2</b> : Efficacité de contraction des poissons contrôlés à 48hpf.....	102
<b>Vidéo n° 3</b> : Efficacité de contraction des poissons traités en lidocaïne, à 48hpf.....	102
<b>Vidéo n° 4</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>amhc</i> .....	107
<b>Vidéo n° 5</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>vmhc</i> .....	107
<b>Vidéo n° 6</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>cmlc1</i> .....	112
<b>Vidéo n° 7</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>cmlc1</i> .....	112
<b>Vidéo n° 8</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>gata1</i> .....	119
<b>Vidéo n° 9</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>gata2</i> .....	119
<b>Vidéo n° 10</b> : Présence de cils dans les vaisseaux sanguins à 30hpf.....	126
<b>Vidéo n° 11</b> : L'endocarde du poisson zèbre est cilié à 30hpf .....	127
<b>Vidéo n° 12</b> : L'endocarde du poisson zèbre est cilié à 48hpf .....	127
<b>Vidéo n° 13</b> : Zoom sur une zone ciliée de l'atrium à 48hpf.....	127
<b>Vidéo n° 14</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>TRPV4</i> .....	1488
<b>Vidéo n° 15</b> : Efficacité de contraction des morphants <i>trpp2</i> .....	166
<b>Vidéo n° 16</b> : Efficacité de contraction des doubles morphants <i>TRPP2-TRPV4</i> .....	172
<b>Vidéo n° 17</b> : Efficacité de contraction des doubles morphants <i>gata1-TRPP2</i> .....	177

---

<b>Vidéo n° 18</b> : Visualisation du calcium intracellulaire à la caméra rapide.....	190
<b>Vidéo n° 19</b> : Description du signal calcique intracellulaire chez un poisson <i>WT</i> à 48hpf ....	191
<b>Vidéo n° 20</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>tnnt2</i> .....	192
<b>Vidéo n° 21</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>cmhc1</i> .....	192
<b>Vidéo n° 22</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>vmhc</i> .....	192
<b>Vidéo n° 23</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>cmhc2</i> .....	192
<b>Vidéo n° 24</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>gata1</i> .....	195
<b>Vidéo n° 25</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>gata2</i> .....	195
<b>Vidéo n° 26</b> : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants <i>TRPP2</i> .....	196

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> : Liste des lignées transgéniques et des oligonucléotides utilisés pour l'extraction génomique du BAC CH211. ....	- 25 -
<b>Tableau 2</b> : Liste des morpholinos utilisés. ....	- 30 -
<b>Tableau 3</b> : Liste des traitements utilisés pour l'étude de la voie moléculaire. ....	- 32 -
<b>Tableau 4</b> : Longueur d'ondes d'émission et d'absorption de l' <i>eGFP</i> et de la <i>mCherry</i> . ....	- 34 -
<b>Tableau 5</b> : Caractéristiques d'acquisition du microscope confocal SP5 en fonction des expériences menées. ....	- 36 -

# MATERIEL ET METHODES

---

## 1 Environnement animalier et croisements

Les poissons sont situés à l'animalerie IGBMC dans une pièce où seule la lumière artificielle peut être perçue. Chaque lignée de poissons, WT ou mutants sont disposés de façon séparée dans des bacs de trente litres. Ces derniers sont nourris deux fois par jour avec des granulés spécifiques et des artémias (Aquakultur Genzel). Les alevins, de 5dpf à environ 1 mois, sont nourris une fois par jour avec des granulés concassés et 40mL de paramécies (Aquakultur Genzel) et l'eau du pot dans lequel ils grandissent est changée tous les matins.

La température de l'animalerie est maintenue aux alentours de 28,5°C et possède une période préréglée jour/nuit (respectivement 13 heures de jour et 11 heures de nuit). La température de l'eau varie entre 27,5 et 29°C degrés et la conductivité se situe entre 180 et 210  $\mu$ SI.

Les croisements sont réalisés sur des couples adultes de plus de trois mois dans des bacs à séparation (Techniplast) et les œufs sont récupérés le lendemain matin après fertilisation externe de ces derniers. C'est à ce moment que les embryons sont ou non injectés avec de l'ADN ou des morpholinos puis placé en incubateur à 28,5°C dans le milieu de ponte correspondant au danio 30X (50,7g NaCl, 0,78g KCL, 1,47g MgSO<sub>4</sub>, 2,1g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 19,52g d'HEPES, pH 7,2, qsp 500ml d'eau) dilué à une concentration finale de 1X.



## 2 Préparation des poissons et montage

Les œufs récoltés et placés en incubateurs, sont triés après 6hpf et placés dans une solution de danieau 1X + phénylthiourée (PTU) 0,003% afin de prévenir la formation de pigments cellulaires pouvant masquer des parties du cœur indispensables à l'imagerie confocale (Karlsson, von Hofsten et al. 2001). Selon la nécessité de traitement chimique ou non, les poissons sont libérés de leur chorion (membrane servant de protection avec le milieu extérieur liquide) à 27hpf ou 48hpf par l'utilisation de pinces fines.

A 48hpf ou 72hpf, les poissons sont directement montés dans un moule d'agarose pour l'imagerie rapide ou traités pendant deux heures en paraformaldéhyde (PFA) 4% puis montés dans l'agarose. Le moule est fabriqué de la façon suivante : de l'agarose chaude à 1% est coulée dans une boîte de pétri de diamètre 36mm. Un moule formé de quatre lignes est déposé sur l'agarose puis retiré lorsque cette dernière est solidifiée à température ambiante. Les poissons sont déposés, à l'aide d'une pipette plastique et d'agarose 0,8% dans les lignées formées par le moule et orientés à l'aide des pinces, soit la tête vers le bas avec une inclinaison d'environ 30° (SP2, SP5 inversé et caméra rapide), soit la tête vers le haut de façon à voir le cœur (SP5). Une fois les poissons pris en masse dans l'agarose, un peu de danieau PTU (contenant ou non un traitement) est déposé en surface du montage pour éviter le dessèchement de ce dernier lors de l'imagerie.

L'inconvénient de cette technique repose sur le fait que la qualité de l'imagerie, via l'accès au cœur en entier, est en majorité due au bon positionnement des poissons dans le moule de montage. Le montage n'étant pas standardisé, il est également difficile d'obtenir des poissons montés de la même manière et donc des cœurs positionnés de la même façon. Cependant, cette difficulté peut être surmontée avec de l'expérience.

### 3 Lignées transgéniques

#### 3.1 *Tg(klf2a:h2b-eGFP)*

Ces lignées ont entièrement été créées au laboratoire. La partie génomique du promoteur *klf2a* a été extraite du BAC CH 211 par des oligonucléotides dessinés selon la taille désirée du promoteur et possédant une extrémité Sall et XhoI ajoutée (Tableau 1). Ces extraits génomiques ont ensuite été insérés via les sites de restriction enzymatiques Sall et XhoI dans le vecteur pT2K-CAGGSY possédant les sites Tol2 permettant la transposition de l'ADN dans le génome du poisson zèbre. Le promoteur *klf2a* est situé en amont d'un gène codant pour la protéine de fusion *h2b-eGFP* permettant alors l'expression verte fluorescente (GFP) du gène au niveau des noyaux cellulaires (Figure 16). La fusion *h2b-GFP* est fortement visible dans les noyaux des cellules endocardiques formant l'AVC et l'OT du cœur de poissons mais également dans certaines cellules de l'atrium et du ventricule à 48hpf et 72hpf (Figure 16).

Lignée <i>Tg(klf2a:h2b-eGFP)</i>	Oligonucléotides
1kb	BDB7-BCU176
4kb	BDA206-BCU176
6kb	BCU174-BCU176
9kb	BCU172-BCU176

**Tableau 1 : Liste des lignées transgéniques et des oligonucléotides utilisés pour l'extraction génomique du BAC CH211.**

### 3.2 *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP : sih+)*

Cette lignée, développée au laboratoire, correspond au croisement de la lignée *Tg(klf2a:h2b-eGFP)* avec des poissons possédant la mutation *sih+/-* (Sehnert, Huq et al. 2002). Après sélection sur le marqueur fluorescent eGFP correspondant à la lignée *klf2a\_6kb* et grossissement, les poissons ont été génotypés par croisement. L'analyse de ces poissons permet d'observer l'expression du gène *klf2a* dans les embryons présentant un œdème cardiaque et une absence de contractions, phénotype caractéristique de la présence de la mutation *sih* à 48hpf (Chapitre 5) Les poissons ne présentant pas la mutation *sih* possèdent la même expression génique de *klf2a* que celle décrite pour la lignée *Tg(klf2a:h2b-eGFP)* tandis que ceux ayant le phénotype *sih+* ne possèdent aucune expression génique *klf2a* dans le cœur. Seule une faible fluorescence est observable dans les vaisseaux de la tête et du tronc du poisson.

### 3.3 *Tg(flt\_enhancer :td-tomato)*

Afin de visualiser le pattern endocardique des poissons, la lignée *Tg(flt\_enhancer: td-tomato)* provenant du laboratoire de Stephan Schulte-Merker a été imagée (Bussmann et al.). Ces poissons expriment le marqueur fluorescent *tomato* après le facteur de croissance vasculaire endothélial *flt*. Le marquage fluorescent est visible dans les vaisseaux et l'endocarde des poissons, au niveau de l'atrium, du ventricule et du canal atrioventriculaire à 48hpf et 72hpf et ne varie pas ou très peu dans les poissons injectés avec divers morpholinos (Chapitre 1).

### 3.4 *Tg(UAS\_arl13b-eGFP: cmlc2-eGFP)* et *Tg(UAS\_arl13b-RFP: cmlc2-eGFP)*

La visualisation des cils dans l'endocarde (Chapitre 2) nécessite les lignées *Tg(UAS\_arl13b-eGFP: cmlc2-eGFP)* et *Tg(UAS\_arl13b-RFP: cmlc2-eGFP)*. Ces lignées, construites au laboratoire, expriment la GFP dans le myocarde grâce à la présence d'une protéine fluorescente en aval du gène *cardiac myosin light chain 2*. Ce gène est utilisé comme marqueur de sélection. Le gène codant pour la protéine de fusion arl13b-eGFP ou -RFP marquant les structures ciliées a été cloné en aval du promoteur UAS.

### 3.5 *Tg(flk1 :Gal4\_UAS-eGFP)*

Cette lignée, fournie par Dimitris Beis (Bio-Academy of Athens, Athens), permet l'expression de la GFP placée en aval de l'enhancer UAS et du gène *Kinase insert domain receptor like (kdrl* ou *flk)*. Les poissons imagés expriment une fluorescence verte au niveau des vaisseaux et de l'endocarde à 48hpf (Chapitre 2), et possèdent la protéine Gal4 permettant de forcer l'expression du gène sous la dépendance du promoteur UAS.

### 3.6 *Tg(fligalFF\_UAS-kaede)*

La visualisation du calcium dans l'endocarde nécessite la lignée *Tg(fligalFF\_UAS-kaede)*. Cette lignée, provenant du laboratoire de Markus Affolter (Biozentrum, Basel), permet l'expression du gène *gal4FF* grâce au promoteur *Friend Leukemia Integration 1a (fli)* qui est spécifique des cellules endothéliales et hématopoïétiques. La séquence UAS (Upstream Activation Sequence) placée en amont du gène *kaede*, permet à la protéine fluorescente photo-convertible *kaede*, d'être exprimée dans ces deux types cellulaires. En

effet l'expression du gène *kaede* est dépendante de l'activation de l'enhancer UAS via la liaison du facteur d'activation *Gal4FF*, placé en aval du promoteur *fli*. Après liaison de la partie *Gal4* au gène *UAS*, les poissons expriment une fluorescence verte (en absence de photoconversion) ou rouge (si photoconversion après stimulation avec une lumière UV) au niveau de l'endocarde des poissons testés (Chapitre 2).

### 3.7 *Tg(fliNLS-mCherry) roy+/-* et *Tg(fliNLS-mCherry) nacre+/-*

Dans le but d'observer la totalité des cellules dans l'endocarde, les lignées *Tg(fliNLS-mCherry) roy+/-* et *Tg(fliNLS-mCherry) nacre+/-* ont été utilisées. Ces lignées, qui proviennent du laboratoire de Markus Affolter (Biozentrum, Basel), expriment le marqueur fluorescent rouge *nls-mCherry*, situé en aval du promoteur *friend leukemia integration1* et permettant le marquage nucléaire de la totalité des cellules endothéliales, dont celles de l'endocarde à partir de 30hpf. Ces lignées permettent l'observation du nombre total de cellules endocardiques localisées dans l'atrium, le ventricule et l'AVC des poissons testés à 48hpf (Chapitre 1 et 3).

### 3.8 *Tg(UAS\_1020\_Gcamp3.0)* et *Tg(UAS\_Gcamp5.0)*

La visualisation du calcium endocardique requiert les lignées *Tg(UAS\_1020\_Gcamp3.0)* (Warp, Agarwal et al. 2012) ou *Tg(UAS\_Gcamp5.0)* (non publié). Ces lignées, obtenues par Claire Wyart (Institut de la Moelle Paris) révèlent le calcium intracellulaire via une GFP fusionnée à une protéine M13 ainsi qu'à la calmoduline, capable

de lier les ions calciques (Tian, Hires et al. 2009). La présence de calcium intracellulaire entraîne une augmentation du signal GFP dans l'endocarde des poissons (Chapitre 4).

## 4 Morpholinos utilisés

### 4.1 Morpholinos utilisés

Les morpholinos utilisés lors des expériences et récapitulés dans le tableau ci-dessous, ont tous été injectés au stade embryonnaire 1 cellule après dilution préalable des morpholinos en eau stérile (Tableau 2). Les poissons injectés ainsi que les poissons contrôles (non injectés) ont ensuite été placés à l'étuve à 28,5°C puis triés avant addition de daniéau PTU. Les poissons sont laissés à 28,5°C jusqu'à 48hpf où ils seront de nouveau triés sur les critères fluorescents correspondant à la lignée transgénique injectée et fixés en PFA 4% pendant deux heures pour enfin être imagés au microscope confocal SP2.

## 5 Modification de la vitesse et viscosité sanguine

### 5.1 Traitement en Lidocaïne

La diminution des battements cardiaques des poissons testés a été obtenue en utilisant un traitement en lidocaïne 0,02% de 30hpf à 48hpf. La lidocaïne initialement sous forme de poudre (Sigma Aldrich) a dans un premier temps été stockée à une concentration de 5% finale puis diluée dans une boîte de pétri contenant un volume connu de daniéau PTU et une dizaine de poissons afin d'obtenir une concentration finale en lidocaïne de 0,02%. Les embryons ont été montés comme précédemment décrit et recouverts avec une solution

danieau PTU+ lidocaïne 0,02% afin de déterminer le FS% ou directement placés à 48hpf en PFA 4% pendant deux heures et montés en agarose pour l'imagerie confocale (Chapitre 1).

	Séquence (5'-3')	Affecte	Masse Molaire (g/M)	Volume injectée (μL)	Masse injectée (ng/μl)	Où les retrouver
<i>tnnt2</i>	CATGTTTGCTCTGATCTG ACACGCA	Troponin T2	8410	1+9	5.80	Chapitre 1 et 4
<i>Vmhc</i>	CCATCTGAGCGTCCCCA TGATTGC	Myosine	8356	1+9	5.77	Chapitre 1 et 4
<i>Amhc</i>	ACTCTGCCATTAAGCAT CACCCAT	Myosine	8332	1+9	5.75	Chapitre 1 et 4
<i>cmlc1</i>	TGCCATGATGCTGATGG GAAAAGGC	Myosine	8573	0.3+9.7	1.77	Chapitre 1 et 4
<i>cmlc2</i>	CTCAAGTGACCTAGTTG TGCATAA	Myosine	8458	1+9	5.84	Chapitre 1 et 4
<i>gata1</i>	CTGCAAGTGTAGTATTG AAGATGTC	GATA binding site 1	8538	1+9	5.82	Chapitre 1, 3 et 4
<i>gata2</i>	CATCTACTCACCAGTCTG CGCTTTG	GATA binding site 2	8345	1+9	5.76	Chapitre 1 et 4
<i>trpv4</i>	AGGAGACAGACAAGGAC TCTGTCAT	TRP vanilloid channel 4	8526	1+9	5.89	Chapitre 3 et 4
<i>trpp2</i>	TGGTGTCAAGTGTGGTA CCGTCAG	TRP polycystin 2	8521	1.5+8.5	8.82	Chapitre 3 et 4
<i>Hdac5</i>	CACACTTGAAGTCTACTC ACCGGTT	Histone déacétylase 5		4+6	23.13	Chapitre 5

Tableau 2: Liste des morpholinos utilisés.

## 6 Localisation de *trpv4* et *trpp2*

### 6.1 Préparation et injection d'ADN

Afin de localiser la distribution des protéines TRPV4 et TRRP2 *in vivo*, j'ai injecté de l'ADN *Tol2-trpv4-mCherry* ou ADN *tol2-trpp2-mCherry* dans les lignées *Tg(UAS\_aryl13b-RFP:cmlc2-eGFP) \* Tg(flk UAS-eGFP)*. L'ADNc de *trpv4* humain et *trpp2* humain ont été commandés chez Source Bioscience Life Science et, par un système de clonage en Gateway, mis en aval de la séquence UAS (Upstream Activation Sequence) et en amont du marqueur fluorescent mCherry. Ces régions sont flanquées entre deux sites Tol2 permettant la transgénèse dans l'ADN du poisson zèbre. Les solutions d'injection ont été faites comme suit : 200ng/μl d'ADN, 250ng/μl ARNm *Tol2*, eau. Les poissons ont été injectés au stade une cellule puis imagés, après tri en danieau + PTU et fixation de deux heures en PFA 4% (Chapitre 3).

## 7 Détection calcique

### 7.1 Activateur calcique

Le 4 $\alpha$  phorbol 12,13 didecanoate (4 $\alpha$ PDD) a été utilisé afin d'activer les canaux calciques TRPV4. Le produit initial, se trouvant sous forme de poudre (Sigma Aldrich) une dilution stock a été effectuée à 1,5mM en DMSO et placée à -20°C. Le jour du traitement, une dilution de la solution stock est faite pour obtenir une concentration finale de 4μM. Cinq à six poissons sont placés dans un tube Eppendorf de 1,5ml et mis en contact avec la solution de 4 $\alpha$ PDD pendant vingt minutes. Les poissons sont alors rapidement montés sous microscope binoculaire et imagés au microscope SP5 (Chapitre 4).



## 8 Activateurs et inhibiteurs protéiques et enzymatiques

### 8.1 Traitements chimiques

Les solutions permettant l'étude de la voie moléculaire sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 3). Les solutions stocks (Sigma-Aldrich) ont initialement été diluées et conservées à -20°C. Le jour du traitement, ces solutions stocks ont de nouveau subi une dilution afin d'obtenir une concentration finale adaptée. Une dizaine de poissons par condition ont été traités de 27hpf à 48hpf dans une boîte de pétri, étuvé à 28,5°C puis fixés en PFA 4% une fois le stade 48hpf atteint. Les poissons ont ensuite été montés en moule d'agarose et imagés au microscope confocal SP2 (Chapitre 5).

	Concentration stock	Concentration finale	Effet
<b>CID</b>	80mM en DMSO	180µM	Active PKD2
<b>PMA</b> (phorbol 12-myristate 13 acétate)	10mM en eau	75nM	Active PKC
<b>TSA</b> (trichostatine A)	5mM en DMSO	500nM	Inhibe HDAC5

Tableau 3: Liste des traitements utilisés pour l'étude de la voie moléculaire.

## 9 Immunohistochimie

### 9.1 Observation de TRPP2 et TRPV4 à 48hpf

A 48hpf, les poissons ont été fixés pendant trois heures en PFA 4% à température ambiante puis incubés dans un tube Eppendorf de deux ml en solution bloquante (1% DMSO, 5 %BSA, 0.5% Tween 20 1X) pendant deux heures sur balancier et à température

ambiante. Les poissons ont été rincés avec un peu de solution d'incubation (1% DMSO, 0.5% Tween 20 1X et 0.5% BSA) puis mis en contact avec 50-100µL de solution d'incubation contenant l'anticorps primaire dirigé contre Trpv4 zebrafish ou Trpp2 zebrafish (Abcam) au 1/200<sup>ème</sup>. Les poissons sont placés dans une boîte protégeant de la lumière et au réfrigérateur durant la nuit, sans phénomène de rotations. Les tubes contenant les poissons sont rincés avec la solution d'incubation seule, sur un balancier pendant une période de trente minutes. Cette étape est répétée pour un total de quatre fois à l'abri de la lumière. Les poissons sont ensuite incubés avec l'anticorps secondaire Alexa-594 goat anti-mouse (GAM) ou Alexa-594 goat anti-rabbit (Garrity, Childs et al.) de chez Invitrogen et dilué au 1/500<sup>ème</sup>. De la même façon que pour l'anticorps primaire, les poissons sont placés en chambre froide pour la nuit, dans une boîte prévenant l'entrée de la lumière. Les poissons sont de nouveaux rincés 4\*30 minutes avec la solution d'incubation sur une plaque rotatrice à l'abri de la lumière. Les embryons sont alors montés en moule d'agarose et imagés au microscope confocal SP5 (Chapitre 3).

## 9.2 Observation des valves à 72hpf

Les poissons à 72hpf ont été fixés et marqués de la même façon que pour l'observation des canaux calciques. Les seules différences résultent dans le choix de l'anticorps primaire, Zn-8 (Abcam) et de l'anticorps secondaire Alexa-fluor 488 goat anti-mouse (GAM) de chez Invitrogen (Chapitre 3).

## 10 Techniques d'imagerie

### 10.1 Acquisitions à la caméra rapide SA3

Après montage direct des poissons en moule d'agarose à 48hpf, les poissons ont été imagés sous objectif HC PL APO 20X (ouverture numérique de 0,70) à eau via une caméra rapide SA3 de chez Photron montée sur un microscope Leica DM IRBE. Via le logiciel Soft PVC, la résolution des images est de 1024\*1024 et la vitesse d'acquisition est de 500fps (images par seconde). Le temps pour chaque vidéo varie en fonction des poissons imagés mais correspond à une fréquence de 3 battements cardiaques complets.

### 10.2 Microscope confocal SP2

Les images réalisées au microscope confocal SP2 (Leica DM IRE2) ont été réalisées avec l'objectif HC PL APO 20X (ouverture numérique de 0,70) à eau ainsi qu'à un zoom optique de 2,41. Les images ont été acquises en 512\*512 avec un smart gain de 544V pour le canal eGFP et de 773V pour le canal mCherry. La longueur d'onde d'émission et d'absorption est définie comme suit :

	<b>Emission</b>	<b>Absorption</b>
<b>eGFP</b>	<b>488</b>	<b>507</b>
<b>mCherry</b>	<b>587</b>	<b>610</b>

**Tableau 4: Longueur d'onde d'émission et d'absorption de l'eGFP et de la mCherry.**

Les zones d'intérêts sont définies via l'outil « Z-stack » du logiciel LSM Leica afin de prendre en compte la totalité du cœur. Les images sont alors effectuées sous différents plans en Z, espacés de  $1,5\mu\text{m}$  et sauvegardés sous fichiers .Tif qui seront analysés via ImageJ

## 11 Microscope confocal SP5

### 11.1 Techniques générales d'acquisition

L'acquisition des images s'est effectuée à l'aide du microscope confocal SP5 Leica DM6000 CFS sous objectif HCX IRAPO L 25X (ouverture numérique 0,95) à eau pour le microscope droit et avec l'objectif HCX PL APO CS 20X (ouverture numérique 0.70) à eau pour le microscope inversé. La chambre optique étant incubée à  $28,5^{\circ}\text{C}$ , les images ont été prises de façon bidirectionnelle et avec un pinhole de  $58,61\mu\text{m}$  et à un format de pixels  $512*512$ . Selon l'objectif de l'utilisation du microscope, divers paramètres et types de lasers ont été configurés (Tableau 5).

Les scans  $(x,y,t)$  sont acquis à un plan optique  $z_1$ , correspondant au début de l'atrium, et ceci à n'importe quel moment du cycle cardiaque (dans le cas de poissons non fixés). Le plan  $z$  est ensuite manuellement changé afin d'atteindre le second plan focal  $z_2$ . Cette étape se répète jusqu'à l'obtention de section prenant en compte le cœur complet.

Le nombre de plan en Z pour chaque expérience varie entre 33 et 90 Z, selon la taille de l'intervalle entre chaque plan. Les images sauvegardées sous forme de fichiers .Tif ont pu ensuite être analysées en deux dimensions avec le logiciel LAS AF Lite de Leica.

	Type de SP5	Scanner résonnant	Type de laser	Puissance Hertz	Intensité laser	Intervalle de temps	Durée du plan en Z	Intervalle entre chaque Z
Analyses Ca <sup>2+</sup>	Droit	Oui	HYD argon	8000	17,3%	0.36ms	2.998 s	3µm
Analyses 4αPDD	Droit	Oui	HYD argon	8000	17,3%	0.387ms	1,936 s	3µm
Injection ADN	Droit	Non	WLL + 561	700	30%	0.46ms	-	1,5µm
Immunohisto-chimie	Inversé	Non	WLL + 561	700	30%	0.36ms	-	0.622 µm

**Tableau 5: Caractéristiques d'acquisition du microscope confocal SP5 en fonction des expériences menées.**

## 11.2 Technique de réalignement d'images

Cette méthode dynamique développée par Micheal Liebling (USCB, Santa Barbara) (Liebling, Forouhar et al. 2005) permet d'avoir une résolution spatiale et temporelle, paramètres indispensables afin d'étudier la morphologie cardiaque en mouvement et quantifier les forces y intervenant. Cette technique est utilisée dans le cas de poissons non fixés.

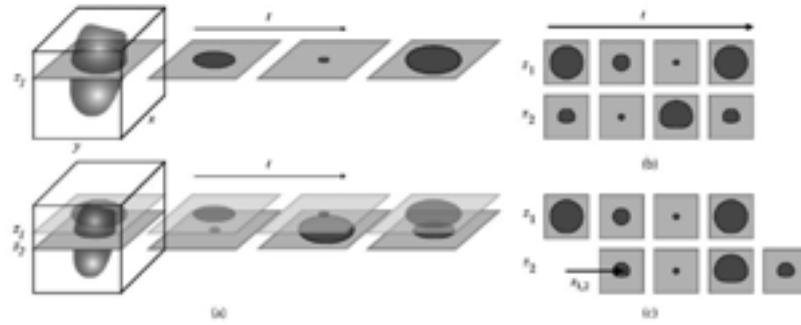
Diverses étapes sont nécessaires afin d'arriver à un réalignement en quatre-dimensions.

### 11.3 Collection d'images

La première étape dans le processus de réalignement est de collecter des images successives provenant d'un plan optique défini. Ces images sont obtenues selon la méthode décrite dans la partie 11.1. Les images doivent être nommées dans l'ordre tout en définissant leur section en Z afin que le logiciel de réalignement puisse les reconnaître.

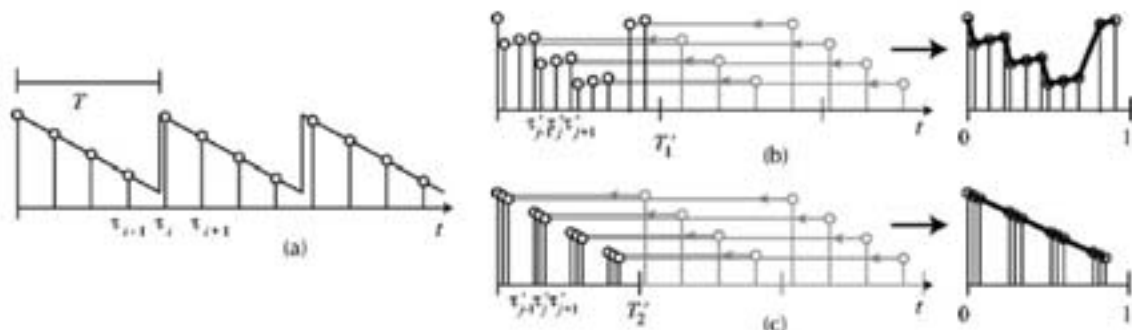
### 11.4 Algorithme

La première étape de cet algorithme consiste à synchroniser les images générées précédemment, en définissant une période. Le but de cette étape est de maximiser, pour un temps donné, la similarité entre deux sections adjacentes. En premier lieu, il faut fournir au logiciel un nombre de sections correspondant à un battement cardiaque. La période du battement cardiaque doit être connue de façon précise et doit être la même pour toutes les sections générées précédemment. Le logiciel prend en compte les valeurs indiquées et, avec une technique de phase de dispersion minimale (Stellingwerf et al, 1978), définit la période en combinant l'intensité moyenne d'une région à chaque temps de chaque section. Pour une section donnée et un temps  $T'$ , la position périodique de chaque pixels est rapportée à la première période, appelée phase locking (Figure 1). Les images subissent ensuite une transformation spatiale en deux dimension permettant de décomposer les fonctions périodiques en composés fréquentiels et spatiaux.



**Figure 1 : Acquisition et synchronisation d'images en mouvement. (A) Obtentions d'images à différents plan focaux  $z$ . (B) Images générées en deux-dimensions et non synchronisées. (C) Images en deux-dimensions après synchronisation. Adapté de Liebling et al, 2005.**

Cette séparation permet d'éliminer les intensités indésirables (bruit de fond, ombres liées aux objets, artefacts...) mais aussi de réduire le temps nécessaire au calcul des intensités et la taille des données. Une fonction,  $f(t)$ , est ensuite calculée pour relier les valeurs d'intensités de la phase locked et une estimation de la période est obtenue lorsque  $f(t)$  est minime. Une estimation du signal de dispersion de la phase locking est donnée par la longueur du graphe qui relie les nouvelles sections (dans l'ordre) à une échelle de temps normalisée (Figure 2). Les images peuvent ensuite être reconstruites en quatre-dimensions.



**Figure 2 : Mesure de la dispersion périodique. (a) Variation de l'intensité d'une section  $x$  au cours du temps, à une période  $T$  inconnue. (b) Report de l'intensité des pixels pour une section donnée à un temps  $T'1$ , à la phase locking (première période). La dispersion des sections est donnée par la longueur de la courbe rejoignant les nouvelles sections (courbe en gras). (c) Lorsque la période  $T'1$  correspond à la période actuelle,  $T'2=T$ , la dispersion des sections et la courbe sont donc minimales.**

## 11.5 Microscopie électronique à transmission

Pour la microscopie électronique à transmission, les poissons ont premièrement été disséqués au niveau de la queue puis fixés une première fois en solution 0,1M de tampon phosphate contenant 2,5% de formaldéhyde et 2,5% de glutaraldéhyde, puis en solution tampon phosphate 0,1M contenant 1% d'osmium pendant une heure au réfrigérateur. Après trois rinçages en tampon phosphate 0,1M, les poissons sont déshydratés en utilisant des solutions contenant des concentrations croissantes en éthanol puis inclus dans de l'Epon. Une fois la polymérisation de la résine epoxy réalisée, les blocs d'inclusions sont découpés en coupes ultrafines à l'aide d'un microtome (60nm). Les coupes ultrafines, contrastées avec de l'acétate d'uranyle à 4% puis avec du citrate de plomb, sont ensuite analysées sous microscope électronique Philips CM12 BioTwin (FEI Company, Eindhoven, Pays-Bas) équipé d'une caméra Orius 1000 ccd (Gatan, Roper Scientific, Evry, France).

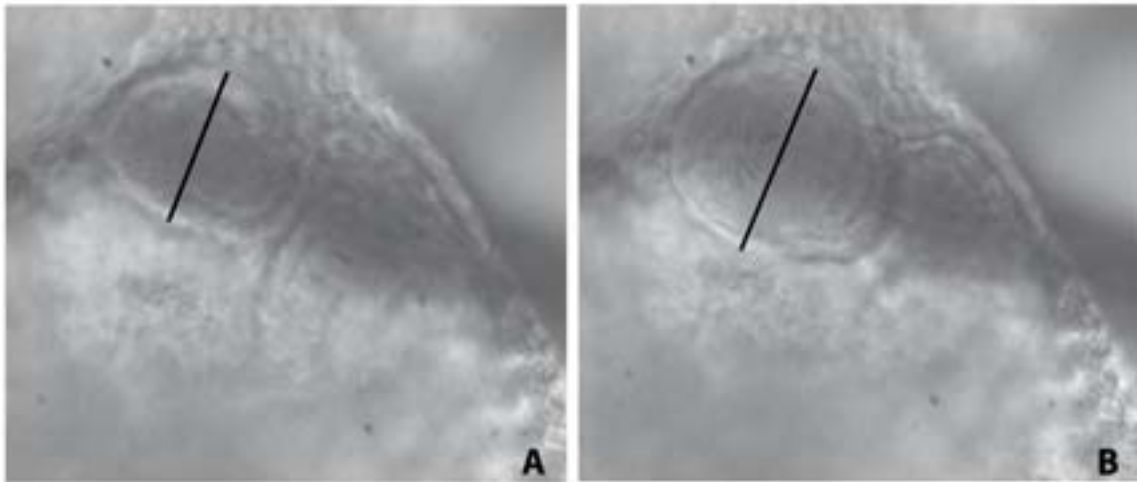
## 12 Méthodes d'analyses

### 12.1 Efficacité de contraction (fractional shortening)

Basée sur la formule  $FS\% = \frac{\text{diamètre diastole} - \text{diamètre systole}}{\text{diamètre diastole}} \times 100$ , la mesure du fractional shortening (Karlsson, von Hofsten et al.) permet de mesurer l'efficacité de contraction des cœurs de poissons injectés ou non avec des morpholinos. Les images de cœur sont obtenues après anesthésie des poissons en tricaine, après dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la solution stock (8mg/ml) puis montage des poissons. Les diamètres de diastole et de systole atriale et ventriculaire sont obtenus avec le logiciel ImageJ en définissant de façon manuelle les diamètres de chaque chambre sur un total de trois battements cardiaques



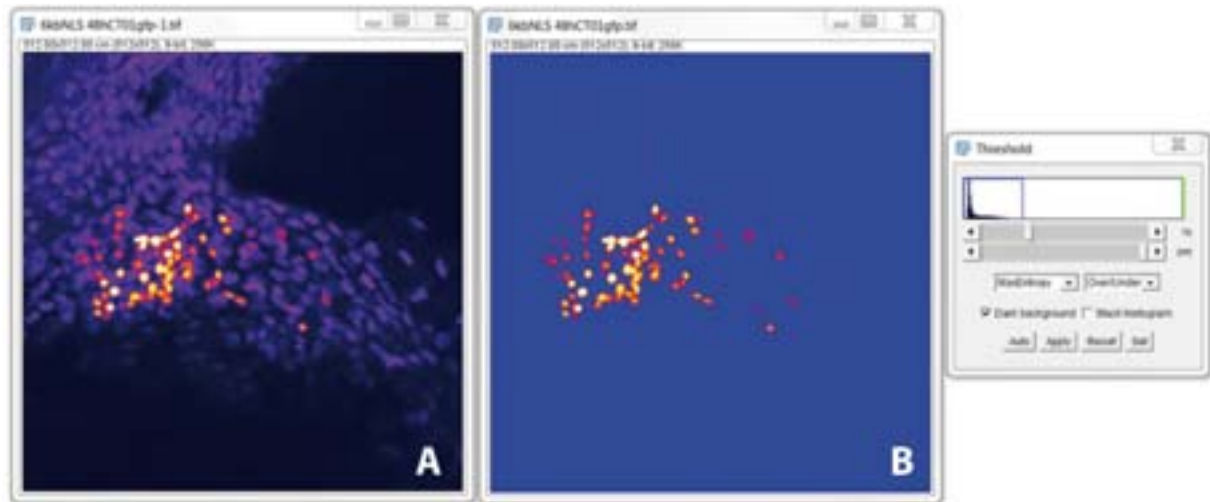
(Figure 3). Les diamètres définis sont alors mesurés via l'onglet « mesure » de Fiji et les valeurs obtenues compilées dans un dossier Excel pour l'analyse.



**Figure 3: Mesure de l'efficacité de contraction de l'atrium chez un poisson contrôle à 48hpf. (A) définition du diamètre systolique, (B) définition du diamètre diastolique.**

## 12.2 Comptage cellulaire

Le comptage cellulaire a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ. Les canaux couleur des sections d'images générées au microscope SP2 ont, dans un premier temps été séparés puis projetés de façon maximale d'intensité afin de générer un empilement de tous les plans Z en un seul plan final, sans perdre de pixels. Un seuillage a été effectué sur chaque canal couleur afin d'éliminer les cellules exprimant peu de fluorescence. Ainsi, un seuillage égal à 70 pour la fluorescence GFP et un seuillage de 50 pour la mCherry ou la RFP ont été appliqués. Après ce seuillage, le cœur a été distingué en trois parties, l'atrium, le ventricule, et l'AVC (Figure 4) et les cellules (alors considérées comme positives) manuellement comptées.



**Figure 4:** Comparaison d'un cœur de poissons contrôle avant-après un seuillage de 70 pour le comptage cellulaire dans l'atrium, l'AVC et le ventricule.

### 12.3 Mesure de l'intensité *gfp* cellulaire

Afin de mesurer l'intensité *gfp* nucléaire des cellules de l'endocarde, plusieurs logiciels ont été utilisés. La première étape a été, via ImageJ, de faire des projections maximales d'intensité des images prises au microscope confocal SP2, pour les deux canaux couleur. Une fois ces projections obtenues, elles sont insérées dans le logiciel Matlab R2011b puis ouvertes par ce dernier sur le logiciel Phylocell. Après définition manuelle de chaque chambre cardiaque ainsi que de l'AVC pour chaque canal couleur et pour chaque image, ce programme permet de mesurer, suite à un seuillage de 70, l'intensité des pixels dans chaque cellule exprimant le marqueur fluorescent dans les régions cardiaques définies. Les mesures d'intensités sont dès lors visibles sur le logiciel Matlab et prêtes à être transformées sur Microsoft Excell.

## 12.4 Mesure de l'intensité *flt*

Dans le but de définir le pattern endocardique, la mesure de l'intensité *flt* via le marqueur fluorescent *tomato* s'est révélée nécessaire. Les projections maximales obtenues via Fiji (de la même façon que celles réalisées pour les projections maximales via ImageJ pour la couleur rouge), ont permis la définition des deux chambres cardiaques et de l'AVC. La mesure de l'intensité de chaque chambre a été faite directement via l'onglet « analyse » et « mesure » du logiciel Fiji. Ces onglets nous permettent d'obtenir la valeur moyenne de l'intensité *tomato* de chaque partie cardiaque définie et sont ensuite rentrées dans un tableau Excell pour être analysées.

# RÉSUMÉ

## 1 Introduction

Le développement et la croissance des vertébrés dépendent de l'activité des muscles cardiaques à générer la circulation sanguine. Lors de la maturation du cœur, et ceci dès les stades les plus précoces de sa formation, une fonction cardiaque efficace ne peut être maintenue que si des valves fonctionnelles sont présentes. Les malformations congénitales des valves cardiaques sont une des manifestations les plus communes des malformations cardiaques. Les défauts des valves mitrales représentent 1% des malformations chez les nouveaux nés, soulignant l'importance d'identifier les facteurs génétiques et non génétiques impliqués dans la formation des valves. Dans le but d'éclaircir les mécanismes développementaux impliqués dans la morphogénèse des valves, nous utilisons le poisson zèbre (*Danio rerio*) qui est un excellent modèle pour étudier la valvulogénèse. La transparence des embryons est particulièrement utile pour l'observation du développement cardiaque. Lors du développement embryonnaire chez l'espèce *Danio rerio*, le cœur est le premier organe vital fonctionnel. Le cœur embryonnaire est formé de deux chambres cardiaques distinctes, l'atrium et le ventricule, ainsi que de deux couches cellulaires: le myocarde, qui constitue la couche externe capable de se contracter, et l'endocarde qui constitue la couche interne de cellules et qui n'est pas contractile. Les valves cardiaques émanent de l'endocarde, au niveau d'une zone séparant l'atrium du ventricule et communément appelée canal atrio-ventriculaire (AVC) (Beis, Bartman et al. 2005; Chi, Shaw et al. 2008).

Bien que les mécanismes moléculaires qui contrôlent la valvulogénèse restent peu connus, leur bonne fonctionnalité est indispensable à l'activité cardiaque et à la prévention d'un flux reversant entre le ventricule et l'atrium. Cependant, il a été montré que

l'expression des gènes au niveau de l'AVC dépend de l'activité de molécules sécrétées au niveau du myocarde ainsi qu'à un changement de polarité cellulaire intervenant au niveau des précurseurs endothéliaux localisés dans l'AVC (Beis, Bartman et al. 2005). Il a également été démontré que la morphogénèse des valves dépend du flux sanguin (Hove, Koster et al. 2003; Vermot, Forouhar et al. 2009). Lors de l'analyse d'un embryon à 48 heures après fertilisation (hpf), un flux reversant est observable au niveau de l'AVC uniquement. Lorsque des cellules endothéliales en culture sont soumises à un flux pulsatile unidirectionnel, certains gènes sont surexprimés (Dekker, van Soest et al. 2002). L'un d'eux est *klf2a*, un facteur de transcription spécifiquement exprimé au niveau de l'AVC et de l'outflow tract (OT) chez l'embryon à 56hpf. L'inactivation du gène *klf2a* empêche la formation des valves (Vermot, Forouhar et al. 2009). Suite à la mise en évidence de l'importance du flux reversant et du gène *klf2a* pour la valvulogénèse (Vermot et al., 2009), je me suis intéressée au mécanisme de régulation de l'expression du gène *klf2a* dans les cellules de l'AVC ainsi qu'à la voie de signalisation impliquant les mécano-détecteurs intervenant dans la détection du flux sanguin par les cellules endothéliales. Le modèle proposé suite à mes recherches est que la présence de flux reversant au niveau du canal atrio-ventriculaire permet, via des mécano-détecteurs spécifiques aux cellules endothéliales, de propager l'information à l'intérieur de ces dernières pour induire l'expression du gène *klf2a* via une voie de signalisation impliquant le calcium intracellulaire, une protéine kinase (pkd2) et des histones déacétylases.

## 2 Rôle du facteur de transcription *klf2a* et des forces hémodynamiques lors de la valvulogénèse

Afin de déterminer comment l'expression du gène *klf2a* est régulée lors de la valvulogénèse en réponse au flux sanguin, quatre lignées transgéniques contenant des morceaux du promoteur *klf2a* ont été construites dans le vecteur pT2K-CAGGS (Tg (*klf2a*:h2b-eGFP)). Ces constructions font intervenir les sites Tol2 qui favorisent l'intégration dans le génome (Koga, Suzuki et al. 1999) et diffèrent par la taille du promoteur *klf2a* inséré, à savoir, 1kb, 4kb, 6kb et 9kb. L'injection de ces vecteurs linéarisés dans des embryons stade une cellule nous a permis de générer des fondateurs et d'établir une lignée stable à partir de la génération F2. La caractérisation de ces lignées montre une expression *gfp* positive dans l'AVC mais aussi dans l'outflow-tract (OT) quelle que soit la taille du promoteur du gène *klf2a* inséré, mais aussi un bruit de fond plus élevé au niveau des vaisseaux et de la tête dans les lignées 1 et 4 kb à 48hpf. Pour ces raisons, les expériences menées au cours de ma thèse se sont faites avec la lignée 6kb du promoteur *klf2a*, qui reste très spécifique de l'AVC et de l'OT à 48 et 72hpf et récapitule l'expression endogène du gène *klf2a*.

La caractérisation de l'activité du promoteur de *klf2a* en réponse au flux a nécessité une première expérience utilisant le morpholino (MO) *tnnt2*. Les poissons injectés présentent ainsi une absence totale de flux sanguin et un cœur non contractile. A 48hpf, contrairement aux poissons contrôles (WT), l'expression du transgène s'est révélée être absente au niveau de l'AVC et de l'OT, indiquant que le promoteur *klf2a* semble répondre au flux. Afin de confirmer que l'activité du promoteur *klf2a* dépend du flux, l'utilisation de morpholinos affectant la vitesse sanguine (*cm1c1*, *vmhc*) ainsi que sur sa viscosité (*gata2*) ont été testés après vérification d'absence de fluctuations du fond endocardique grâce à la lignée

*Tg(flt1:td-tomato)*). Pour chaque test, la lignée *Tg(klf2a 6kb : h2b-eGFP)* a été croisée avec la lignée *Tg(fliNLS-mCherry, roy<sup>+/-</sup>)* qui marque les noyaux de toutes les cellules de l'endocarde. Le nombre total de cellules ainsi que le nombre de cellules exprimant la *gfp* a été manuellement compté dans l'atrium, l'AVC ainsi que le ventricule et l'intensité nucléaire de la *gfp* mesurée grâce aux logiciels Image J, Matlab et phylocell.

L'injection du MO *cm1c1* affecte la contraction atriale et ventriculaire, diminue la vélocité sanguine et le flux reversant au niveau de l'AV canal. Comparé aux poissons *WT*, le nombre total de cellules, le nombre de cellules exprimant la *gfp* ainsi que l'intensité nucléaire sont significativement réduits au niveau de l'AVC, du ventricule et de l'atrium. Les poissons injectés avec le MO *vmhc* présentent quant à eux un défaut de contraction ventriculaire, une vélocité sanguine et un flux reversant réduits. A 48hpf, le nombre total de cellules se trouve significativement diminué dans l'AVC uniquement, ce qui n'est pas le cas du nombre de cellules exprimant une *gfp* significativement réduite dans l'atrium et l'AVC. Dans ces mêmes conditions, l'intensité d'expression du transgène *klf2a* baisse. Ces deux MO montrent que lorsque l'on joue sur la contraction cardiaque, nous diminuons le nombre total de cellules et le niveau d'expression du gène *klf2a* dans l'AVC.

J'ai également fait varier la viscosité sanguine en utilisant des morpholinos tels que *gata2*, qui décroît l'hématopoïèse et diminue la viscosité sanguine. Ces embryons ne présentent aucun défaut de contraction cardiaque mais possèdent un flux reversant réduit et un flux sanguin diminué (30% de cellules sanguines). Les résultats montrent une diminution du nombre total de cellules ainsi que du nombre de cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC et du ventricule.



Ces expériences démontrent que lorsque l'on diminue la contraction cardiaque ainsi que la viscosité sanguine et le flux reversant, nous diminuons également le nombre de cellules exprimant la *gfp* et son niveau d'intensité, indépendamment d'un effet du fond endocardique. L'activité du promoteur *klf2a* dépend donc de la présence du flux sanguin au niveau des cellules endothéliales.

### 3 Mécanodétection et régionalisation de l'expression de *klf2a*

Suite à la démonstration de la dépendance du promoteur *klf2a* vis-à-vis du flux sanguin, nous avons voulu savoir quels sont les mécanodétecteurs permettant l'expression de ce gène au niveau du canal atrio-ventriculaire. Parmi les mécanismes possibles, le cil primaire se révèle être un candidat intéressant car il a été suggéré que son rôle soit nécessaire pour détecter le flux sanguin dans les cellules endothéliales (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006) et des travaux menés au laboratoire démontrent leur nécessité au cours du développement des vaisseaux sanguins. De plus, d'autres expériences ont montré la présence de cils dans des zones cardiaques soumises au flux chez le poulet et la souris. (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006; Slough, Cooney et al. 2008).

Afin d'observer la présence des cils primaires dans le cœur de poisson zèbre, nous avons développé une lignée transgénique capable de marquer spécifiquement les cils endothéliaux; *Tg(UAS\_arl13b-RFP:cmlc2-eGFP)*. Dans cette expérience, et en croisant cette lignée avec la lignée *Tg(fligalFF:UAS\_kaede)* nous utilisons le système Gal4-UAS permettant d'exprimer, de façon endothélial-endocardial spécifique (Herwig, Blum et al. 2011), la RFP dans le cil en la fusionnant avec une protéine spécifique au cil (Arl13b)

(Borovina, Superina et al. 2010). Après validation des lignées transgéniques, j'ai montré la présence de cils à 30 et 48hpf sur les cellules de l'endocarde, notamment à proximité de l'AVC. Ces données ont été confirmées par microscopie électronique à 48hpf.

#### 4 Le complexe TRPP2/TRPV4, mécano-senseur potentiel de l'endocarde

Après la découverte du cil comme probable mécanodétecteur de l'endocarde, la question des mécanosenseurs moléculaires intervenant lors de la valvulogénèse s'est posée. Se basant sur la littérature, j'ai décidé de regarder plus en détail le rôle du complexe TRPP2/TRPV4 qui forme un canal ionique polymodal à la base du cil et dont la conductance ionique qui lui est associée semblerait être activée par la déflexion du cil (Kottgen, Buchholz et al. 2008). En injectant séparément les morpholinos *trpv4* et *trpp2*, nous observons, malgré des contractions cardiaques identiques aux poissons *WT*, une baisse importante de l'intensité cellulaire dans tout le cœur, ainsi qu'une diminution du nombre total de cellules et de l'expression du gène *klf2a* dans l'AVC (*trpv4* MO) et dans l'AVC et le ventricule (*trpp2* MO) par rapport au contrôle.

Ces données confirment la position en amont du complexe TRPP2/TRPV4 par rapport au gène *klf2a* et soulèvent la question de la dépendance au flux de ce dernier. Pour résoudre cette question, j'ai observé l'effet induit par le gène *trpp2* dans un cas où le flux reversant est augmenté comme dans les poissons injectés avec le MO *gata1*. Dans ces mutants, le nombre total de cellules, le nombre de cellules exprimant la *gfp* ainsi que l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire sont largement augmentés dans l'atrium, l'AVC et le ventricule. En

co-injectant le morpholino *gata1* avec le morpholino *trpp2*, j'ai pu observer une baisse dramatique de ces trois paramètres dans toutes les régions du cœur, indiquant la dépendance au flux de TRPP2, mais aussi son importance pour la mécanodétection.

En se basant sur la littérature, il est également connu qu'après un stimulus, le calcium intracellulaire est augmenté via ce complexe, ce pourquoi j'ai décidé d'observer les variations de calcium intracellulaire au niveau du cœur. Pour ce faire, nous avons utilisé un indicateur calcique résultant de la fusion d'une gfp avec la calmoduline et la kinase M13 (gcamp3.0)(Tian, Hires et al. 2009). En présence de gcamp3.0, le niveau de signal fluorescent provenant de la gfp augmente lorsque la concentration de calcium cellulaire augmente. Cette protéine permet de révéler la présence de calcium in vivo lorsqu'elle est exprimée dans l'embryon. Pour ce faire, j'ai croisé la lignée *Tg (fligalFF :UAS\_kaede)* avec la lignée *Tg(UAS 1020 G-Camp3.0)*(Warp, Agarwal et al. 2012).

J'ai préalablement caractérisé le niveau de calcium présent dans les poissons contrôles (non injectés). Ces derniers présentent un niveau calcique très élevé dans l'AVC et le ventricule lorsque que la contraction s'effectue. En effectuant la même caractérisation avec les morpholinos utilisés précédemment (*vmhc*, *cmlc1*, *trpp2*), j'ai pu observer une baisse significative du calcium dans ces mêmes régions du cœur. Ces résultats suggèrent que le niveau d'intensité calcique est flux et TRPP2 dépendant.

## 5 Voie moléculaire: rôle de pRkd2 et HDAC5

Afin de mieux comprendre l'activation de l'expression du gène *klf2a* dans la cellule endothéliale, je me suis intéressée à la voie moléculaire faisant intervenir la protéine kinase

D (PKD) et ses isoformes, ainsi qu'aux histones déacétylases. En effet, il a été montré que l'expression du gène *klf2a* responsable de la formation des valves cardiaques est contrôlée par l'histone déacétylase 5 qui est lui-même contrôlé par la protéine kinase 2 (PrKD2) (Just, Berger et al. 2011). Pour étudier la réaction du transgène vis-à-vis de ces molécules, j'ai utilisé différentes drogues activant ou inhibant ces principales kinases et HDAC5.

Contrairement à l'utilisation d'un inhibiteur de PrKD2, l'utilisation d'un activateur de PrKD2 ainsi que d'un inhibiteur d'HDAC5, a permis d'augmenter l'expression du gène *klf2a* dans l'ensemble des cellules endothéliales du cœur des poissons contrôles. J'ai aussi pu montrer que l'activation de PrKD2 ou l'inhibition des HDAC sont suffisants pour activer l'expression de *klf2a* en l'absence de flux sanguin.

Ces expériences démontrent que le transgène dépend bien de cette voie de signalisation et établissent une nouvelle voie de signalisation activée par le flux sanguin de manière mécano-dépendante dans les cellules endothéliales.

## 6 Conclusion

La formation de valves fonctionnelles émanant de l'endocarde au niveau du canal atrio-ventricule est essentielle à la bonne fonction cardiaque et à la prévention d'un flux reversant au niveau de l'AVC. La morphogénèse des valves est soumise à de nombreux paramètres cellulaires et moléculaires qui restent à ce jour que peu décrits. De plus, l'expression de facteurs de transcription est indispensable à la formation des valves cardiaques en réponse aux forces hémodynamiques générées par le flux sanguin. La construction de la lignée *Tg(klf2a 6kb : h2b-eGFP)* s'est révélée être un outil important pour

la caractérisation de la voie de signalisation déclenchant l'expression du gène *klf2a* dans les précurseurs des valves. La diminution du nombre de battements cardiaques ainsi que la viscosité sanguine entraîne une baisse importante de l'expression du gène *klf2* et l'intensité de ce dernier dans l'AVC des poissons injectés. Les expériences ont également pu mettre en évidence la dépendance de l'expression du transgène dans les cellules endothéliales vis-à-vis du flux.

La recherche de mécanodétecteurs permettant l'expression génique au niveau de l'AVC a mis en évidence la présence de cils primaires à proximité de l'AVC mais a surtout permis de se démontrer le rôle du complexe TRPP2/TRPV4 dans le processus de mécanodétection. Ce complexe est localisé en amont de *klf2a*, permet d'augmenter le calcium intracellulaire en réponse aux forces hémodynamiques et possède un rôle majeur dans la mécano-détection au niveau de l'AVC, permettant la valvulogénèse. Nous proposons un modèle où la déflexion du cil permet l'entrée de calcium dans la cellule via le complexe cité ci-dessus. Les expériences menées pour caractériser le calcium intracellulaire dans les embryons contrôles et dans les embryons injectés ont permis d'affirmer que le niveau d'intensité calcique est flux et TRPP2 dépendant.

Enfin, l'exploration de la voie de signalisation PKD2-HDAC5 nous a confirmé la dépendance du transgène à cette voie moléculaire.

# **INTRODUCTION**

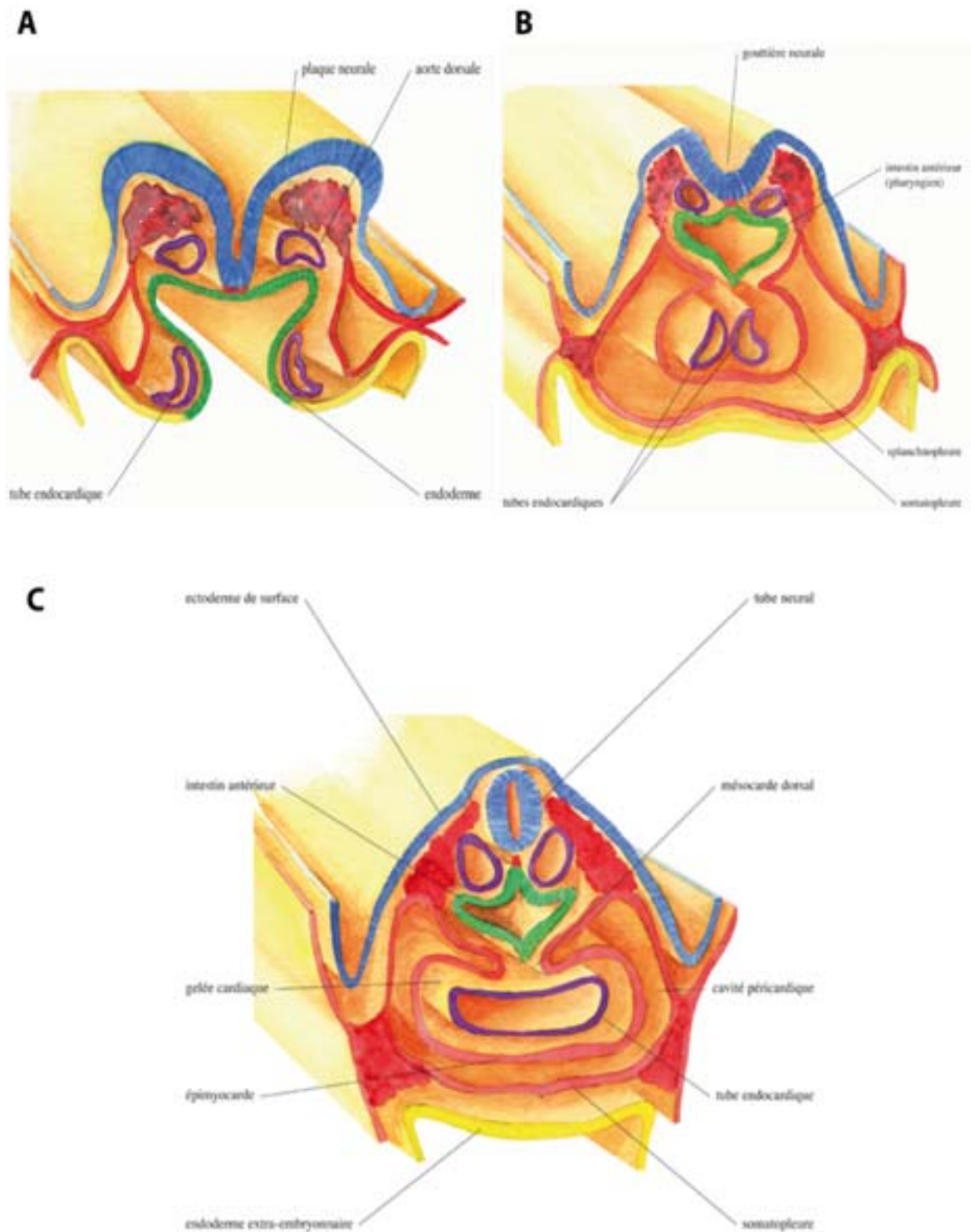
## 1 La formation cardiaque humaine

Pendant **l'embryogénèse humaine**, le cœur constitue un des premiers organes à se développer. Dès l'apparition des premières ébauches cardiaques, il joue un rôle indispensable au développement du fœtus. Chez l'homme, le développement cardiaque débute au cours de la 3<sup>ème</sup> semaine de vie. En effet, au jour 17, l'apparition de deux types cellulaires ; les hémoblastes embryonnaires, à l'origine des cellules hématopoïétiques, ainsi que les cellules périphériques de type endothéliales, est visible dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline. Ces îlots sont responsables, après allongement et rapprochement, de la formation du réseau vasculaire initial, indispensable au développement fœtal. L'apparition, au jour 19, des tubes endocardiques, structures vasculaires composées d'un seul endothélium, indique le début de la formation cardiaque à proprement parler. En effet, et ceci dès la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine, la courbure de l'embryon va amener les tubes endocardiques au niveau de la région thoracique et provoquer un adossement de ces derniers sous forme de fer à cheval ([Figure 5, A-B](#)). La fusion de ces structures va permettre la formation du tube cardiaque primitif ou tube endocardique primitif, constitué d'un seul endothélium (feuillet interne de cellules, indispensable aux fonctions nutritives de l'embryon) Peu de temps après ce phénomène, de nombreux mésoblastes viennent s'accumuler autour du tube cardiaque pour former la région cardiogène et se différencier en deux couches ; le myocarde, muscle cardiaque contractile, et la gelée cardiaque permettant de séparer le myocarde du tube endocardique primitif et jouant un rôle mécanique indispensable dans l'activité cardiaque initiale ([Figure 5, C](#)). La dernière étape de la formation du tube primitif voit apparaître la création de l'épicarde, couche externe du tissu

cardiaque, ainsi que le péricarde viscéral, tous deux constitués de cellules mésothéliales ayant pour but de recouvrir ces séreuses.

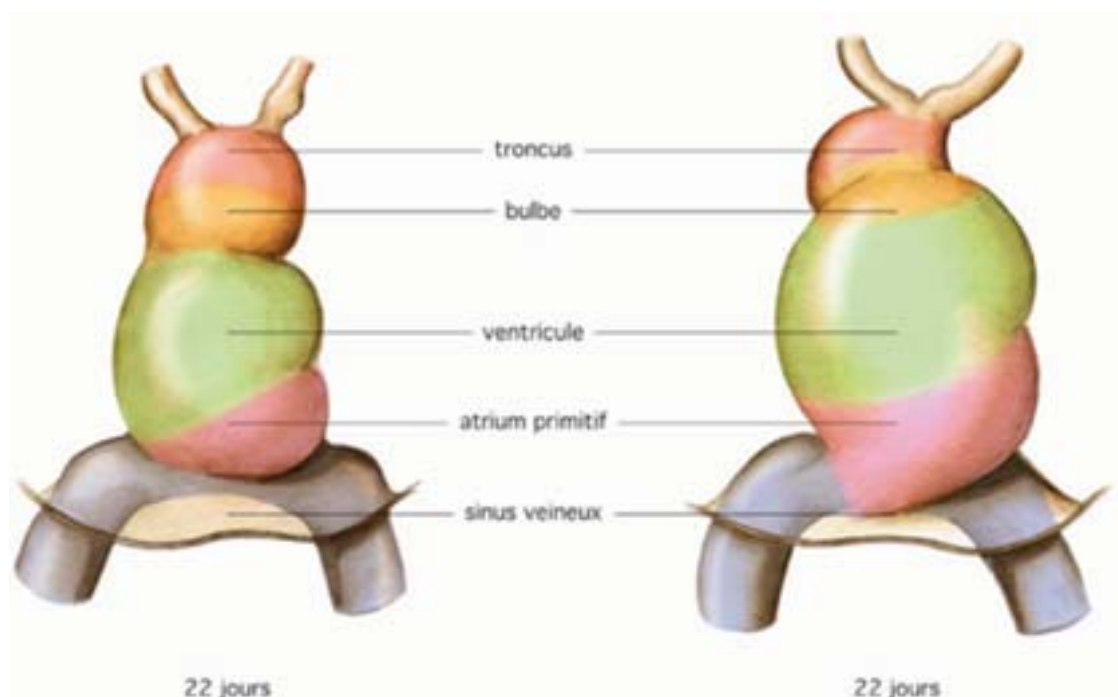
Lors du phénomène de **courbure de l'embryon**, le tube cardiaque primitif n'est pas le seul à être formé. En effet, l'entraînement des différents vaisseaux afférents et efférents va amener à la formation de l'anse dorso-ventrale correspondant au premier arc aortique (sur un total de cinq arcs aortiques finaux) ainsi qu'à la formation de veines cardinales, permettant de rassembler le sang de la vésicule vitelline, ainsi que du cordon ombilical. Les premières contractions cardiaques interviennent dès le 23<sup>ème</sup> jour et sont coordonnées avec des mouvements péristaltiques déterminant le sens du flux sanguin.





**Figure 5 : Formation du tube cardiaque primitif chez l'humain.** (A) Jour 19 du développement embryonnaire, apparition des tubes cardiaques endocardiques. (B) Adossement des tubes endocardiques et forme caractéristique en « fer à cheval ». (C) Fusion des tubes endocardiques et formation du tube cardiaque primitif (Image de Maggie Tintignac, Ecole Estienne).

Après la formation du tube cardiaque primitif et la survenue des différents vaisseaux sanguins, une série de constrictions/dilatations s'effectue au niveau du tube primitif et entraîne la formation des différentes cavités du cœur, à savoir le sinus veineux, l'oreillette et le ventricule primitif qui sont séparés par le sillon auriculo-ventriculaire, mais aussi le bulbe cardiaque et le sillon intra-ventriculaire (Figure 6).



**Figure 6 : Formation des cavités du cœur primitif. Exemple de formation droite ou gauche des différentes parties cardiaques suite au mouvement du tube primitif (Image de Maggie Tintignac, Ecole Estienne).**

C'est à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine que le tube cardiaque commence à s'allonger et se courber. De nombreux changements morphologiques surviennent alors. L'oreillette primitive remonte en arrière vers la partie céphalique de l'embryon et le bulbe cardiaque se dirige de façon ventrale et vers le bas, tout comme le ventricule, donnant la forme caractéristique du cœur embryonnaire en « S » (Figure 7). Lors de cette conformation, les

vaisseaux afférents confluent dans l'oreillette primitive et communiquent avec le ventricule primitif. Le ventricule primitif est alors coudé et est en communication directe avec le bulbe. Bien que les mécanismes de l'inflexion du cœur ne soient pas tous connus, ces changements de conformation amènent au positionnement définitif du cœur et précèdent le cloisonnement des cavités cardiaques.

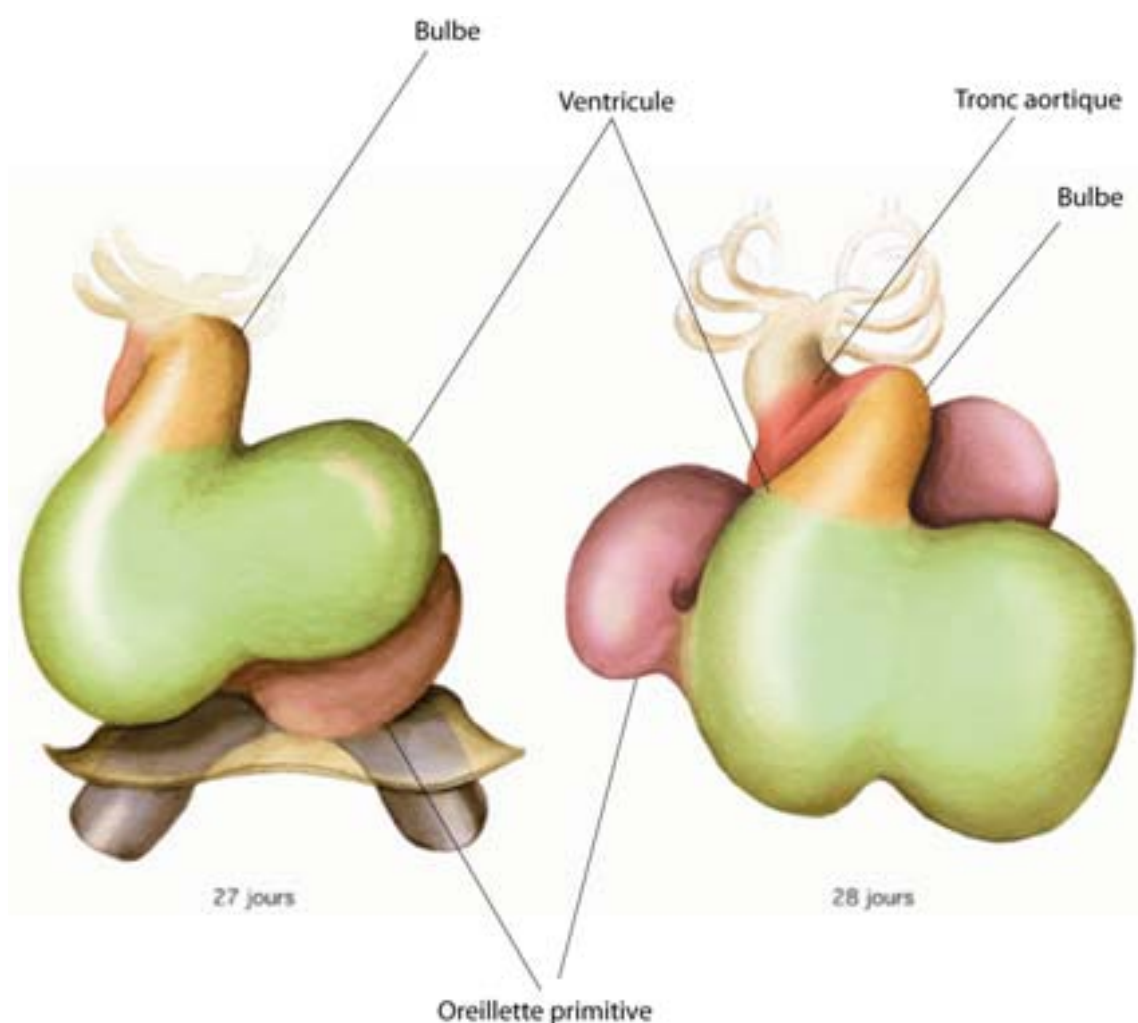
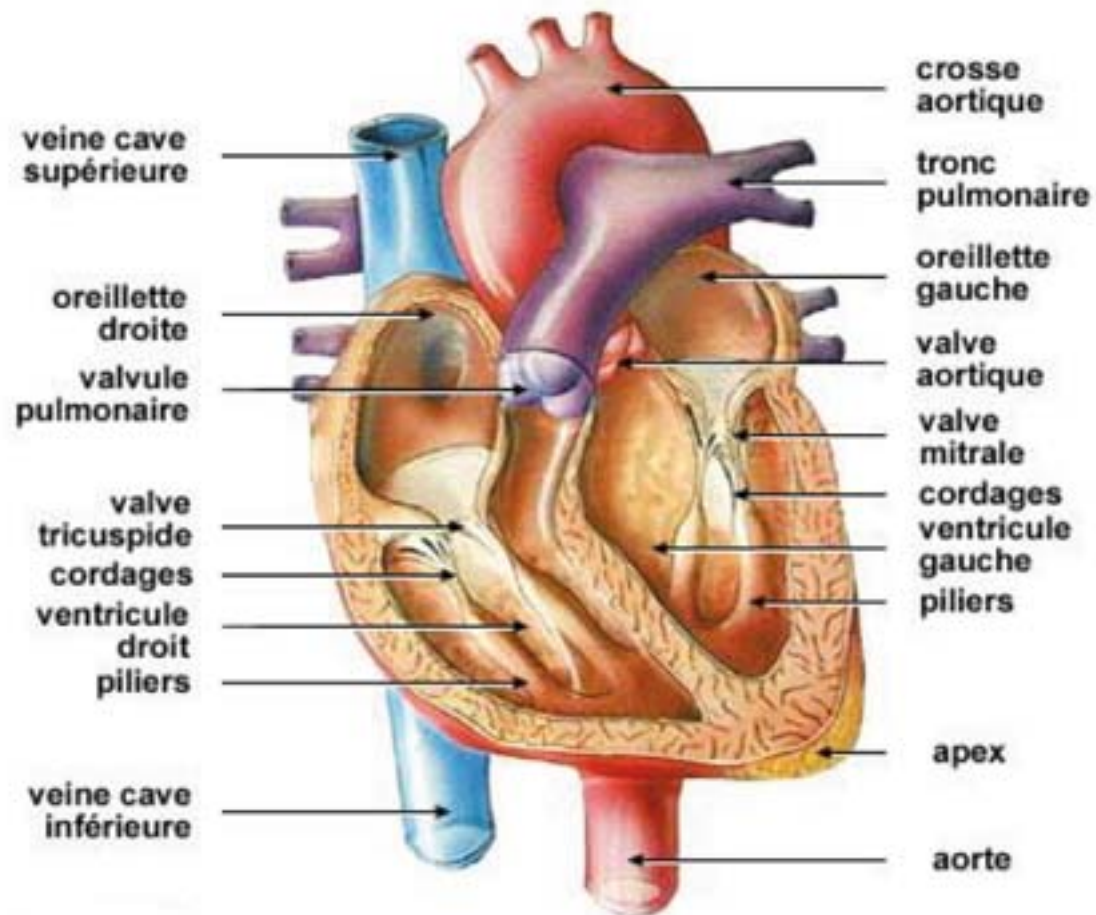


Figure 7: **Formation du cœur primitif.** Orientation vers le pôle céphalique des oreillettes (28ème jour) et déplacement ventral du bulbe et du ventricule. Le cœur primitif atteint sa formation caractéristique en « S » (Image de Maggie Tintignac, Ecole Estienne).

Le **cloisonnement du cœur** s'effectue en plusieurs étapes et commence aux environs du jour 26. Les oreillettes ainsi que le canal auriculo-ventriculaire sont les premiers à subir cette séparation de circulation systémique et pulmonaire. En résulte deux parties distinctes ; une droite et une gauche. C'est au niveau du canal auriculo-ventriculaire qu'émerge des bourrelets endocardiques, responsables de la septation atrioventriculaire droite et gauche. Le cloisonnement des ventricules se fait au même moment que la formation des valves auriculo-ventriculaires, c'est-à-dire entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire et s'effectue de la même manière que la septation atriale.

**La formation des valves cardiaques** chez l'homme est une étape importante du développement. Ces excroissances musculo-tendineuses proviennent directement des cellules myocardiques ventriculaires. Deux valves sont formées au cours du développement ; une valve gauche, encore appelée valve bicuspide ou valve mitrale, composée de deux feuillets cellulaires tandis que la valve de droite, ou valve tricuspide, est formée de trois feuillets. Cet ensemble valvulaire est indispensable à la formation cardiaque car il permet d'éviter le reflux sanguin dans l'atrium, permettant ainsi une circulation sanguine efficace.

**L'aboutissement du développement cardiaque** est donc atteint après huit semaines d'embryogénèse et laisse place à un organe musculaire creux et vascularisé, composé de quatre chambres distinctes (deux atriums et deux ventricules) contractiles, permettant ainsi la circulation sanguine dans l'ensemble de l'embryon ([Figure 8](#)).



**Figure 8: Aboutissement de la formation cardiaque après huit semaines de développement embryonnaire.** Présence de deux ventricules, deux atriums ainsi que des valves cardiaques (Image de Philippe Chevalier, Lyon).

Malgré un processus bien établi, il arrive qu'une des étapes décrite ci-dessus fasse défaut à la bonne formation cardiaque. Ces défauts résultent en des maladies cardiaques congénitales.

## 2 Les maladies cardiaques congénitales

Les **maladies cardiaques congénitales** ne sont pas liées au facteur héréditaire et surviennent dans près de 8 naissances sur 1000 (INSEE, 2006). Les malformations cardiaques sont très diverses et peuvent, dans le cas le plus grave, entraîner le décès du nourrisson. Bien que l'origine de ces maladies reste dans la majorité des cas inconnue, l'alcool, la drogue (barbituriques, anti-inflammatoires) et les infections virales (rubéole) au cours de la grossesse sont une des causes communes de cardiopathies congénitales. Plusieurs types de maladies cardiaques congénitales peuvent être décrits à ce jour :

- Les malformations septales ou shunt gauche-droit. Ces malformations présentent un trou dans le cœur lié à un problème de cloisonnement du cœur gauche et droit. Ce défaut de cloisonnement, résultant en majorité d'une communication soit interventriculaire soit interauriculaire, entraîne un mélange de sang oxygéné et non oxygéné. Le cœur doit alors fournir un effort plus intense pour pouvoir alimenter le corps en oxygène.
- Les cardiopathies cardiaques congénitales avec cyanose correspondent quant à elles, à un taux d'oxygène pompé anormalement bas. Deux maladies sont prédominantes dans ce classement ; la tétralogie de Fallot, qui comporte quatre malformations cardiaques, et la malposition des gros vaisseaux sanguins.
- Enfin, le phénomène de sténose, qui se caractérise par un rétrécissement ou à une obstruction bloquant totalement ou non la circulation sanguine, est l'un des plus importants parmi les maladies cardiaques congénitales. C'est à ce niveau que l'on rencontre les maladies liées aux veines et artères mais surtout au niveau des valves cardiaques, encore appelées valvulopathies.

Les **valvulopathies** représentent une grande part des cas de maladies cardiaques congénitales et sont retrouvées chez 2% de la population adulte occidentale (INSEE 2006). Ces dernières augmentent avec l'âge et l'on peut atteindre plus de 15% des sujets atteints après soixante-quinze ans. Les valvulopathies sont en général liées à un rétrécissement ou à une insuffisance résultant dans les deux cas à un défaut au niveau de circulation sanguine au niveau des chambres cardiaques. L'insuffisance mitrale, qui reste la plus connue, ne permet plus la prévention du reflux sanguin vers l'oreillette gauche, obligeant ainsi le cœur à modifier le rythme des contractions cardiaques. Le cœur ne remplit plus son rôle, on parle alors d'insuffisance cardiaque. Dans la majorité des cas, ces atteintes nécessitent des interventions chirurgicales lourdes pour parer à ces problèmes de conformation.

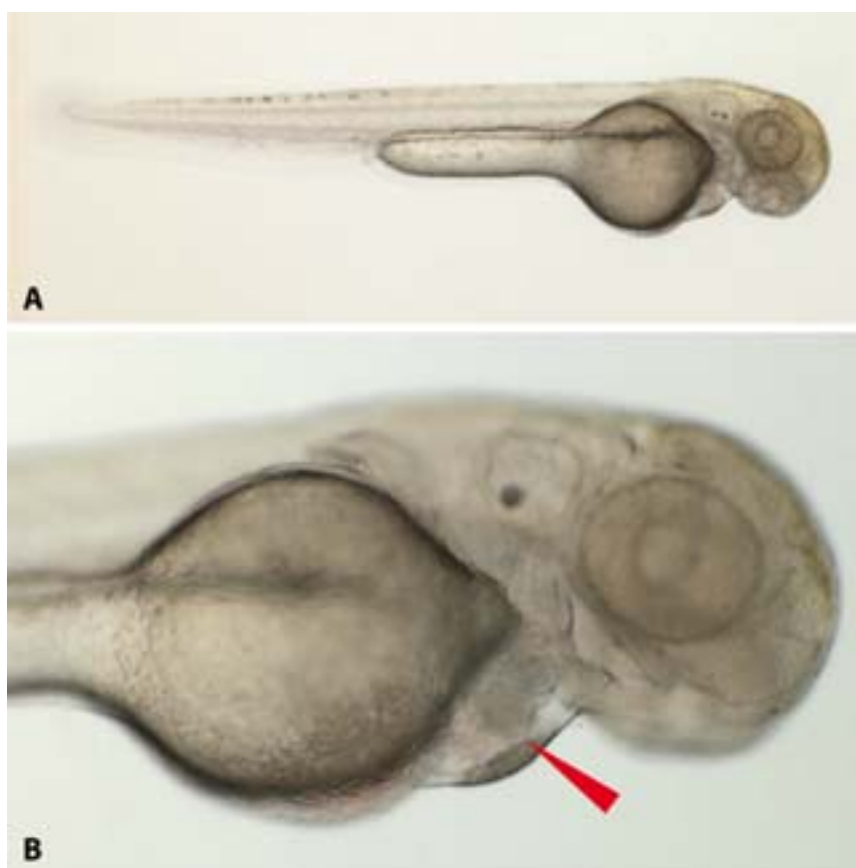
Afin d'étudier le développement cardiaque et les maladies liées à ce dernier, un nouveau modèle d'étude a vu le jour dans les années 1990 ; le *Danio rerio*, plus communément appelé poisson zèbre ou poisson pyjama.

### **3 Un modèle d'étude du développement cardiaque : le poisson zèbre (*Danio rerio*)**

Le *Danio rerio*, originaire des eaux douces d'Asie, est fréquemment retrouvé dans les aquariums ornant nos habitations. Long de trois à cinq centimètres à la taille adulte, ces poissons présentent, à l'état naturel, des rayures bleues horizontales lui valant le nom de poisson zébré. Les mâles sont en général plus fins et que les femelles, qui présentent un abdomen plus développé afin d'y contenir les œufs. Leur facilité d'élevage ainsi que leur



résistance, leur capacité de reproduction précoce (dès trois mois) et leur fécondation externe sont quelques un des atouts de leur utilisation en laboratoire. Les femelles sont capable de pondre plus de trois cent œufs en une fois et ceci à raison de tous les deux-trois jours. Dès la fertilisation externe de ces derniers, les œufs sont transparents ce qui en fait un avantage majeur pour les méthodes d'imageries optiques. En effet, du fait de la formation rapide des organes par transparence, de nombreuses études d'imagerie *in vivo* ont pu être réalisées sur l'embryon de poisson zèbre, pratique expérimentale rendue très difficile voire impossible dans les autres espèces animales (Figure 9).



**Figure 9: Observation du cœur par transparence chez le poisson zèbre. (A) Aspect général d'un poisson à 48hpf après traitement en danio +PTU 0,03%. (B) Visualisation directe du cœur *in vivo* (flèche rouge) à 48hpf.**



En plus de présenter des avantages pour l'imagerie *in vivo*, le poisson zèbre est un des rares vertébrés à pouvoir entamer une régénération complète de ses organes, comme le cœur ou encore les nageoires... mais le plus important reste à ce jour le séquençage total de son génome, étude démarrée en 2001, ayant permis de mettre à jour plus de 70% d'homologie avec le génome humain. Ces étonnantes caractéristiques ainsi que sa forte similitude génétique avec l'homme en ont fait un des organismes modèle pour l'étude des maladies humaines et ce dans divers domaines tels le cancer, la régénération, les maladies cardiaques...

Suite à l'utilisation du poisson zèbre comme modèle de recherche scientifique, de nombreuses études ont permis de détailler la formation du cœur (Stainier, Lee et al. 1993; Chen, van Eeden et al. 1997), notamment grâce à la création de lignées transgéniques utilisant les protéines fluorescentes (GFP, RFP) dans les cellules des divers tissus cardiaques (Motoike, Loughna et al. 2000; Huang, Tu et al. 2003; Long, Ahmad et al. 2003). Ainsi, la création de la lignée transgénique *Tg(cmlc2 :eGFP)* permet de visualiser la fluorescence verte dans les cellules myocardiques tandis que la lignée *Tg(Tie2 :eGFP)* permet la visualisation de la fluorescence verte dans les vaisseaux sanguins suite au marquage de la totalité des cellules endothéliales. Bien que fortement similaire à l'homme, (présence d'un ventricule, atrium, bulbe...), son organisation est bien plus simple et son développement est plus rapide que chez l'être humain.

## 4 La formation cardiaque chez le poisson zèbre

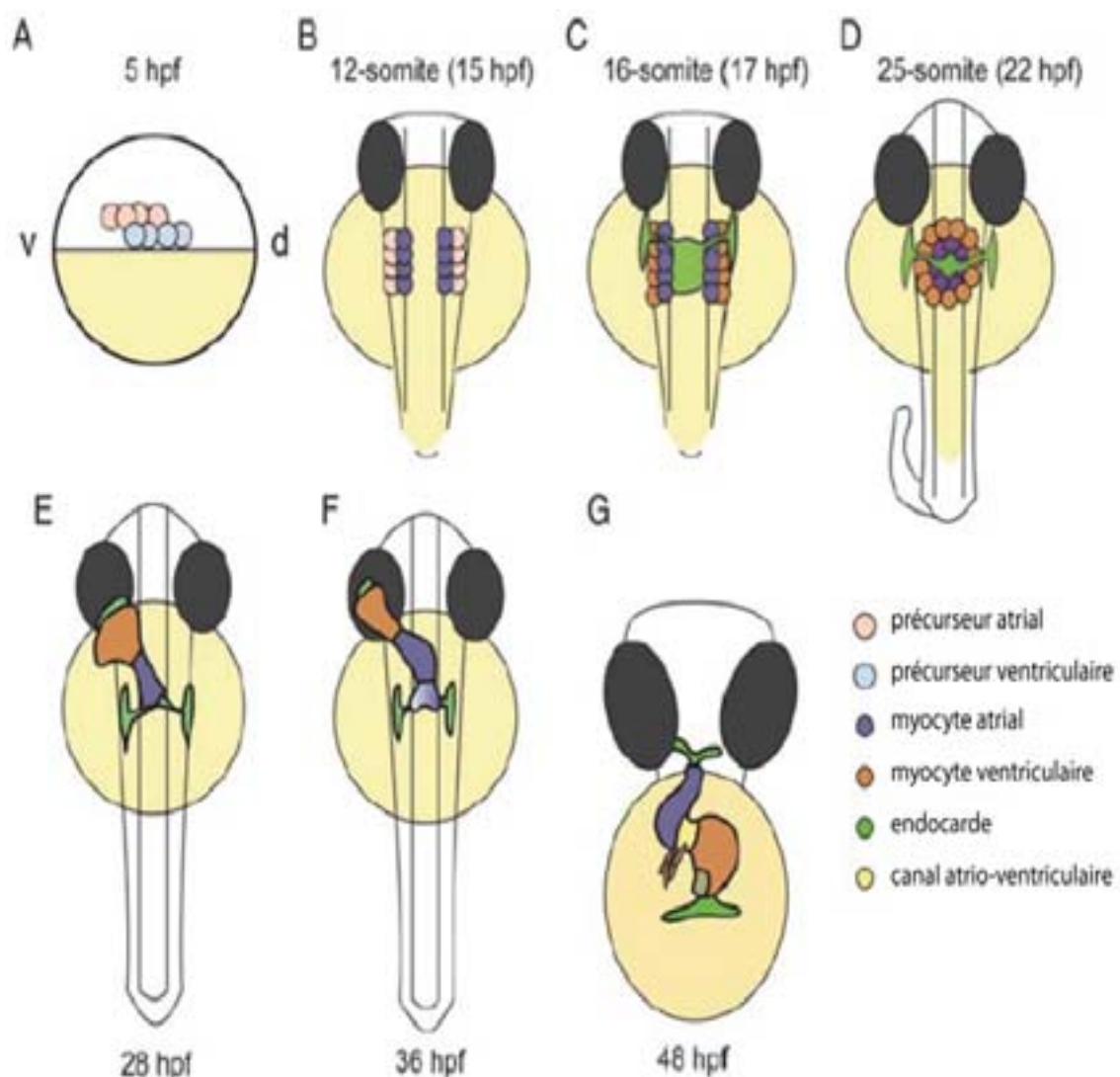
Le **développement cardiaque du poisson zèbre** débute dès le stade précoce de la blastula, qui est une des phases initiale du développement de l'embryon, soit aux alentours de 5 heures après la fertilisation de l'œuf (hpf). A ce stade, deux pools de précurseurs cellulaires myocardiques sont présents de part et d'autre de la zone latérale marginale, correspondant à l'axe vertical médian de l'embryon ([Figure 10 A](#)). Un pool de cellules sera capable de donner naissance à des cellules myocardiques tandis que l'autre entrainera en plus la production de cellules endothéliales, endocardiques et sanguines (Stainier, Lee et al. 1993). Contrairement aux précurseurs myocardiques, les précurseurs endocardiques du ventricule et de l'atrium sont localisés tout au long de la zone marginale sans organisation spécifique.

Les **précurseurs cardiaques** sont les premières cellules issues du mésoderme, représentant le feuillet cellulaire intermédiaire de l'embryon, à se mettre en place durant la gastrulation (Warga and Kimmel 1990). Lors de ce processus, le mouvement des cellules s'inverse amenant ces dernières à s'orienter vers le pôle postérieur du poisson grâce à une rotation de 30 à 60° (Stainier and Fishman 1992), pour atteindre l'axe embryonnaire à 8 somites ([Figure 10 B](#)). C'est peu après la formation des deux tubes primaires le long de l'axe embryonnaire, à 16 somites soit environ 17hpf, que se forme les cellules hématopoïétiques et la première lignée de cellules myéloïdes (Swaen et Brachet, 1901 ; Senior, 1908). C'est également aux environs de ce stade qu'émerge l'endocarde, feuillet cellulaire non contractile résultant d'un groupe de cellules positivement marquées pour la tropomyosine encore connu sous le nom de « portion moyenne du mésoblaste » (Swaen et Brachet, 1901 ; Senior, 1909 ;(Stainier, Lee et al. 1993) ([Figure 10 C](#)). Ces cellules, d'origine mésodermique,

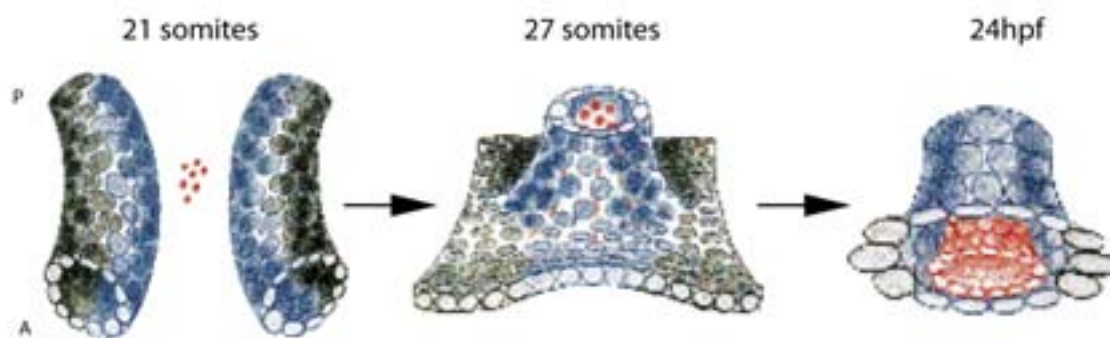
se forment au niveau de la partie antérieure de la plaque mésodermique latérale (ALPM). Les cellules endocardiques migrent ensuite le long de l'axe embryonnaire, peu avant la migration des cellules myocardiques (Bussmann, Bakkers et al. 2007). C'est lors de cette migration que les précurseurs myocardiques adoptent une organisation épithéliale polarisée (Trinh and Stainier 2004; Rohr, Bit-Avragim et al. 2006) via l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire (Trinh et Stainier, 2004 ; Trinh et al, 2005). Une fois cette migration terminée, les cellules cardiaques périphériques commencent leur changement directionnel de façon à être localisées antérieurement et postérieurement à l'axe médian du poisson zèbre (Stainier, Lee et al. 1993). Au même moment, les cellules myocardiques se positionnent autour des cellules endocardiques et déterminent ainsi la circonférence du cœur initial (Figure 11) (Holtzman, Schoenebeck et al. 2007). Une fois la fusion de ce cœur initial entamée, le tissu cardiaque forme un cercle dans lequel les cellules du futur ventricule, les cellules endocardiques et les cellules du futur atrium sont respectivement localisées à la circonférence, intérieur et à la périphérie du cœur primitif (Holtzman, Schoenebeck et al. 2007)(Figure 10D et 11). Ce cercle ne présente pour le moment aucune différence morphologique au niveau de l'organisation gauche-droite.

Le premier phénomène de **rupture de la symétrie cardiaque** apparaît avec la translocation du pôle veineux au niveau de la partie gauche de l'embryon (Chen, van Eeden et al. 1997), coïncidant avec l'extension du tube cardiaque où l'organisation et la polarité des cellules myocardiques ont un rôle majeur dans ce processus (Peterson, Mably et al. 2001; Rohr, Bit-Avragim et al. 2006)(Figure 10E et 11). C'est à ce moment-là, 26 somites soit environ 28hpf, que démarre le processus de rotation du cœur (jogging) (Chen, van Eeden et al. 1997). De nombreux phénomènes de migrations cellulaires apparaissent à ce stade, entraînant en premier lieu la migration des cellules myocardiques, initialement situées du

côté droit du cône cardiaque, vers la partie antérieure et ventrale gauche du cône cardiaque (Figure 10 E-F). Ces cellules participent donc à la mise en place de la partie ventrale du tube cardiaque tandis que les cellules initialement localisées du côté gauche du cône, amèneront à la formation de la voûte dorsale du tube cardiaque (Rohr, Otten et al. 2008) (Figure 10 E-F).



**Figure 10: Représentation schématique du développement cardiaque chez le poisson zèbre.** (A) Présence des deux pools cellulaires de part et d'autre de la zone latérale marginale. (B) Migration et positionnement des précurseurs myocardiques le long de l'axe embryonnaire. (C) Formation de l'endocarde. (D) Formation du cône cardiaque.



**Figure 11: Formation de l'endocarde.** (Haut) Formation et positionnement des deux tubes endocardiques primaires le long de l'axe médian de l'embryon, de part et d'autre des précurseurs endocardiques (rouge). (Milieu) Migration antéro-postérieure des cellules endocardiques et myocardiques (bleu) le long de l'axe embryonnaire. (Bas) Définition de la circonférence finale du cœur et positionnement du pôle veineux en position postérieure (noir) (Image adaptée de Stainier et al, 1993).

De façon intéressante, il a été démontré que la **vitesse de migration** variait en fonction de la position des cellules dans le cône cardiaque. Ainsi, les cellules traquées par Smith et ses collaborateurs ont révélées, en 2008, l'existence d'une migration à vitesse constante chez les cellules cardiaques localisées du côté antérieur (droit ou gauche) et un début de migration à vitesse constante puis un doublement de cette dernière pour revenir à une vitesse initiale chez les cellules localisées de façon postérieure au cône cardiaque, conformément aux autres données générées (Bussmann, Bakkers et al. 2007; Baker, Holtzman et al. 2008; Rohr, Otten et al. 2008; Smith, Chocron et al. 2008).

Outre la vitesse de migration variable, il a également été montré que la direction de ce jogging est directement régulée par la présence du signal asymétrique gauche/droite et entraîne, de façon dépendante, le déplacement du tube cardiaque vers la gauche ainsi que le retournement cardiaque vers la droite (Chen, van Eeden et al. 1997). Il est à noter que ce processus peut s'effectuer dans le sens inverse. La rotation cardiaque, qui concerne toutes

les parties du tube, s'effectue elle aussi de façon inégale. En effet, l'observation d'une rotation réduite au niveau de la partie centrale du tube cardiaque en élongation (futur outflow tract) a été décelée et résulte des diverses torsions endurées par ce dernier (Baker, Holtzman et al. 2008; Smith, Chocron et al. 2008). Ces phénomènes de rotation du cœur entraînent à terme la formation de la chambre ventriculaire (du côté droit) et atriale (du côté gauche) ainsi que la distinction de la courbure interne et externe du cœur (Figure 10 G). A ce stade, 36hpf, une petite constriction est visible aux bordures séparant l'atrium du ventricule. Cette constriction est plus connue sous le nom de canal atrio-ventriculaire (AVC ; AV) et se présente sous la forme d'un orifice circulaire. C'est dans cette région que les valves les plus importantes au fonctionnement cardiaque vont se former (les autres étant localisées au niveau du sinus veineux et de l'atrium, ainsi qu'au niveau du ventricule et du sinus veineux).

En effet, la présence initiale de cellules endocardiques au niveau de l'AVC permet, via un changement de conformation cellulaire qui sera expliqué plus tard dans cette introduction, **d'initier la valvulogénèse**. Chez les mammifères, la valvulogénèse, nécessitant une transformation cellulaire épithéliale à mésenchymateuse (EMT) est d'ores et déjà bien établie (Armstrong and Bischoff 2004), ce qui n'est pas le cas chez notre modèle d'étude. Basé sur ce modèle d'EMT potentiel, la formation des valves chez l'espèce *Danio rerio* débute dès 60hpf, après addition d'autres cellules endocardiques dans l'AVC, entraînant alors la formation d'une paire de coussinets endocardiques (ECs) (Scherz, Huisken et al. 2008). Ces petites protrusions mésenchymateuses vont s'épaissir au fur et à mesure du développement cardiaque pour former, aux environs de 80hpf et de façon asymétrique, des petits coussinets reliés à la partie atriale du canal AV (Beis, Bartman et al. 2005; Scherz, Huisken et al. 2008). C'est après 96hpf, lorsque les valves s'allongent encore, que l'on

considère la structure valvulaire comme étant définitive. Nous retrouvons ainsi une formation bicuspide faisant fortement penser à l'organisation de la valve mitrale humaine.

Cependant, pour aboutir à un cœur entièrement fonctionnel, de **nombreux gènes et changements structuraux sont nécessaires** aux cellules et ceci tout au long de la formation cardiaque. Bien que les cellules formant l'atrium et le ventricule ne subissent que peu de changements morphologiques en comparaison à celles de l'AVC, ces dernières requièrent une expression génique importante afin de mettre en place les différentes chambres cardiaques.

## 5 Expression génique et changements cellulaires lors de la cardiogénèse du poisson zèbre

**Les premiers gènes exprimés** lors de la formation cardiaque sont retrouvés au niveau des pools cellulaires situés de part et d'autre de la zone latérale marginale. Le maintien de la taille de ces cellules par l'acide rétinoïque (RA) joue un des premiers rôles dans l'initiation de la différenciation des précurseurs cardiaques (Kishimoto, Lee et al. 1997; Reiter, Alexander et al. 1999; Reiter, Verkade et al. 2001; Keegan, Feldman et al. 2005). L'expression du facteur de transcription *Nkx2.5* dès le stade 1-3 somites au niveau des cellules localisées près de l'axe médian de l'embryon (Kishimoto, Lee et al. 1997), permet la différenciation de la majorité de ces dernières en cellules myocardiques (Yelon and Stainier 1999). L'expression de ce facteur de transcription est régulée par plusieurs gènes retrouvés dans les cellules du mésoderme. En effet, la présence du gène *gata5*, du facteur de croissance *fgf8*, de la voie de signalisation Bmp (Bone morphogenic protein) ou encore l'expression du co-facteur de la

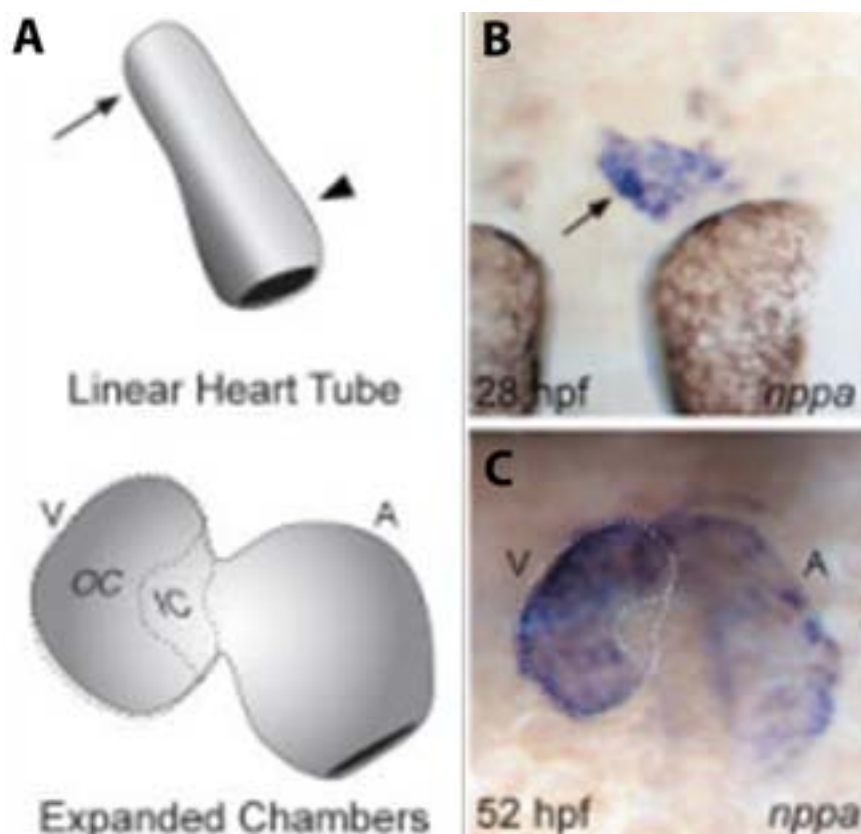
voie moléculaire Nodal (one eyed pinhead ou Oep) permettent de façon plus ou moins directe de réguler l'expression de *nkx2.5* dans les précurseurs cardiaques. Suite à cette expression, la survenue du gène *Grinch*, codant pour un récepteur à l'apelin couplé à une protéine G (Agtr11b), au niveau de l'ALPM ainsi que de son ligand (apelin) au niveau de la ligne médiane induit la migration des deux pools de précurseurs cellulaires myocardiques vers l'axe embryonnaire afin d'y entamer leur différenciation cardiogénique (Scott, Masri et al. 2007; Zeng, Wilm et al. 2007). Cette différenciation myocardique débute réellement aux alentours de douze somites et fait intervenir la caractéristique principale du gène *Hand2*, à savoir sa structure en hélice-loop-hélice (Yelon, Ticho et al. 2000). Ce gène, exprimé dans l'ALPM, agit de façon autonome dans le processus de différenciation cardiogénique en réprimant la formation de la fibronectine (Garavito-Aguilar, Riley et al. 2010), fonctionnant comme un substrat pour la mise en place de la migration myocardique. Cette répression est notamment retrouvée lors de la fusion des deux tubes cardiaques pour former le cône cardiaque au niveau de l'axe médian embryonnaire (Yelon, Ticho et al. 2000). Peu avant le phénomène de jogging, aux alentours de quatorze somites, l'expression génique de la chaîne lourde de la myosine ventriculaire (*vmhc*) (Yelon, Ticho et al. 2000) apparaît dans les cellules cardiaques, suivie de celle de la chaîne lourde de la myosine atriale (*amhc*, vingt-six somites) (Berdougo, Coleman et al. 2003). Cette spécificité génique permet d'ores et déjà de différencier les futures lignées atriales et ventriculaires dans le cœur embryonnaire. La différenciation cardiogénique des cellules composant le futur ventricule requiert la présence du gène *Hand2* (Yelon, Ticho et al. 2000) tandis que celle des cellules aboutissant au futur atrium, également appelé pôle veineux à ce stade du développement, nécessite l'expression du gène *Islet-1 (Isl1)* ainsi que la voie moléculaire Bmp (de Pater, Clijsters et al. 2009). La disruption de la symétrie cardiaque intervenant lors du jogging cardiaque entraîne une



migration des cellules myocardiques vers une position antérieure gauche. Cette migration s'effectue sous la présence du gène *has2* (*hyaluronan synthase 2*) permettant la production d'acide hyaluronique indispensable à l'activation du gène *Rac1* (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Une fois activé, le gène *Rac1* induit la formation de lamellipodes indispensables à la migration des cellules mésodermiques (Bakkers, Kramer et al. 2004; Rohr, Bit-Avragim et al. 2006). Phénomène complexe, le jogging ne se réduit pas uniquement à l'expression du gène *has2*. En effet, le jogging se révèle également être sous le contrôle du corécepteur nodal One eyed pinhead (*Oep*) (Yan, Gritsman et al. 1999), de la cascade signalétique *spaw/Nodal* (Long, Ahmad et al. 2003) mais aussi sous le contrôle du gène *bmp4*. Ce dernier se retrouve temporairement exprimé de façon asymétrique autour du cône cardiaque grâce à l'action de l'acide rétinoïque et à sa dépendance vis-à-vis de l'expression du gène *Nodal* (Chen, van Eeden et al. 1997; Bakkers, Verhoeven et al. 2009; Huang, Ma et al. 2011). Lors du jogging, l'expression du gène *bmp4* situé du côté gauche de la ligne latérale du mésoderme (où son expression est plus forte que celle du côté droit) joue un rôle important dans la réponse asymétrique émanant du tissu myocardique et a été montré comme dirigeant la migration des précurseurs cardiaques (Smith, Chocron et al. 2008). La mise en évidence de la relation entre *bmp* et *nodal*, appartenant tous deux à la grande famille des TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), dans le contrôle de la vitesse de migration n'a été décrite que récemment par une expérience menée par Lenhart et ses collaborateurs (2013). Ainsi, l'utilisation de mutants pour le gène *bmp* ou pour le gène *nodal* a permis de mettre à jour l'effet limitant du gène *bmp* sur la vitesse de migration, contrecarrant ainsi l'effet accélérateur du gène *nodal* sur cette dernière (Lenhart, Holtzman et al. 2013). Le jogging étant en partie achevé, le retournement du cœur peut alors survenir et entraîner la septation cardiaque.

C'est lors du retournement cardiaque et de la formation des chambres que l'on retrouve les **changements structuraux cellulaires majeurs** intervenant avant la formation des valves cardiaques. Afin de comprendre les mécanismes cellulaires liés à la formation de ces chambres cardiaques et basés sur les descriptions menées chez le poulet (Soufan, van den Berg et al. 2006) et chez la souris (Armstrong and Bischoff 2004; Meilhac, Esner et al. 2004), Auman et ses collaborateurs ont étudiés le changement structurel et l'expression génique intervenant au niveau des cellules du tube linéaire du poisson. Ainsi, en plus de l'expression des gènes sarcomériques *cmlc2* (cardiac myosin light chain 2), *vmhc* et *amhc*, la présence, dès 24hpf, du précurseur a du peptide natriurétique (*nppa*) au niveau de la portion droite du ventricule du tube cardiaque (Berdougo, Coleman et al. 2003), permet de distinguer les courbures externes (OCs) des chambres cardiaques. C'est justement au niveau de ces OCs que s'effectuent les principaux changements cellulaires. En effet, contrairement aux cellules de la courbure interne (IC) qui gardent une forme cuboïde, les cellules de l'OC ventriculaire sont capables d'augmenter leur surface tout en s'allongeant et s'aplatissant. Ces dernières, alignées les unes aux autres, sont également orientées de façon perpendiculaire à l'axe artère-veine mis en place lors de la rotation du cœur (Figure 12). Bien que peu de gènes soient décrits dans le processus de différenciation des cellules myocardiques atriales et ventriculaires, quelques-uns ont tout de fois été étudiés. Ainsi, la présence de *gata5*, *fgf8* et *Oep*, présentant un petit nombre de cellules atriales et une baisse massive de ce dernier dans le ventricule en cas de mutation, avantageraient le développement du ventricule (Reiter, Alexander et al. 1999; Yelon and Stainier 1999; Reiter, Verkade et al. 2001), tandis que l'acide rétinoïque, déjà connue pour favoriser le développement de l'atrium chez le poulet et la souris (Yutzey, Rhee et al. 1994; Xavier-Neto, Neville et al. 1999) participerait, via les expériences menées par Stainier et Fishmann après application d'un traitement exogène

contenant de l'acide rétinoïque sur des cellules myocardiques non différenciées, au développement de l'atrium. Suite à la formation des chambres cardiaques, la formation de l'AVC ainsi que des valves cardiaques peut enfin débuter.



**Figure 12: Définition des courbures interne et externe du cœur et expression myocardique du gène *nppa*.** (A) Délimitation des courbures internes (IC) et externes (OC) de la chambre ventriculaire (V). (B-C) Expression génique de *nppa* à 28hpf et 52hpf définissant les IC et OC du ventricule. Image adaptée d'Aumann et al, 2007.

Le processus cellulaire et génétique amenant à la formation des valves cardiaques au niveau de l'AVC est plus complexe que ceux observés jusqu'à présent pour la formation et

la mise en place des deux chambres cardiaques. S'appuyant sur les études menées auprès des modèles murins ou du poulet, de nombreux gènes indispensables à la formation des valves ont été découverts chez le poisson zèbre. Ainsi, la régulation du gène *nppa* par *tbx5*, membre des facteurs de transcription T-Box et déjà connu comme ayant un rôle dans la formation cardiaque chez la souris (Bruneau, Nemer et al. 2001), a été mise à jour chez l'espèce *Danio rerio* (Garrity, Childs et al. 2002). Peu de temps après, via des études menées chez le poulet, la mise en évidence de la régulation de cette T-Box par la protéine Pdlim7 a été montrée par Camarata et ses collaborateurs. La protéine Pdlim7, appartenant à la famille des protéines PDZ-LIM et dont l'expression est induite à des stades précoces du développement cardiaque (dix-huit somites), co-localise avec l'expression de *tbx5* au niveau de la plaque latérale du mésoderme (Camarata, Krcmery et al. 2010). La colocalisation génique ainsi que la capacité de *pdlim7* à se lier au domaine de trans-activation de *tbx5*, permet la régulation de cette dernière et donc de l'expression de *nppa* au niveau des OCs du ventricule et de l'atrium (Camarata, Krcmery et al. 2010). Outre la capacité à réguler le gène *nppa*, la diminution de l'expression génique *bmp4* ainsi que du gène *versican* (protéoglycane de la matrice extracellulaire) dans les poissons présentant une mutation pour *tbx5*, a également permis d'associer le rôle indispensable de *tbx5* pour la différenciation cellulaire endocardique, aboutissant à la formation des bourrelets endocardiques (Garrity, Childs et al. 2002; Camarata, Krcmery et al. 2010). La restriction de *bmp4* et *versican* aux alentours de 37hpf dans les cellules myocardiques de l'AVC (Walsh and Stainier 2001) est une des premières indications moléculaire de l'évolution du canal atrio-ventriculaire. Ce stade, correspondant à la constriction visible de la partie cardiaque située entre l'atrium et le ventricule (ou anneau cardiaque) se caractérise aussi par une conformation structurale cellulaire qui diverge en fonction du positionnement de ces dernières dans le cœur. En effet,

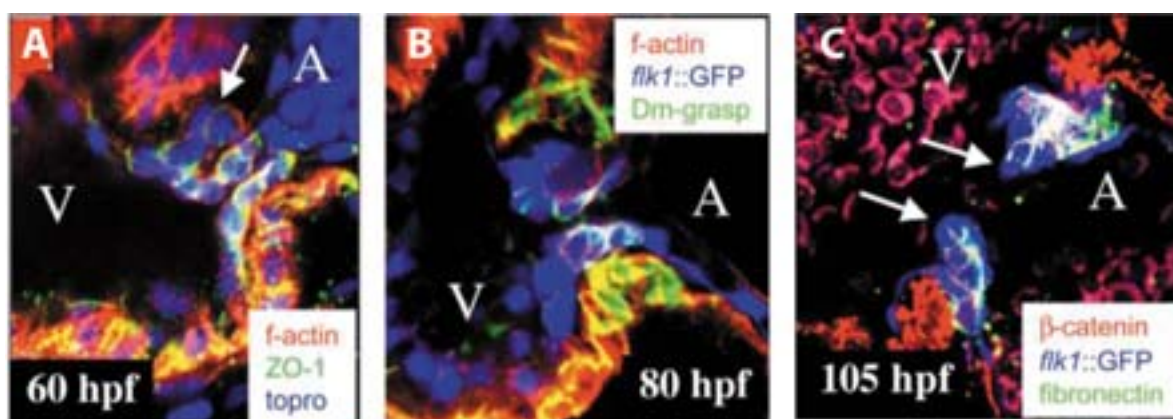
les cardiomyocytes situés dans le canal AV sont sous forme de trapèze tandis que celles localisées dans le ventricule et l'atrium sont respectivement cuboïdes et squameuses (Beis, Bartman et al. 2005; Chi, Shaw et al. 2008). Au même moment, la présence de cellules squameuses endocardiques au niveau de l'atrium et du ventricule va voir l'évolution de l'une d'entre elles, localisée en bordure des deux chambres, sous la forme cuboïde et capable d'initier l'expression du marqueur Dm-grasp, molécule d'adhésion à la surface membranaire (Beis, Bartman et al. 2005). A ce stade du développement, étant donné la prévalence de défaut de formation de l'anneau cardiaque et des bourrelets endocardiques (Hoffman 1995), la compréhension tant sur le point génétique qu'épi-génétique de ces phénomènes est indispensable. La **formation de l'anneau cardiaque**, qui démarre aux alentours de 36hpf et aboutit à la formation des bourrelets endocardiques vers 48hpf (Beis, Bartman et al. 2005), fait intervenir de nombreux gènes. Les études menées ces dernières années à ce sujet, ont permis de mettre en relation l'action de plusieurs protéines T-Box sur l'initiation du changement de conformation des cellules décrit précédemment. En effet, la découverte de l'effet régulateur de la protéine *tbx5* et du facteur de transcription *Foxn4* sur la protéine *tbx2b*, a été démontrée par Chi et ses collaborateurs. La liaison de l'enhancer *Tbx2* au facteur de transcription *Foxn4* entraîne un rôle indispensable dans l'établissement du pattern endocardique ventriculaire et atrial, ainsi que de la formation de l'AVC chez la souris (Christoffels, Burch et al. 2004; Rutenberg, Fischer et al. 2006; Kokubo, Tomita-Miyagawa et al. 2007) et chez le poisson zèbre (Chi, Shaw et al. 2008). Outre ces protéines T-Box, la découverte de la protéine transmembranaire *Tmem2*, localisée dans l'endocarde et le myocarde des souris et du poisson zèbre et agissant de façon indépendante de *tbx5*, a permis d'établir son rôle dans la régulation du gène *bmp4* mais aussi dans le mouvement

cellulaire permettant la fusion du tube cardiaque (Smith, Lagendijk et al. 2011; Totong, Schell et al. 2011).

En plus de l'expression génique retrouvée dans les cellules composant l'AVC en développement, la formation de ce dernier chez les mammifères nécessite aussi l'expression de **voies moléculaires spécifiques** telles Bmp, Wnt/ $\beta$ -catenin et Notch (Yamada, Revelli et al. 2000; Milan, Giokas et al. 2006; Kokubo, Tomita-Miyagawa et al. 2007). L'importance de ces voies de signalisation dans le développement cardiaque de la souris ou de l'homme a entraîné des recherches similaires afin de déterminer leur rôle dans la formation cardiaque du poisson. L'expression, à 24hpf, de *notch1b* au niveau de l'endocarde ventriculaire se retrouve restreinte dans l'AVC de ces derniers à 48hpf (Westin and Lardelli 1997; Walsh and Stainier 2001). Ce gène, responsable de la différenciation de l'endocarde chez la souris (Timmerman, Grego-Bessa et al. 2004) a montré, suite à un traitement en DAPT ( $\gamma$ -sécrétase capable d'activer la voie moléculaire Notch), un rôle comparable chez le poisson zèbre (Beis, Bartman et al. 2005) Non contents d'avoir démontré l'implication de la voie moléculaire Notch dans le processus de différenciation des cellules endocardiques dans l'AVC, Beis et ses collaborateurs ont également observés la régulation par *notch1b* du passage de la forme squameuse à cuboïde de ces dernières. Ce changement de forme cellulaire, ou EMT (transition épithélio-mésenchymale), représente l'étape initiale de la formation des bourrelets endocardiques (Beis, Bartman et al. 2005). Déjà connue chez les mammifères, l'EMT et la formation des valves cardiaques requièrent la présence de la voie moléculaire Calcineurin/NFATs (nuclear factor of activated T-cells) (Chang, Neilson et al. 2004). La présence de NFATs dans le myocarde via la suppression du signal VEGF (vascular endothelial growth factor) permet alors l'initiation de l'EMT (Chang, Neilson et al. 2004). Via le blocage de cette voie moléculaire, Beis et ses collaborateurs ont également pu prouver l'importance

de ces NFATs dans l'initiation de l'EMT. Une fois initiée, cette transition permet la formation de bourrelets endocardiques au niveau du canal atrio-ventriculaire.

C'est à partir de **55hpf**, lorsque les cellules endocardiques de l'AVC exprimant de façon très prononcée le marqueur Dm-grasp et constituées en une couche mince de cellules cuboïdes, que celles situées dans la partie supérieure du canal et localisées en bordure du ventricule commencent à former des extensions cellulaires dans la matrice extracellulaire, entre le myocarde et l'endocarde (Beis, Bartman et al. 2005). Ces extensions débutent au niveau des cellules de la région supérieure de l'AVC et se dirigent vers celles se situant dans le canal à proprement parler et vers celles situées aux bordures de l'atrium. La distribution de  $\beta$ -caténine (protéine responsable de l'adhésion entre cellules) tout au long de ce processus permet d'affirmer la conservation d'une organisation épithéliale des cellules cuboïdes contenues dans le canal AV endocardique (Beis, Bartman et al. 2005). Les 2 coussinets endocardiques (ECs), prémisses des valves, sont alors formés vers 96hpf et commencent leurs réarrangements morphogéniques. Ces coussinets se prolongent vers le lumen du ventricule et correspondent, au stade 105hpf, à deux couches cellulaires séparées par une couche de fibronectine contenant la matrice extracellulaire (ECM). A sept jours après fertilisation (dpf), les ECs sont transformées en valves contenant deux couches cellulaires distinctes reliées à la partie du myocarde ventriculaire par une rangée de cellules cuboïdes (Figure 13).



**Figure 13: Morphogénèse des bourrelets endocardiques chez un poisson WT.** Images confocales de l'AVC à 60hpf (A), 80hpf (B) et 105hpf (C). Embryons *Tg(flkl :EGFP)* (bleue) immunofixés pour le marqueur Dm-grasp (vert) et avec la rhodamine (rouge) ou pour la  $\beta$ -caténine (rouge (C)). (A) Les cellules en bordure d'AVC se dirigent vers la matrice extracellulaire. (C) Formation par des cellules mésenchymateuses de l'EC supérieure, à 80hpf. (C) Prolongation des coussinets endocardiques dans le lumen à 105hpf. (Image adaptée de Beis et al, 2005).

Malgré un processus bien décrit, la présence d'un épisode d'EMT similaire à celui rencontré chez les mammifères reste discutée dans le monde scientifique utilisant le modèle *Danio rerio*. En effet, Scherz et ses collaborateurs suggèrent que, suite à l'observation de l'absence totale de cellules mésenchymateuses et la présence d'un seul feuillet cellulaire au niveau de l'AVC entre 56 et 72hpf, la formation des valves cardiaques se produit via un phénomène d'invagination (Scherz, Huisken et al. 2008). Aux alentours de 60hpf, l'invagination n'est pas encore visible mais les parties inférieures et supérieures du canal entrent en contact lors de la contraction myocardique. Lors de ce contact, les cellules subissent un roulement dirigé vers l'atrium au ventricule qui permet de prévenir le retour en arrière du flux sanguin, même si les valves sont incomplètes à ce stade. C'est à partir de 72hpf que trois cellules commencent à s'invaginer dans la partie la plus profonde de l'AVC (Scherz, Huisken et al. 2008). C'est aussi dans la partie supérieure de l'AVC et aux environs de 76hpf, que la première valve devient visible et est capable de prévenir la totalité du reflux sanguin. Cette valve est formée de deux couches cellulaires, une interne et une externe,



respectivement constituées de cellules rondes et cuboïdes. La régulation de cette morphologie cellulaire via la protéine Cox2 (cyclooxygenase 2), la présence des prostaglandines PGF2 $\alpha$  et TXA2 ainsi que le phénomène de roulement cellulaire permettant la prévention du reflux sanguin grâce à la voie signalétique ErbB et TGF $\beta$ , jouent un rôle majeur dans la formation des valves cardiaques des poissons zèbres (Scherz, Huisken et al. 2008), mais aussi chez les modèles murins (Iwamoto, Yamazaki et al. 2003; Milan, Giokas et al. 2006). A 102hpf, les valves supérieures et inférieures sont formées et similaires à celles retrouvées dans les adultes.

Semblant dans l'ensemble assez bien établie, l'expression génique amenant à la formation des valves cardiaques vient de se voir complétée par la découverte, très récente, de **miRNAs**. Transcrites de l'ADN, ces petites séquences d'acide ribonucléique (ARN) simple brin ne sont pas codantes et retrouvées tout au long du processus de la formation cardiaque. Se liant par complémentarité à l'ARN messager (ARNm) cible, les miRNAs permettent la régulation de la transcription protéique nécessaire à l'expression génique dans le cœur. Ainsi, la présence de miRNAs a été faite au niveau des trois événements majeurs de la formation cardiaque, à savoir la formation du tube linéaire, l'initiation de l'EMT et la formation des bourrelets endocardiques (Fish, Wythe et al. 2011; Legendijk, Goumans et al. 2011; Kolpa, Peal et al. 2013). Premièrement observé chez la drosophile, les membres de la famille Slit, protéines sécrétrices de la matrice extracellulaire, se sont révélés être importants pour la migration cellulaire des cellules mésodermiques le long de l'axe médian de l'embryon (Qian, Liu et al. 2005). Codée par le miRNA miR-218, cette famille est également présente chez le poisson zèbre et permet aussi, via sa régulation par leurs récepteurs Roundabout (Robo), le contrôle de la migration des précurseurs cardiaques le long de l'axe embryonnaire (Fish, Wythe et al. 2011). Exprimé de façon très prononcée dès

24hpf dans les cellules cardiaques, l'utilisation de morpholinos bloquant des sites spécifiques intervenant dans la formation du miRNA, a permis de mettre en évidence la relation de miRNA-218 avec le facteur de transcription *vegfa*. Corrélée à d'autres expériences menées par cette équipe, cette relation permet d'affirmer le rôle du signal Slit/miR-218/Robo/Vegf dans le contrôle de la migration axiale des précurseurs cardiaque afin de former le tube cardiaque linéaire (Fish, Wythe et al. 2011). Outre la présence de miR-218 lors de la formation du tube cardiaque, l'expression du miRNA miR-23 a été localisée à deux jours après fertilisation, au niveau des cellules formant les ECs (Lagendijk, Goumans et al. 2011). Via la production de mutants empêchant le clivage du miRNA au niveau du cytoplasme par la protéine Dicer et la transplantation de cellules germinales mutées dans la lignée transgénique d'intérêt, Langendijk et ses collaborateurs ont pu étudier l'impact de miR-23 sur la formation valvulaire. La mutation, résultant en une augmentation de la différenciation des cellules endocardiques dans l'AVC, les auteurs ont pu mettre en évidence l'implication de miR-23 dans la restriction directe du gène *has2* (entraînant l'expression de Dm-grasp au niveau cellulaire) ainsi que dans la formation d'acide hyaluronique dans les cellules endocardiques (Lagendijk, Goumans et al. 2011). Ces découvertes ont permis d'établir le rôle de contrôle négatif de miR-23 sur l'expression de *has2* et donc de la différenciation endocardique intervenant lors de l'initiation de l'EMT. Le rôle crucial des miRNAs dans le développement cardiaque a récemment été complété par la découverte de l'expression de miR-21 au niveau de l'anneau cardiaque et dans l'endothélium constituant les valves à 48hpf (Kolpa, Peal et al. 2013). Conservé entre les mammifères et le poisson, l'expression de miR-21 est connue pour être dépendante du signal émanant de la famille des TGF $\beta$  (Davis, Hilyard et al. 2008). Régulant de façon négative le gène *pdcd4b* (programmed cell death 4b), permettant en temps normal la migration des cellules endothéliales, miR-23 a été montré

comme ayant un rôle important dans la formation de l'anneau cardiaque et l'initiation de la formation des ECs (Kolpa, Peal et al. 2013).

Bien entendu, les gènes et voies moléculaires cités ci-dessus ne représentent qu'un **petit panel du répertoire génique** pouvant être impliqué lors du développement cardiaque. Beaucoup de recherches sont actuellement menées pour déterminer le rôle des différents gènes pouvant intervenir dans l'une ou l'autre des étapes de la formation cardiaque. Les futures données nous permettront, peut-être, de déterminer de façon certaine quel phénomène, invagination ou EMT, intervient dans la formation des valves cardiaques chez le poisson zèbre.

Une fois la formation du cœur achevée, nous pouvons dès lors penser que la contraction cardiaque est en passe de s'installer. Étonnamment, et de façon à nous rappeler que son fonctionnement est unique, le cœur commence à agir de façon mécanique bien avant la fin de son établissement morphologique, soit aux alentours de 20hpf.

## 6 Dynamique cardiaque et valvulaire

Les **contractions des cardiomyocytes** débutent dès que le tube cardiaque linéaire se forme, aux alentours de 22 somites, et sont initiées au niveau du pôle veineux. Les contractions, d'abord irrégulières se coordonnent peu de temps après et interviennent à hauteur moyenne de vingt-cinq fois par minute (bpm). On parle alors de mouvements péristaltiques (Stainier, Lee et al. 1993). C'est aux alentours de 24hpf, lorsque le cœur atteint

une moyenne de 90bpm que la circulation sanguine apparaît après différenciation des cellules myéloïdes en érythrocytes par le facteur de transcription GATA1 (erythroid transcription factor 1) (Pevny, Lin et al. 1995; Iwasaki, Mizuno et al. 2003; Galloway, Wingert et al. 2005) et via un système de pompage par succion (Forouhar, Liebling et al. 2006). Pendant le retournement cardiaque (36hpf), les mouvements péristaltiques initiés par la contraction myocardique sont remplacés par une contraction séquentielle de l'atrium et du ventricule. Lors de cette transformation, un long champ électrique est observé dans la région de l'AV canal, correspondant à un délai de contraction avant la mise en place effective des contractions séquentielles (Panakova, Werdich et al. 2010). A ce moment-là, le cœur bat à une allure moyenne de 180bpm entraînant avec lui une forte circulation sanguine dans la tête et le tronc du poisson (Stainier and Fishman 1992). Le sang rentre alors par l'atrium qui s'étend et permet à l'AVC de se déplacer vers le ventricule afin de faire ressortir le flux sanguin au niveau des vaisseaux contenus dans la tête du poisson. Il est important de noter que lors de la contraction, et contrairement à l'AVC, seuls l'atrium et le ventricule contractent. Au début de la diastole, qui correspond à la phase de relaxation cardiaque, le diamètre de l'orifice atrio-ventriculaire augmente et permet l'éjection du sang de l'atrium au ventricule. Une fois l'éjection faite, l'AVC se relâche et recule vers l'atrium. Au début de la systole, correspondant à la phase contractile de la chambre cardiaque atriale ou ventriculaire, l'orifice se contracte mais de façon incomplète, ne permettant donc pas, à ce stade, la prévention du reflux sanguin, se caractérisant par un retour du sang contenu dans le ventricule vers l'atrium (Vidéo n°1). Ce reflux sanguin, généré par la contrainte morphologique imposée par la dimension de l'AVC et les mécanismes de fermeture de cet orifice, ne permet pas une circulation sanguine unidirectionnelle pendant la systole.

A **72hpf**, les coussinets valvulaires permettent d'obturer la quasi-totalité de la partie atriale de l'AVC, au moment où le ventricule contracte. Cette obturation intervient de façon synchronisée avec la systole ventriculaire, phénomène accompagné de l'entrée du sang dans la chambre atriale. Lorsque que le ventricule se relâche, les coussinets s'éloignent de l'atrium et permettent le passage du flux sanguin de l'atrium vers le ventricule. Les coussinets valvulaires reviennent à leur position initiale sans pour autant entrer en contact l'une de l'autre, ce qui permet au flux contenu dans le ventricule de reverser vers l'atrium. Bien que la présence de flux reversant à ce stade soit visible, il est nécessaire de retenir que le cœur est beaucoup plus efficace dans la prévention de ce phénomène qu'à 48hpf. En effet, la quantité de flux reversant est fortement réduite à 72hpf (Scherz, Huisken et al. 2008).

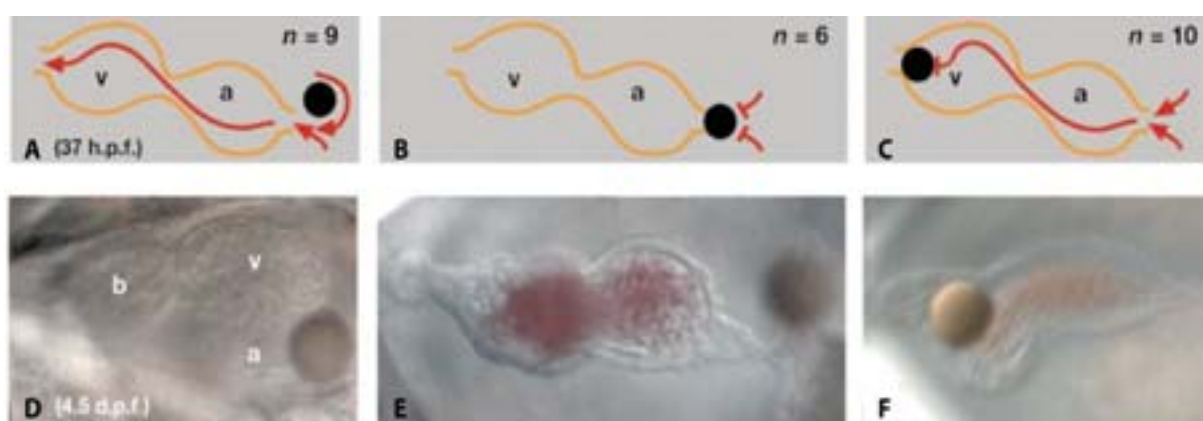
C'est à **102hpf** (Scherz, Huisken et al. 2008) que les valves sont entièrement fonctionnelles. Durant la diastole ventriculaire, les valves s'éloignent de l'atrium pour permettre le passage du sang vers le ventricule mais lors du repositionnement de ces dernières en fin de diastole, un contact s'effectue entre elles, empêchant ainsi un quelconque retour sanguin vers l'atrium.

Durant tout le processus de formation cardiaque, la mise en place des contractions cardiaques ainsi que du flux sanguin avant l'aboutissement de la formation cardiaque a interrogé la communauté scientifique sur le rôle des forces hémodynamiques lors de ce développement.

## 7 Implication des forces hémodynamiques

Bien que la contraction cardiaque soit indispensable à la formation des valves, **l'implication des forces hémodynamiques** intervenant au niveau du cœur a longuement été débattue dans le milieu scientifique. Ce débat est de nos jours bien avancé chez le poisson où de nombreuses études récentes ont permis de clarifier le rôle du flux dans le processus de formation cardiaque (Vermot, Forouhar et al. 2009; Peralta, Steed et al. 2013). C'est pourquoi, pendant plus de vingt ans, des études *in vitro* ont été menées afin de contrer l'idée reçue selon laquelle les cellules endocardiques ne serviraient que de revêtement cardiaque. En effet, des expériences mettant en culture des cellules épithéliales face à un flux ont démontré la capacité de ces dernières à sentir le flux et transmettre des stimuli mécaniques nécessaire à leur réarrangement morphologique et génique (Davis, Kavanaugh et al. 1995; Garcia-Cardena, Comander et al. 2001). Ainsi, la mise en culture de cellules endothéliales humaines et animales sous un flux laminaire bien défini a démontré une incroyable capacité de ces dernières à réorganiser leur morphologie via la modification de leur cytosquelette d'actine, entraînant alors un allongement des cellules dans le sens du flux imposé (Topper and Gimbrone 1999). D'autres études, menées chez le poulet, ont été menées afin de déterminer le rôle des forces hémodynamiques sur la cardiogénèse (Icardo 1989; Icardo 1989). Lors de cette expérience, des coupes microscopiques effectuées suite à l'isolement et à la fixation de cœurs embryonnaires à trois ou cinq jours après fertilisation, ont permis l'observation en microscopie électronique des diverses régions cardiaques. Les zones cellulaires ayant subi un flux plus important (AVC, bordure atriale) suite à l'impact de la vélocité des cellules sanguines, présentent un alignement des cellules en fonction du sens du flux (Icardo 1989; Icardo 1989).

Ces données montrent bien, de façon *in vitro*, l'impact des forces hémodynamiques, notamment du **shear stress**, correspondant aux forces de frictions générées entre le flux et les cellules endothéliales et comprenant les paramètres de viscosité et vitesse fluide, sur la cardiogénèse. Afin d'étudier ces forces de façon *in vivo* sur le développement cardiaque du poisson zèbre, Hove et ses collaborateurs ont eu l'idée d'utiliser des billes en verre de 50µm permettant de bloquer le flux à l'entrée ou à la sortie (Figure 14 B-C) du tube cardiaque, à 37hpf. Contrairement à des poissons contrôles, où le flux circule correctement dans le cœur (Figure 14 A), les poissons subissant un blocage au niveau du tractus afférent et donc une baisse de pression intracardiaque, et ceux subissant un blocage au niveau du tractus efférent, avec une augmentation de pression intracardiaque, sont incapables de former des chambres cardiaques ni des valves fonctionnelles. Il en va de même lors de l'utilisation du mutant *silent heart (sih)*, poisson ne présentant aucune contraction cardiaque et une absence totale de flux (Bartman, Walsh et al. 2004).



**Figure 14: Observation du blocage du flux sur la valvulogénèse.** (A et D) Poissons présentant une circulation sanguine intracardiaque normale et des valves fonctionnelles à 4,5dpf. (B et E) Poissons présentant un blocage fluide induit par la présence d'une bille (rond noir ou beige) au niveau du tractus afférent. Les valves ne sont pas formées. (C et F) Poissons présentant un blocage fluide au niveau du tractus efférent ainsi qu'une absence de valves fonctionnelles. (Image adaptée de Hove et al, 2003).

Ces données révèlent ainsi **l'importance des forces hémodynamiques** comme étant un facteur épi-génétique essentiel à la cardiogénèse. Grâce à ces études et à l'arrivée des techniques de micro-arrays, de nombreux gènes ont pu être identifiés de façon *in vitro* lors de la réponse au flux. Ainsi la majorité des gènes cités précédemment et jouant un rôle dans la cardiogénèse ont été démontrés comme étant capable de répondre au flux. En relation avec ces découvertes, la mise en évidence de la réponse au flux de *notch1b* (Walsh and Stainier 2001; Milan, Giokas et al. 2006), *bmp4* (Chen, van Eeden et al. 1997), *Rac1* (Liu, Collins et al. 2013) a pu être menée. La régulation de certains miRNAs, dont miR-21, a récemment été démontrée par Banjo et ses collaborateurs (Banjo, Grajcarek et al. 2013). D'autres gènes, tels *endothelin 1 (end1)* connu chez l'homme (Sharefkin, Diamond et al. 1991) ou la souris (Harrison, Ziegler et al. 1998) ou encore *Vcam-1* (vascular cell adhesion protein 1) (Deverse, Sandhu et al. 2013) ont également montré une modification de leur expression génique en fonction du flux.

En effet, de nombreuses études mettant en lien la présence d'un flux laminaire et l'expression de gènes répondant à ce dernier ont été menées, mais peu d'entre elles ont mis en évidence la présence de gènes régulés par un flux turbulent après une exposition prolongée à ce dernier. L'expérience de Dekker et ses collaborateurs, en 2002, a permis de répondre à cette question. En exposant, pendant 7 jours, des cellules endothéliales humaines à un flux laminaire pulsatile unidirectionnel présentant une variation de shear stress de 8 à 32 dynes/cm<sup>2</sup>, plusieurs gènes dépendant du flux ont pu être mis en évidence. Parmi ces derniers, deux gènes sont fortement augmenté en présence de ce flux ; le facteur de transcription *lung Krüppel-like factor* ou *KLF2*, et le cytochrome p450 1B1 (Dekker, van Soest et al. 2002).



Contrairement au cytochrome p450 1B1, le gène *KLF2* est exprimé dans les cellules endothéliales uniquement en présence d'un flux, ce qui en fait, en plus de son expression aortique humaine et son expression uniquement endothéliale, un très bon gène d'étude pour la valvulogénèse.

## 8 La famille des Krüppel-like factor ; le cas *klf2a*

Découverts chez les mammifères, les ***Krüppel-like factor*** (*KLF*) sont une famille de gènes codant pour des protéines régulatrices de transcription, jouant un rôle dans la différenciation des différents sets cellulaires. Seize *KLFs* sont à ce jour connus chez l'homme et la souris et possèdent une structure bien conservée (Oates, Pratt et al. 2001). En effet, les *krüppel-like factor* possèdent un domaine C-terminal très gardé et contenant trois motifs en doigt de zinc reliés par un « linker » permettant la liaison spécifique de l'ADN à un élément riche en GC (Ruppert, Kinzler et al. 1988; Xu, Horvath et al. 1991). Contrairement au domaine C-terminal, le domaine N-terminal est variable et quelques-uns sont caractérisés par la présence d'un activateur et/ou répresseur de transcription (Garrett-Sinha, Eberspaecher et al. 1996; Yet, McA'Nulty et al. 1998), ou encore par un site de phosphorylation ou d'acétylation contribuant à leur propre régulation (Ouyang, Chen et al. 1998; Zhang and Bieker 1998).

De nombreuses divergences ont été démontrées entre les membres *KLFs* des mammifères et du *Danio rerio*. En effet, chez le poisson zèbre et parmi les cinq membres de la famille des *KLFs* isolés, la région située après les trois domaines en doigts de zinc, diverge énormément mais permet tout de même l'association de certains membres entre poisson

zèbre et mammifères. Ainsi, *klf2a*, *klf2b*, *klf4* et *klf12* sont respectivement retrouvés comme étant des orthologues des gènes *KLF2* et *KLF4* et *KLF12* chez les mammifères. Seul *klfd* n'est pas retrouvé dans le génome des mammifères, indiquant une probable appartenance à un orthologue ancestral (Oates, Pratt et al. 2001).

Parmi tous ces membres, un nous intéresse plus que les autres. En effet, ***KLF2*** a été observé comme étant indispensable au bon développement cardiaque chez la souris (Chiplunkar, Lung et al. 2013). Les auteurs ont pu mettre en évidence l'expression de ce gène dans les cellules endothéliales du cœur embryonnaire de souris, et ceci dans des régions où le stress suscité par le flux (shear stress) est fortement présent, comme dans l'AVC (Sharefkin, Diamond et al.). En absence de *KLF2*, une accumulation de cellules endothéliales s'effectue au niveau de l'AVC. Contrairement aux souris sauvages (WT), les cellules ne se présentent plus sous la forme d'un seul feuillet cellulaire squameux, mais sous de nombreuses cellules rondes ayant un cytoplasme fuyant vers le lumen du canal, montrant alors un rôle essentiel de *KLF2* dans l'EMT (Chiplunkar, Lung et al. 2013).

Bien que très peu étudié dans le cœur du poisson zèbre, des études ont démontré la présence du gène ***klf2a*** dans les cellules endocardiques au cours du développement cardiaque. En effet, le gène *klf2a*, en présence de flux, est exprimé au niveau du canal atrio-ventriculaire et du tractus efférent (outflow tract ou OT). En l'absence de flux, ce gène n'est plus exprimé dans l'AVC, menant la formation des valves cardiaques impossible (Vermot, Forouhar et al. 2009).

Ces données, qui laissent penser à un rôle indispensable des forces hémodynamiques et du gène *klf2a* lors de la valvulogénèse chez le poisson zèbre, ont été la base de mes recherches durant cette thèse.

## 9 Projet de la thèse

Suite à cette introduction, nous avons bien compris que les maladies cardiaques congénitales, et plus particulièrement les valvulopathies, représentent un phénomène important de notre société actuelle. Malgré les grandes avancées en termes de médecine et de recherche, beaucoup d'études restent à mener au niveau génétique pour pouvoir comprendre et soigner, par un autre moyen que chirurgical, ces maladies. La mise en évidence de l'importance des forces hémodynamiques lors de la cardiogénèse et l'impact du gène *KLF2* dans la valvulogénèse nous a amené à étudier le rôle de ce dernier lors de la formation des valves cardiaques chez le modèle *Danio rerio*.

Afin de comprendre l'implication du gène *klf2a* chez le poisson zèbre lors de la formation des valves cardiaques, j'ai premièrement mis en évidence de façon *in vivo* et via la création de lignées transgéniques possédant le promoteur *klf2a*, la dépendance au flux reversant de l'expression de ce gène dans les cellules endocardiques. Suite à cette dépendance, la question de mécanodétecteurs responsables de la détection du flux et de la régulation de l'expression du gène *klf2a* au niveau des cellules endothéliales s'est posée. L'observation de cils primaires et de canaux membranaires (*TRPV4*) et intracellulaires (*TRPP2*) dans les cellules endocardiques a permis de mieux appréhender cette question mais a également soulevé

d'autres possibilités de voies de signalisation moléculaires que celles déjà exploitées au niveau intracellulaire.

# RÉSULTATS

---

# Chapitre 1

Constructions et caractérisation de  
lignées transgéniques

*Tg(klf2a :h2b-eGFP)*

# Chapitre 1 : « Constructions et caractérisation de lignées transgéniques Tg(klf2a :h2b-eGFP) »

## 1 Introduction

Les maladies cardiaques congénitales sont un vrai phénomène de société. Représentant plus de huit naissances sur mille, leur taux augmente avec l'âge et plusieurs types peuvent être décrits. Parmi ces derniers, les valvulopathies, et en particulier l'insuffisance mitrale, représentent près de 2% de ces maladies (Insee 2006). Les avancées de la recherche scientifique en relation directe avec ces maladies ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes régulés par les forces hémodynamiques, comme *KLF2* chez les mammifères, et qui interviennent de façon indispensable dans la cardiogénèse, notamment lors de la valvulogénèse (Dekker, van Soest et al. 2002; Vermot, Forouhar et al. 2009). Suite aux difficultés rencontrées pour l'étude cardiaque *in vivo* chez les mammifères, l'émergence du nouveau modèle animal *Danio rerio*, présentant des caractéristiques permettant de suivre la formation du cœur de façon *in vivo*, en font un fabuleux modèle pour l'étude du développement cardiaque et de la valvulogénèse. Afin de poursuivre les études menées au sujet de l'importance des forces hémodynamiques pour l'expression du gène *klf2a* permettant la formation de valves cardiaques fonctionnelles chez le poisson zèbre, j'ai, durant la première partie de ma thèse, terminé la construction de lignées transgéniques exprimant le promoteur *klf2a* avec Stéphane Roth, ingénieur au laboratoire, et caractérisé ces dernières vis-à-vis de diverses modifications contractiles et/ou sanguines dans le but de créer un outil permettant l'étude de l'expression endocardique du gène *klf2a* face à diverses conditions de shear stress.

## 2 La lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* ; un bon outil d'étude pour l'expression endocardique du gène *klf2a*

Quatre lignées transgéniques *Tg(klf2a: h2b-eGFP)* ont été construites dans le vecteur pT2K-CAGGSY. Ces constructions, qui font intervenir les sites Tol2 permettant la transposition de l'ADN dans le génome du poisson zèbre (Kawakami, Shima et al. 2000), diffèrent par la taille du promoteur *klf2a* inséré, à savoir, 1kb, 4kb, 6kb et 9kb. Le promoteur du gène *klf2a* est situé en amont d'une fusion *h2b-eGFP* permettant la localisation de la GFP au niveau des noyaux cellulaires (Cf. matériel et méthodes ; Figure 15). Ces lignées ont été croisées avec la lignée *Tg(flt\_enhancer: td-tomato)* qui permet de mieux visualiser l'endocarde du poisson zèbre en rouge (*tomato*). L'injection de ces vecteurs dans des embryons AB (*WT*) au stade une cellule nous a permis de trouver des fondateurs et d'établir des lignées stables à partir de la seconde génération de poissons (F2).

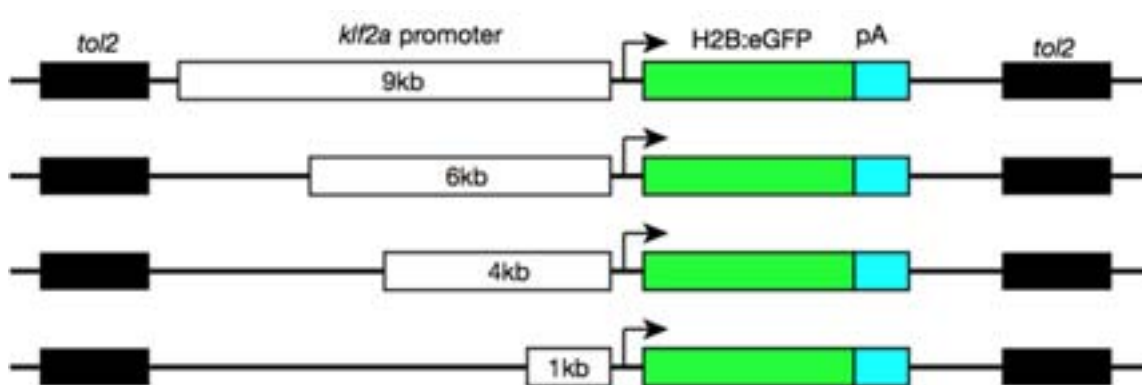


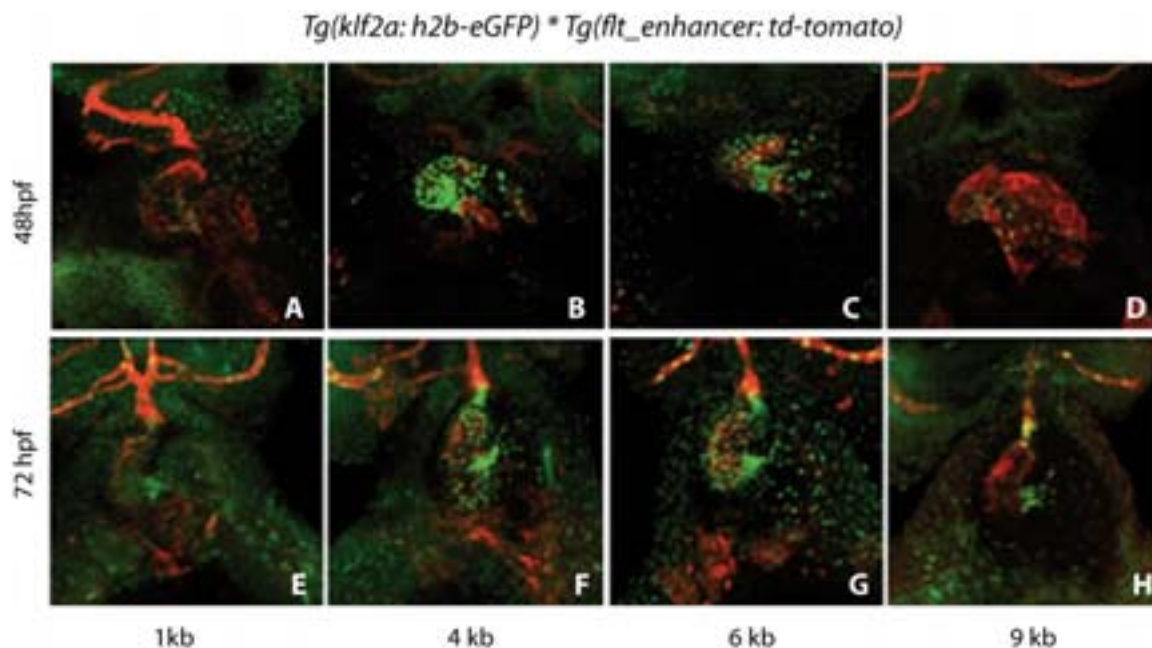
Figure 15: Création des lignées transgéniques *Tg(klf2a : h2b-eGFP)*. Différentes tailles du promoteur *klf2a* sont insérées entre les sites Tol2 et en amont d'une fusion *h2b-eGFP*.

La caractérisation de ces lignées montre d'une façon générale une expression *gfp* positive dans le canal atrioventriculaire ainsi que dans l'outflow tract (OT) des poissons



analysés. Cependant, des différences notables ont été visualisées en fonction de la lignée transgénique observée. En effet, les images obtenues au microscope confocal SP2 pour les lignées contenant le promoteur *klf2a\_1kb : h2b-eGFP* et *klf2a\_4kb : h2b-eGFP*, révèlent la présence de la *gfp* au niveau de la tête et des vaisseaux des poissons observés, ce qui n'est pas le cas dans les lignées 6kb et 9kb.

L'expression de la *gfp* chez les poissons de la lignée 1 kb est quasi absente dans l'AVC à 48hpf et faible à 72hpf tandis que ceux de la lignée 4 kb présentent à 48hpf une expression très importante dans l'AVC mais aussi au niveau du ventricule. A 72hpf, cette expression devient bien localisée au niveau du canal AV mais aussi au niveau de l'OT, malgré la présence d'une expression persistante dans le ventricule (Figure 16 A-B; E-F). Les poissons de la lignée 6kb et 9kb présentent un intérêt plus grand pour notre étude. En effet, la lignée 6kb montre, à 48hpf, un faible bruit de fond, une forte expression *gfp* AVC spécifique ainsi que quelques cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb :h2b-eGFP* dans le ventricule (Figure 16 D et G). A 72hpf, cette expression est également retrouvée dans l'OT. La lignée *Tg(klf2a\_9kb: h2b-eGFP)* diffère de celle précédemment décrite à 48hpf car peu de cellules exprimant le marqueur fluorescent *gfp* sont retrouvées dans le cœur du poisson zèbre. Cependant, il est intéressant de noter son expression *gfp* hautement spécifique de l'AVC et de l'OT à 72hpf ainsi que son absence de bruit de fond (Figure 16 D et H).



**Figure 16: Expression du promoteur *klf2a* dans le cœur embryonnaire à 48hpf et 72hpf des diverses lignées transgéniques créées au laboratoire.** Expression spécifique du marqueur fluorescent *gfp* dans l'AVC de la lignée *klf2a\_6kb* et dans l'AVC et le ventricule de la lignée *klf2a\_4kb* à 48hpf (B-C). Peu de fluorescence *gfp* est observée dans l'AVC des lignées *klf2a\_1kb* et 9kb à 48hpf (A et D). Présence d'une expression très spécifique de l'AVC et de l'OT dans les lignées *klf2a\_4kb*, 6kb et 9kb (F-H) à 72hpf mais présence d'une expression *gfp* non spécifique et persistante dans la tête des poissons des lignées *klf2a\_1kb* et 4kb à 72hpf (E-F).

Bien que la lignée *klf2a\_9kb* soit extrêmement spécifique de l'AVC à 72hpf et ne présente aucun de bruit de fond dans les poissons observés, mes expériences, principalement menées à 48hpf, ont été effectuées sur la lignée contenant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp*. En effet, la facilité de sélection à la loupe binoculaire fluorescente des poissons ayant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* ainsi que sa spécificité d'expression dans l'AVC à 48hpf, font de cette lignée un bon outil pour l'étude endocardique du gène *klf2a*.

### 3 *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* récapitule l'expression endogène de *klf2a*

Suite à l'obtention des lignées transgéniques exprimant le promoteur *klf2a* et le choix de la lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* comme lignée de référence pour mes futures expériences, la première manipulation effectuée a été de vérifier si le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* récapitulait l'expression endogène du gène *klf2a* dans le cœur du poisson zèbre. Pour ce faire, j'ai croisé la lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* entre elle et observé l'expression de la fluorescence *gfp* à 48hpf. Les images prises au microscope confocal SP2 révèlent la présence d'une forte fluorescence au niveau de l'AVC et de l'OT du cœur du poisson.

Afin de déterminer si cette expression fluorescente correspond à l'expression endogène de *klf2a*, j'ai observé des images de cœur à 56hpf effectuées auparavant (Vermot, Forouhar et al. 2009), utilisant la technique d'hybridation *in situ* (ISH), permettant de mettre en évidence l'ARN ou l'ADN de *klf2a*, en utilisant une sonde complémentaire biotinylée. La comparaison de la fluorescence obtenue à 48hpf avec la lignée transgénique générée au laboratoire corrèle parfaitement avec le marquage ISH obtenu à 56hpf pour *klf2a*. En effet, nous pouvons apercevoir avec les deux techniques une expression positive dans l'AVC et l'OT (Figure 17).

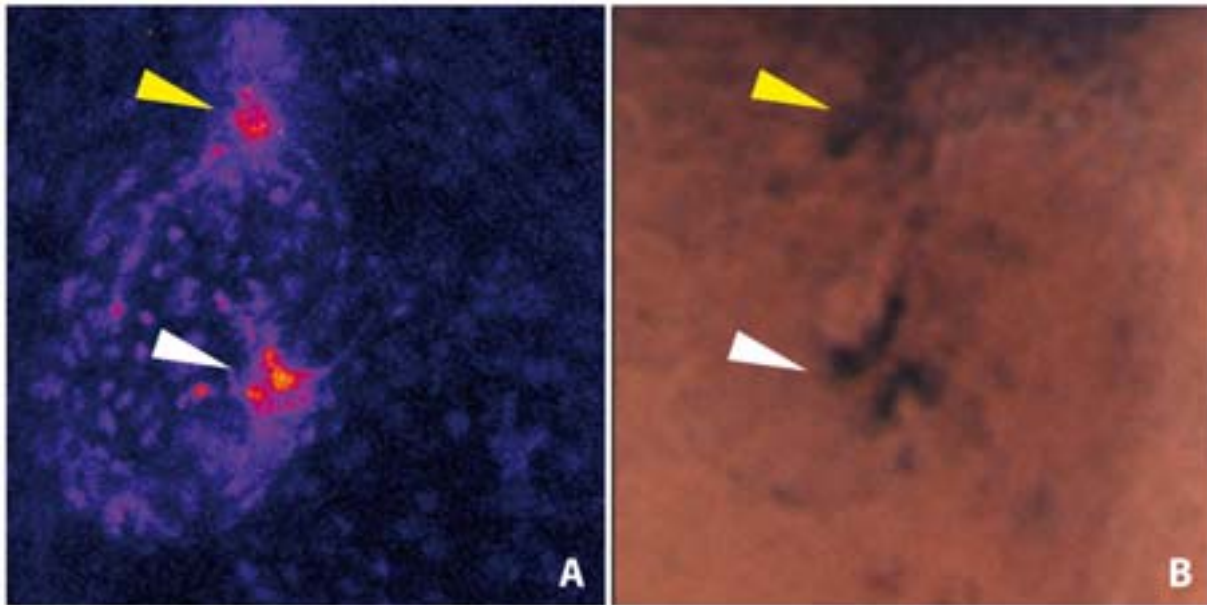


Figure 17: La lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP)* récapitule l'expression endogène de *klf2a* à 48hpf. Le promoteur fluorescent de *klf2a* est exprimé dans l'AVC (flèche blanche) et l'OT (flèche jaune) des poissons imagés à 48hpf (A) et récapitule l'expression endogène du gène *klf2a* observée par hybridation *in situ* (B, image adaptée de Vermot et al, 2009).

La corrélation entre l'expression fluorescente du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* et l'expression révélée en ISH, nous permet de dire que la lignée *Tg(klf2a:h2b-eGFP)* reprend l'expression endogène de *klf2a* et nous permettra, dans les expériences futures, de certifier que l'expression *gfp* observée sera représentative du gène *klf2a* dans le cœur de *Danio rerio*.

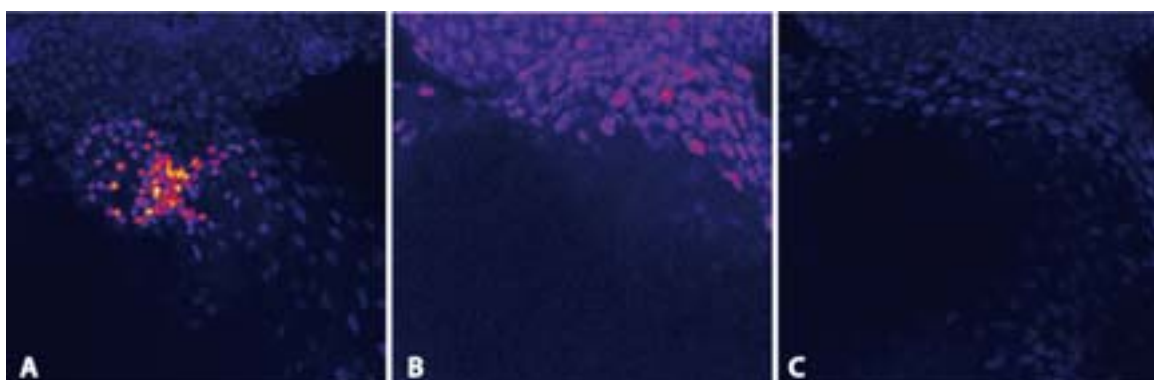
#### 4 Dépendance au flux de la lignée *Tg(klf2a:h2b-eGFP)*

Les expériences menées par d'autres chercheurs sur la dépendance au flux du gène *KLF2* (Dekker, van Soest et al. 2002) ainsi que la mise en évidence de l'importance de *klf2a* dans la formation des valves cardiaques en présence d'un shear stress chez *Danio rerio* (Vermot, Forouhar et al. 2009) nous ont amené à tester la dépendance de la lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP)* en réponse au flux.

#### 4.1 La lignée *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)* semble répondre au flux

Afin d'observer si la lignée transgénique *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)* répond au flux, j'ai dans un premier temps injecté un morpholino (Cf. matériel et méthodes), petite séquence nucléotidique capable de se lier par complémentarité à l'ARN d'un gène cible, empêchant ainsi sa traduction en protéine, puis dans un second temps observé l'expression du transgène *klf2a* dans la lignée *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP : sih+)* (Cf. matériel et méthodes). Ces deux outils amènent tous deux à des poissons présentant un œdème péricardique important, la présence d'un cœur non retourné ainsi qu'une absence totale de flux et de contractions cardiaques.

L'observation du transgène *klf2a* dans les morphants et mutants montre une absence totale de fluorescence *gfp* dans l'endocarde, à 48hpf (Figure 18), par rapport aux poissons contrôles. L'absence totale de fluorescence nous permet de supposer que la lignée *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)* répond au flux.



**Figure 18 : La lignée transgénique *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)* semble répondre au flux, à 48hpf. (A) Expression du transgène *klf2a* dans des poissons contrôles. (B) L'expression du transgène *klf2a* est absente dans les poissons injectés avec le morpholino *tnnt2* ainsi que dans les mutants de la lignée *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP : sih+)*.**

Afin de confirmer cette hypothèse, et basées sur la formule du shear stress

$$\mathbf{T} = \mu \frac{du(y)}{dy} = \mu \frac{U}{a},$$

où  $\mu$  représente la viscosité fluide en  $\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ,  $U$  la vitesse et  $a$  le rayon de la région d'intérêt, deux autres techniques nous permettent de vérifier l'implication des forces hémodynamiques sur l'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp*.

Via l'utilisation de morpholinos, j'ai fait varier la vitesse de la contraction cardiaque puis dans un second temps la viscosité sanguine et observé les effets induits sur l'expression génique du transgène *klf2a* au niveau du canal atrioventriculaire. Toutes les expériences menées dans cette sous partie sont effectuées à partir du croisement des lignées *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP)\* Tg(fli-NLS-mCherry) roy<sup>+/-</sup>* ensuite injectées avec les divers morpholinos au stade une cellule, selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthode, ou traités en lidocaïne à 0,02% de 30hpf à 48hpf à 28,5°C. La lignée *Tg(fli-NLS-mCherry)* permet de marquer les noyaux cellulaires retrouvés dans l'endocarde en rouge grâce au marqueur fluorescent *mCherry* tandis que la lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP)* permet, comme décrit précédemment, de marquer les noyaux cellulaires endocardiques exprimant le transgène sous la dépendance du promoteur *klf2a* en vert (*gfp*). Les poissons traités ou injectés ont été observés au microscope SP2 à 48hpf.

## 4.2 Modification de la vélocité de la contraction cardiaque et expression de

### *klf2a*

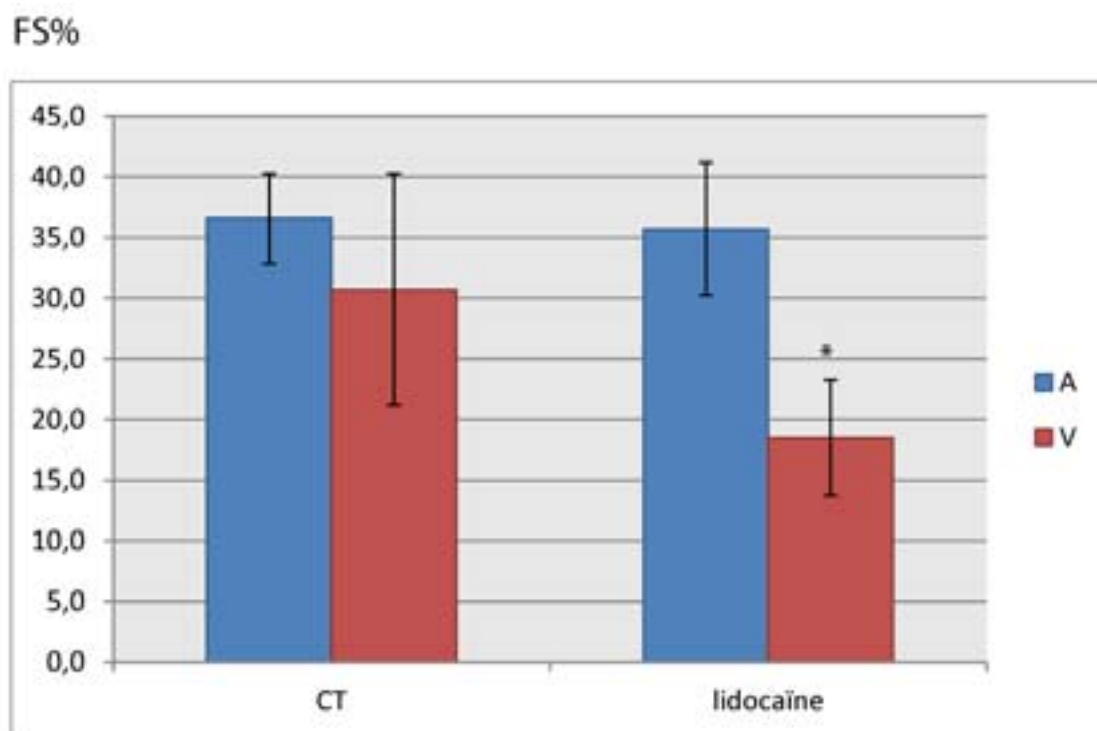
Afin d'observer l'effet d'une modification de la vélocité sur l'expression du gène *klf2a*, j'ai premièrement testé le traitement en lidocaïne, qui est un bloqueur de canal sodique (Cummins 2007). Ce traitement permet de diminuer le nombre de contractions cardiaques de moitié ainsi que le shear stress exercé au niveau du cœur, notamment au niveau de l'AVC.

Les **poissons traités en lidocaïne** sont d'apparence normale, le cœur est correctement positionné et la formation des deux chambres cardiaque est bien effectuée. Les seules différences sont caractérisées par la présence d'un petit œdème péricardique et par le nombre de battements par minute (bpm) qui diminue de moitié chez les poissons ayant été traités en lidocaïne. Le nombre de battements par minute passe de près de 188bpm chez des poissons non traités (contrôles) à 76 bpm chez les poissons traités, qui présentent, en relation directe avec le bpm, une circulation sanguine et un flux reversant diminué (Annexe 1, vidéo n°2 et n°3).

Le nombre de battements cardiaques étant réduit, j'ai voulu observer si l'efficacité de la contraction atriale et ventriculaire était affectée par le traitement en lidocaïne. Pour ce faire j'ai estimé l'efficacité de contraction de chaque chambre cardiaque en mesurant le fractional shortening selon la formule suivante :

$$FS\% = (\text{diamètre diastole} - \text{diamètre systole} / \text{diamètre diastole}) * 100$$

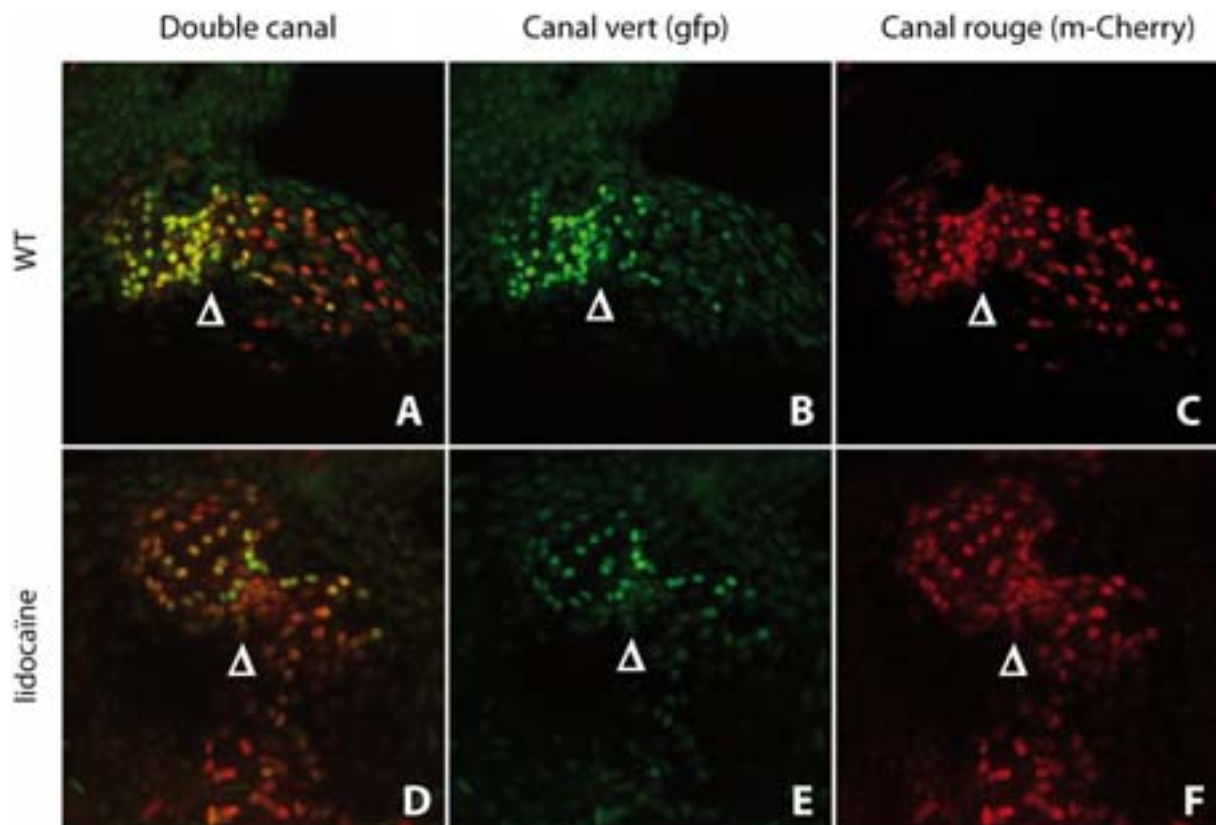
L'**efficacité de contraction** des poissons traités en lidocaïne présente une baisse de l'efficacité contractile dans l'atrium et le ventricule, mais seule cette dernière est significativement réduite (baisse de 40%) par rapport aux poissons non traités (Graphe 1; Annexe 1, vidéo n°2 et n°3).



**Graphe 1: Efficacité de la contraction cardiaque après traitement en lidocaïne à 0,02%. L'efficacité de contraction du ventricule(V) des poissons traités est significativement réduite par rapport aux poissons contrôles (CT), tandis que l'atrium (A) n'est pas affecté, à 48hpf. CT, n=10 ; lidocaïne n=4. \*P<0.05.**

L'observation des images obtenues au microscope confocal SP2 semble montrer une baisse importante de l'expression du promoteur *klf2a* dans l'AVC et le ventricule des poissons traités en lidocaïne 0,02%. La fluorescence *mCherry* rapportant le nombre total de cellules dans l'endocarde des poissons traités est similaire à celle observée dans les poissons non traités (Figure 19).

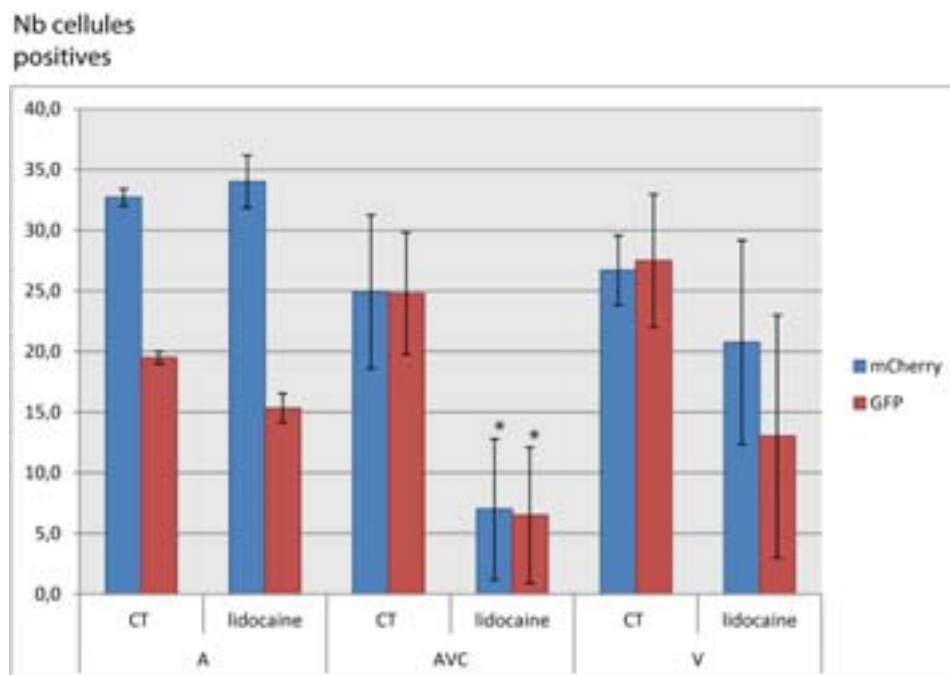




**Figure 19: Visualisation de l'expression du gène *klf2a* et du nombre total de cellules dans le cœur des poissons traités en lidocaïne 0,02%. Projection maximale des cœurs à 48hpf. Nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (D-E) L'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC des poissons traités est diminuée par rapport aux poissons WT. (C et F) Visualisation du nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde.**

Suite à cette observation, j'ai compté le nombre de cellules totales dans l'endocarde ainsi que le nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP*. Afin d'obtenir des comptages correspondant au maximum à la réalité, j'ai effectué une projection maximale des images obtenues avec le microscope confocal SP2 et effectué, via le logiciel imageJ, un seuillage de 70 pour la *gfp* et de 50 pour la *mCherry* afin de prendre en compte les cellules exprimant de façon assez importante le gène *klf2a* ou le marqueur fluorescent *mCherry* (cf matériel et méthodes).

Le **comptage cellulaire** révèle, à 48hpf, une baisse significative de plus de 70% du nombre de cellules totales (*mCherry*) ainsi que du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* dans le canal atrioventriculaire par rapport aux poissons contrôles. Une baisse importante mais non significative de ces deux paramètres (respectivement 23% et 52%) est également dénombrée dans le ventricule (Graphe 2), tandis que l'atrium présente un nombre similaire de cellules *gfp* et *mCherry* par rapport aux poissons non injectés.

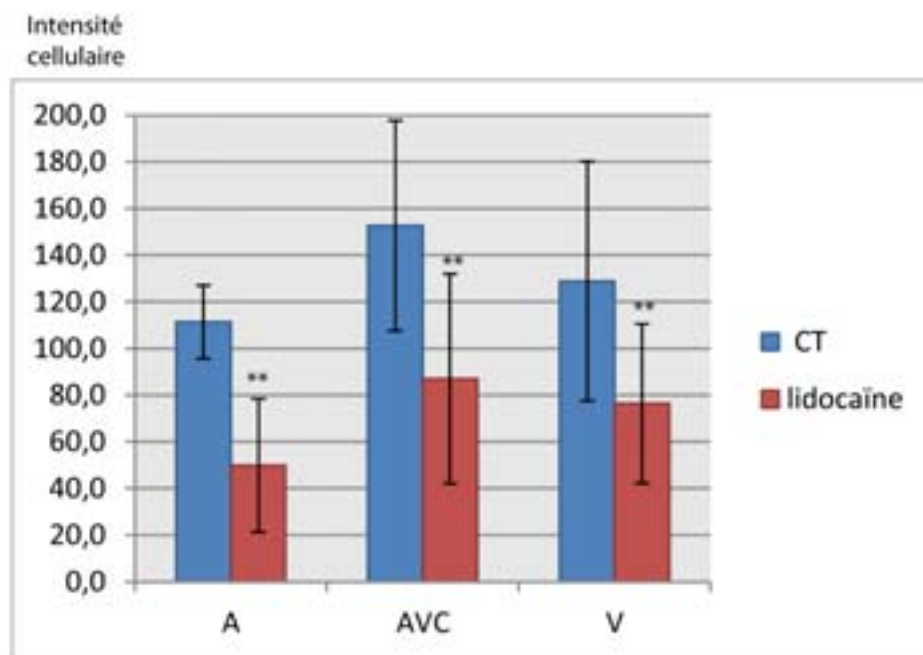


**Graphe 2: Comptage cellulaire après traitement des poissons en lidocaïne 0,02%. Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) et du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_klf2a:h2b-eGFP* (GFP) dans l'AVC des poissons traités par rapport aux poissons contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10 ; lidocaïne n=4. \*P<0.05 ; \*\*P<0.001.**

La baisse du nombre de cellules exprimant le marqueur *gfp* ne signifiant pas forcément que l'intensité des cellules exprimant le transgène nucléaire *klf2a* soit diminuée, j'ai décidé de mesurer cette dernière pour observer si le traitement lidocaïne entraîne, en

plus d'une baisse du nombre de cellules dans l'AVC, une diminution de l'intensité d'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* dans cette région. Pour ce faire, j'ai eu recours aux logiciels imageJ et phylocell qui, après détermination de la zone atriale, ventriculaire et de la zone correspondant au canal atrioventriculaire puis l'application d'un seuillage de 70, permet de mesurer l'intensité des pixels pour chaque cellule contenue dans la zone prédéfinie (cf matériel et méthodes).

La **mesure d'intensité** du transgène *klf2a* nucléaire contenue dans les cellules de l'atrium, de l'AVC et du ventricule est significativement diminuée de, respectivement, 55%, 45% et 39% par rapport aux poissons contrôles (Graphe 3).



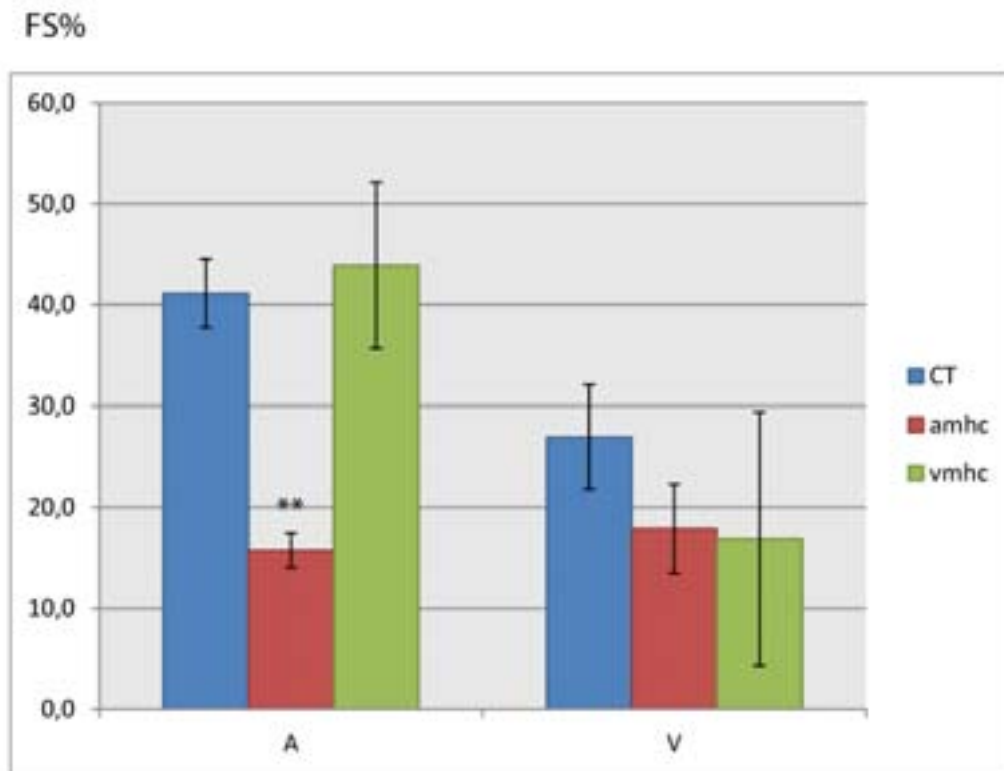
**Grappe 3: L'intensité du transgène *klf2a* nucléaire est diminuée chez les poissons traités en lidocaïne 0,02%. Baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A), de l'AVC et du ventricule (V) des poissons traités par rapport aux poissons contrôles à 48hpf. CT n=10 ; lidocaïne n=4. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.**

Mises en communs, ces données nous démontrent d'ores et déjà l'implication du flux sur l'expression génique de *klf2a* au niveau du canal AV.

Dans le but de confirmer ces données préliminaires et d'observer si les contractions cardiaques jouent un rôle primordial dans l'expression de *klf2a*, j'ai voulu, dans une première série d'expériences, modifier la contraction cardiaque en affectant soit la contraction atriale, soit la contraction ventriculaire. Pour cela, j'ai utilisé les morpholinos *amhc* et *vmhc*.

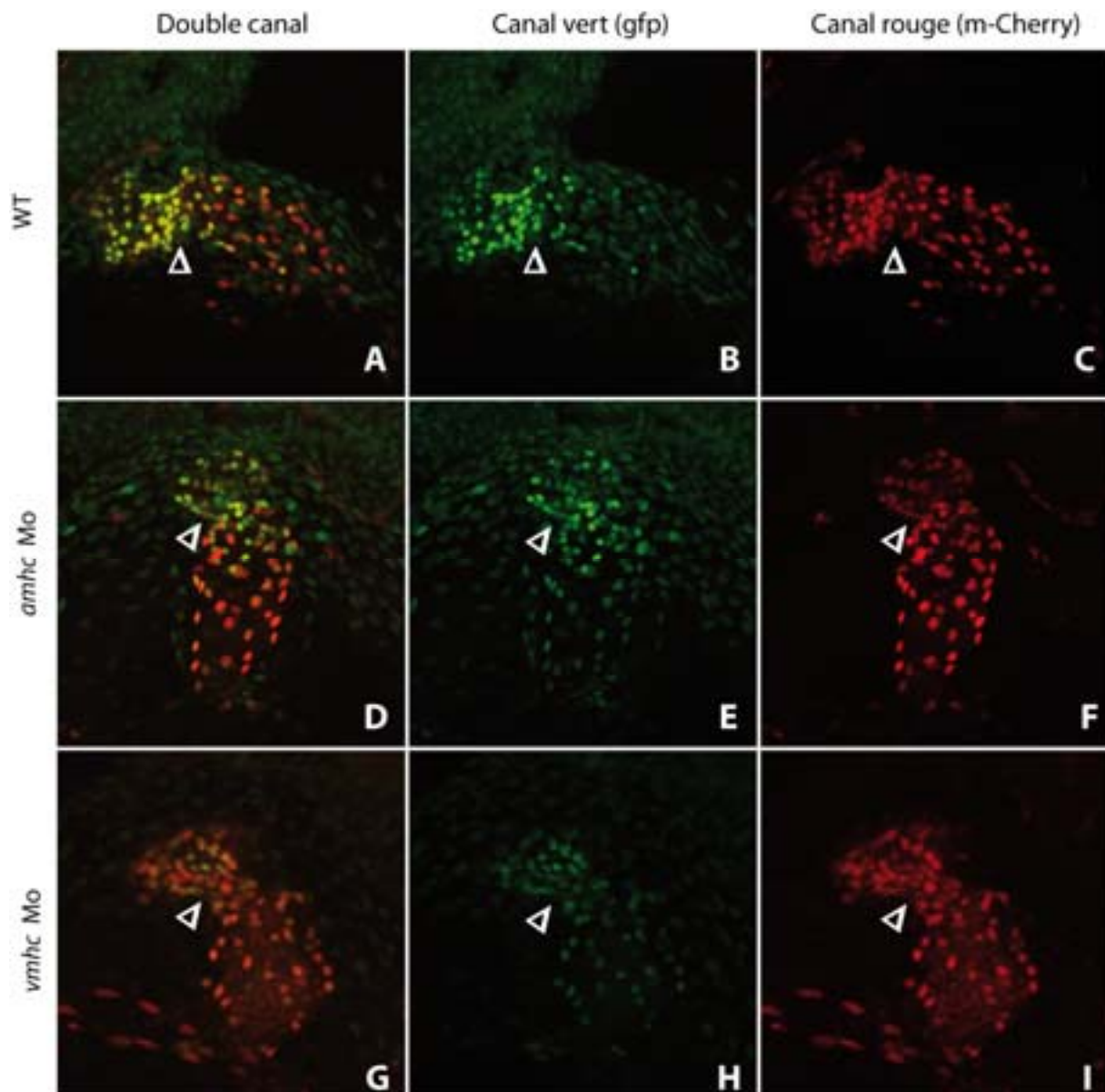
Le **phénotype** des poissons injectés avec le morpholino *atrial myosin heavy chain*, ou *amhc*, se caractérise par un œdème péricardique, un cœur mal retourné ainsi qu'une circulation sanguine fortement réduite et un flux reversant diminué. L'atrium est dilaté et le ventricule semble plus petit que dans les poissons contrôles mais le nombre de battements par minute est identique à celui des poissons non injectés (155bpm). Contrairement aux morphants *amhc*, les poissons injectés avec le morpholino *vmhc* ou *ventricular myosine heavy chain*, présentent un retournement cardiaque normal ainsi qu'une circulation sanguine correcte. Un léger œdème est visible et le nombre de battements cardiaques par minute est similaire à celui des poissons non injectés (175 bpm). Cependant, le ventricule montre un défaut de contraction par rapport aux contrôles, ce qui n'est pas le cas de l'atrium.

La mesure du **fractional shortening** nous permet de voir une baisse significative de l'efficacité de contraction de l'atrium chez les morphants *amhc* ainsi qu'une baisse importante mais non significative de la contraction du ventricule dans les morphants *vmhc* en comparaison aux poissons contrôles (Graphe 4; Annexe 1, vidéo n° 2, n°4 et n°5).



**Grphe 4: Efficacité de contraction cardiaque des morphants *amhc* et *vmhc* à 48hpf.** En comparaison aux poissons contrôles (CT), l'efficacité de contraction de l'atrium est significativement diminuée dans les poissons injectés avec *amhcMo*. Une baisse de la contraction est également visible mais non significative dans le ventricule des morphants *vmhcMO* et *amhcMo*. CT n=10 ; *amhc* et *vmhc* n=7. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

Les quantifications obtenues suggèrent une légère baisse du signal *gfp* dans l'AVC des poissons injectés avec *amhc* ainsi qu'une diminution plus importante de cette dernière dans les morphants *vmhc* (Figure 20 A-B, D-E, G-H). Le nombre total de cellules dans l'endocarde semble être légèrement modifié au niveau de l'AVC dans les morphants par rapport aux poissons contrôles (Figure 20 C, F, I).

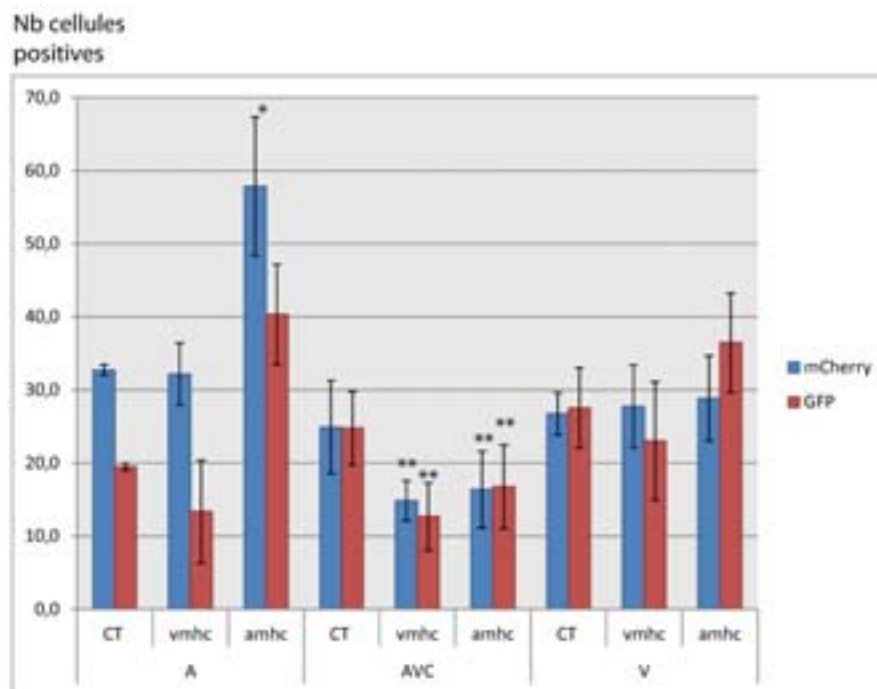


**Figure 20: Visualisation de l'expression du gène *klf2a* et du nombre total de cellules dans le cœur de morphants *amhc* et *vmhc*.** Projection maximale des cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (D-E ; G-H) L'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC des morphants *amhc* et *vmhc* est largement diminuée par rapport aux poissons WT. (C, F, I) Le nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde est diminué dans l'AVC des morphants.

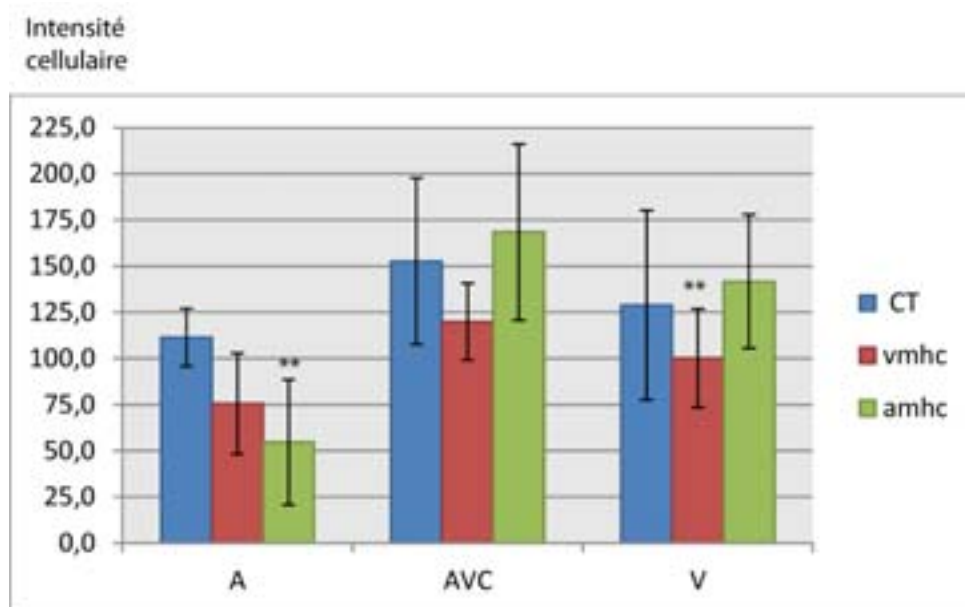
Le **comptage cellulaire** effectué selon la méthode décrite dans la partie matériel et méthode, nous indique une baisse significative du nombre total de cellules ainsi que du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'AVC des morphants *vmhc* (respectivement une

baisse de 40% et 15%) et *amhc* (baisse respective de 55% et 7%) par rapport aux contrôles. Bien qu'une baisse du signal *gfp* dans l'atrium des morphants *vmhc* soit visible, cette dernière, en comparaison avec les poissons non traités, n'est pas significative, au même titre que l'augmentation du nombre total de cellules et du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'atrium des morphants *amhc* (Graphe 5). Le ventricule des poissons injectés ne présente pas de variations importantes de ces deux paramètres par rapport à celui des poissons contrôles, à 48hpf.

La **mesure de l'intensité** du transgène *klf2a* au niveau des noyaux cellulaires révèle une baisse significative de plus de 50% de l'intensité d'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* dans l'atrium des morphants *amhc* et de près de 20% dans le ventricule des morphants *vmhc* en comparaison aux contrôles, mais l'intensité *gfp* reste similaire aux poissons contrôles dans l'AVC des deux morphants (Graphe 6).



Graph 5: Comptage cellulaire après injection des poissons avec les morpholinos *vmhc* et *amhc*. Baisse significative du nombre total de cellules (mCherry) et du nombre de cellules exprimant *klf2a* (GFP) dans l'AVC des morphants. Augmentation significative du nombre total de cellules dans l'atrium des morphants *amhc* par rapport aux contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10 ; *amhc*Mo et *vmhc*Mo n=7\*P<0,05 ; \*\*P<0,001.



Graph 6: L'intensité du transgène *klf2a* nucléaire est diminuée dans l'atrium et le ventricule des morphants *vmhc* et *amhc*. Observation d'une baisse significative de l'intensité nucléaire *klf2a* dans les cellules de l'atrium (A) des morphants *amhc* et dans le ventricule (V) des morphants *vmhc* par rapport aux poissons contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10 ; *amhc* Mo et *vmhc*Mo n=7. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

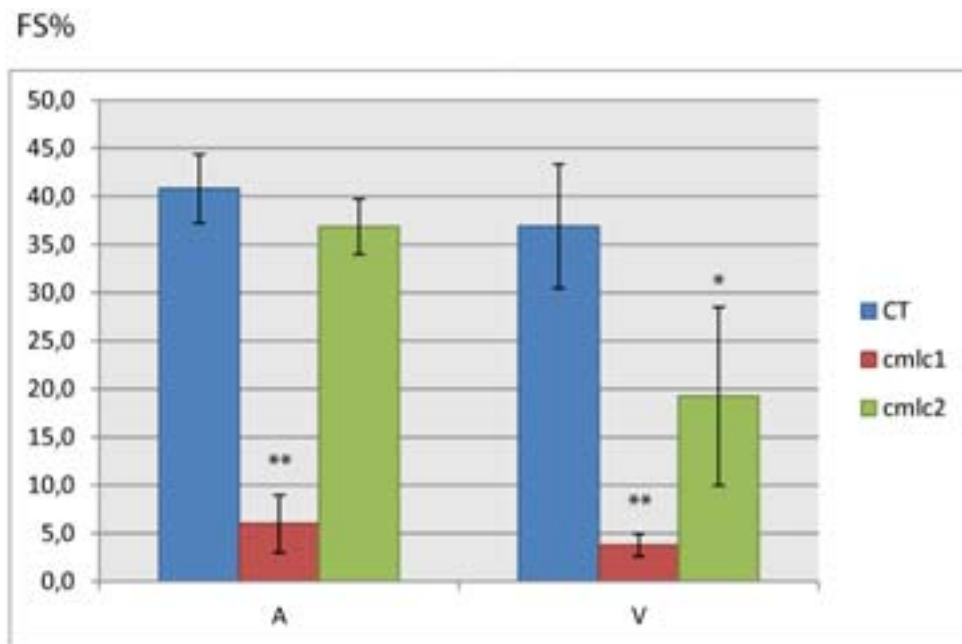


Les données obtenues démontrent que la modification de l'efficacité de contraction d'une des deux chambres cardiaque entraîne, via la réduction du flux sanguin, une baisse significative du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'AVC sans pour autant occasionner une diminution de l'intensité d'expression de cette dernière.

Dans la continuité de ces expériences, j'ai voulu jouer sur la vélocité en affectant ce coup-ci la contraction des deux chambres cardiaques. Pour cela j'ai utilisé deux morpholinos touchant la chaîne légère de la myosine, protéine indispensable à la contraction.

Les poissons injectés avec le morpholino *cardiac myosin light chain 1 (cmlc1)* présentent, à 48hpf, un phénotype assez dramatique par rapport aux poissons contrôles. En effet, ces morphants montrent un œdème péricardique assez important ainsi qu'un cœur peu retourné, accompagné d'une circulation sanguine quasi inexistante et un flux reversant réduit. Un atrium dilaté ainsi qu'une contraction minime des deux chambres cardiaques est également visible. L'injection du morpholino *cardiac myosin light chain 2 (cmlc2)* se révèle être moins sévère que celui de *cmlc1*. Malgré l'absence de retournement cardiaque, les poissons présentent une faible contraction du cœur ainsi qu'un faible flux sanguin. L'atrium est quant à lui toujours dilaté et l'œdème toujours présent par rapport aux poissons contrôles.

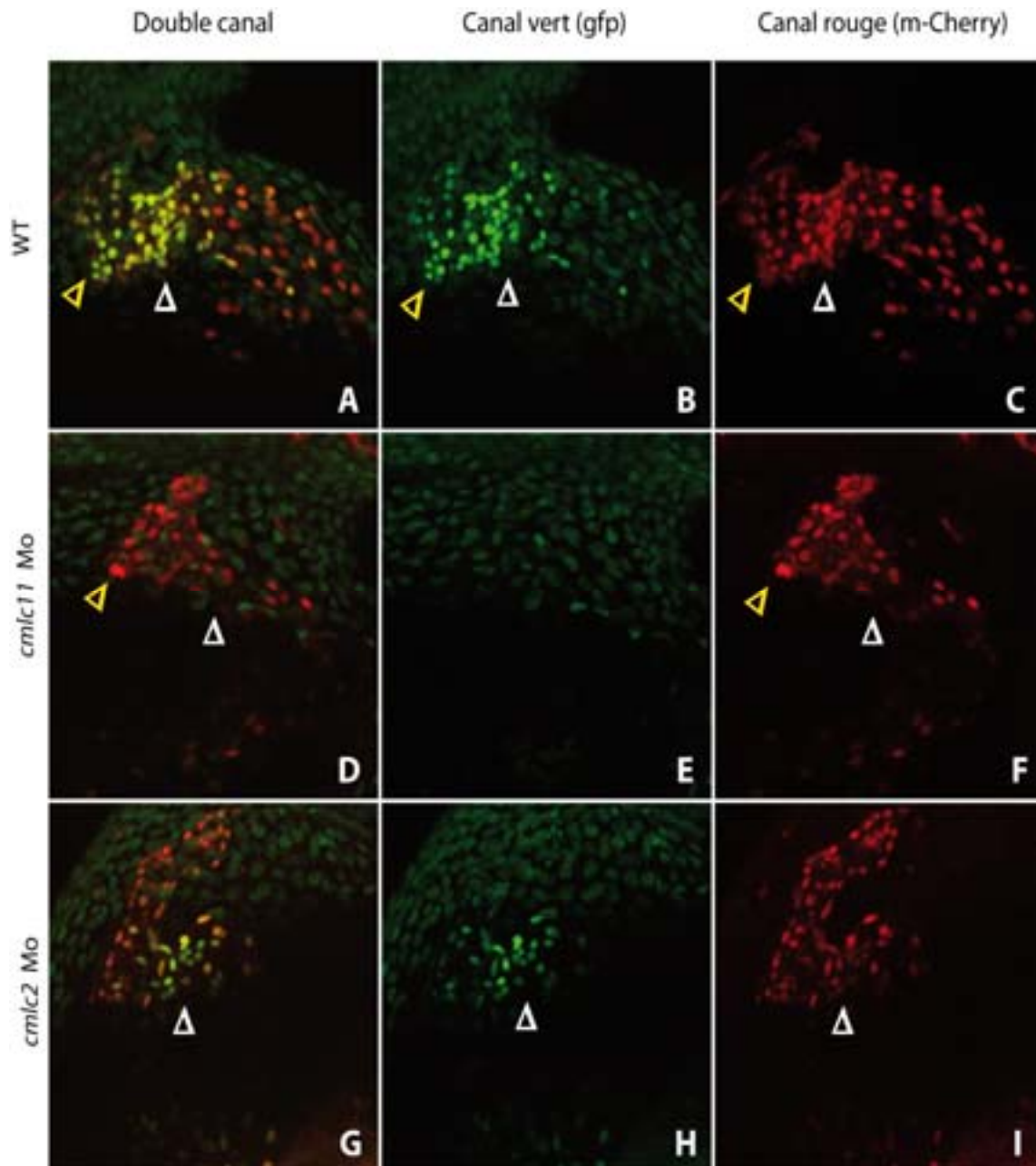
La mesure de l'**efficacité de contraction** à 48hpf des poissons injectés nous permet d'observer une baisse significative de l'efficacité de contraction de l'atrium (5% contre 40% chez les poissons contrôles (CT)) et du ventricule (4% contre 36% chez les CT) chez les morphants *cmlc1* ainsi qu'une baisse significative de l'efficacité de contraction du ventricule chez les poissons injectés avec *cmlc2* par rapport aux poissons non injectés (19% contre 36%) (Graphe 7; Annexe3, vidéo n°2, n°6 et n°7).



**Graph 7: L'efficacité de contraction est diminuée chez les morphants *cmlc1* et *cmlc2* à 48hpf.**  
 L'efficacité de contraction de l'atrium (A) et du ventricule (V) des poissons injectés avec le morpholino *cmlc1* est significativement réduite par rapport aux poissons contrôles (CT). L'efficacité de contraction du ventricule est significativement diminuée chez les morphants *cmlc2* en comparaison aux contrôles, à 48hpf. CT n=10, *cmlc1*Mo n=5, *cmlc2*Mo n=7. \*P<0,05 ; \*\*P< 0,01.

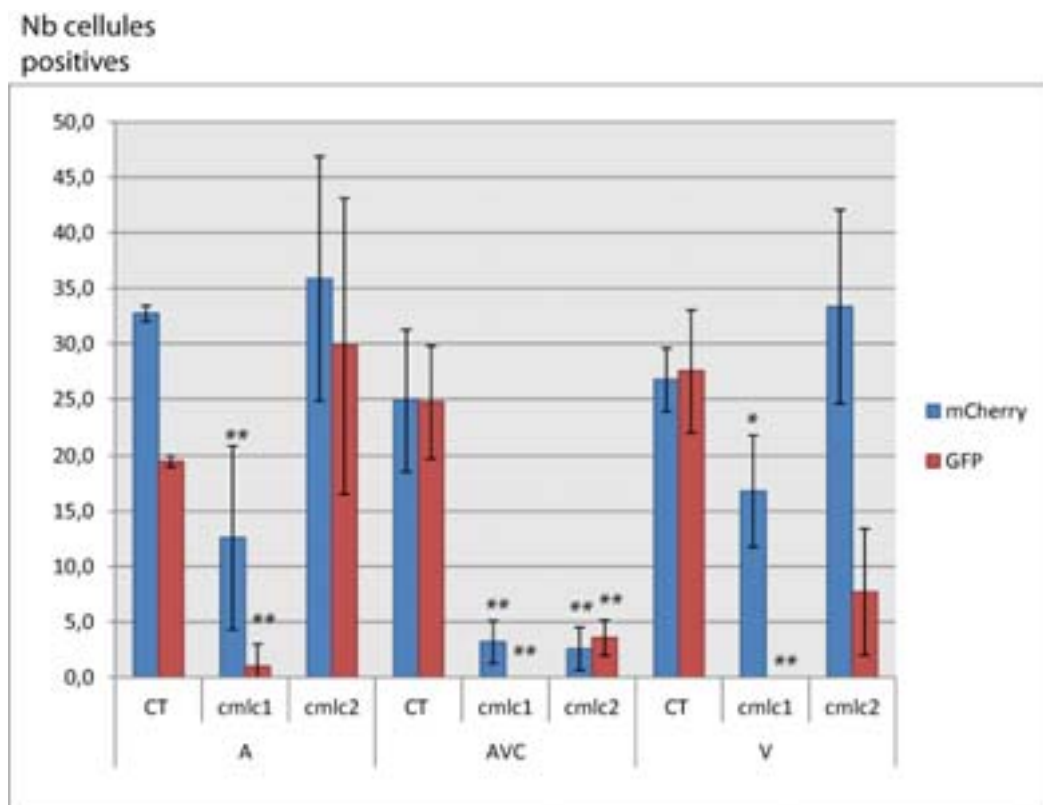
Les images obtenues à 48hpf ainsi que les comptages cellulaires effectués sur les morphants *cmlc1* permettent d'observer une baisse significative majeure de la population cellulaire *gfp* et *mCherry* positive au niveau des deux chambres cardiaques ainsi qu'au niveau du canal atrioventriculaire, par rapport aux poissons contrôles (Figure 21, Graphe8). Le nombre total de cellules retrouvé dans l'atrium, l'AVC et le ventricule est respectivement réduit de 61%, 88% et 39% chez les morphants *cmlc1* et diminué de 92% dans l'AVC des morphants *cmlc2*, en comparaison avec les poissons contrôles. De façon inattendue, le nombre total de cellules dans l'endocarde est augmentée de 6% dans l'atrium et de 22% dans le ventricule de ces derniers (Graphe 8). Le signal *gfp* relatant l'expression du gène *klf2a* dans l'endocarde est quasiment nul dans les morphants *cmlc1* (atrium, AVC et ventricule) (Graphe 8) et se retrouve largement réduit dans l'AVC et le ventricule des

poissons injectés avec *cmlc2* (baisse respective de 84% et 74%). Il est à noter une hausse du nombre de cellules (+10) exprimant *klf2a* dans l'atrium de ces derniers, par rapport aux poissons contrôles.



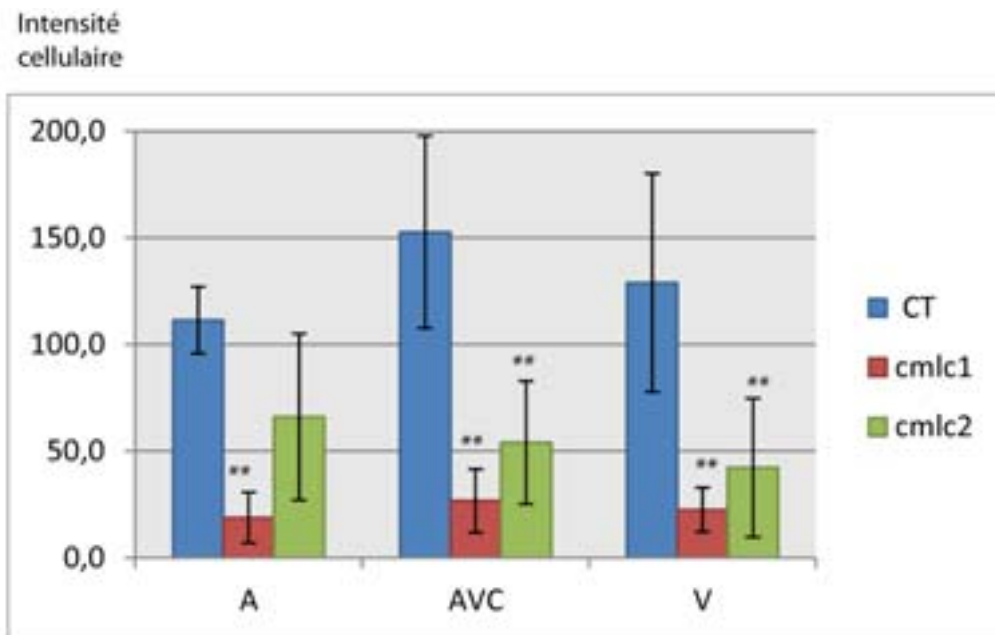
**Figure 21: Visualisation de l'expression génique *klf2a* et du nombre total de cellules dans l'endocarde des morphants *cmlc1* et *cmlc2* à 48hpf. Projection maximale des cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (D-E) L'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC et du ventricule (triangle jaune) des morphants *cmlc1* est quasiment nulle par rapport aux poissons WT. (G-H) Les morphants *cmlc2* présentent une baisse importante des cellules exprimant *klf2a* dans l'AVC par rapports aux WT. (C,**

F, I) Le nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde est diminué dans l'AVC et l'atrium des morphants, en comparaison aux contrôles.



**Graphe 8: Comptage cellulaire après injection des poissons avec les morpholinos *cmlc1* et *cmlc2*.** Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) et du nombre de cellules exprimant *klf2a* (GFP) dans l'AVC, le ventricule (V) et l'atrium (A) des morphants *cmlc1* ainsi que dans l'AVC des morphants *cmlc2* par rapport aux poissons contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10, *cmlc1*Mo n=5, *cmlc2*Mo n=7.\*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

L'intensité cellulaire mesurée corrèle avec les comptages cellulaires et montrent une baisse significative de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire de plus de 83% dans l'atrium, 85% dans l'AVC et 82% dans le ventricule des morphants *cmlc1* et une baisse de près de 40%, 65% (P<0.001) et 88% (P<0.001) dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons injectés avec *cmlc2*Mo (Graphe 9), en comparaison aux CT.

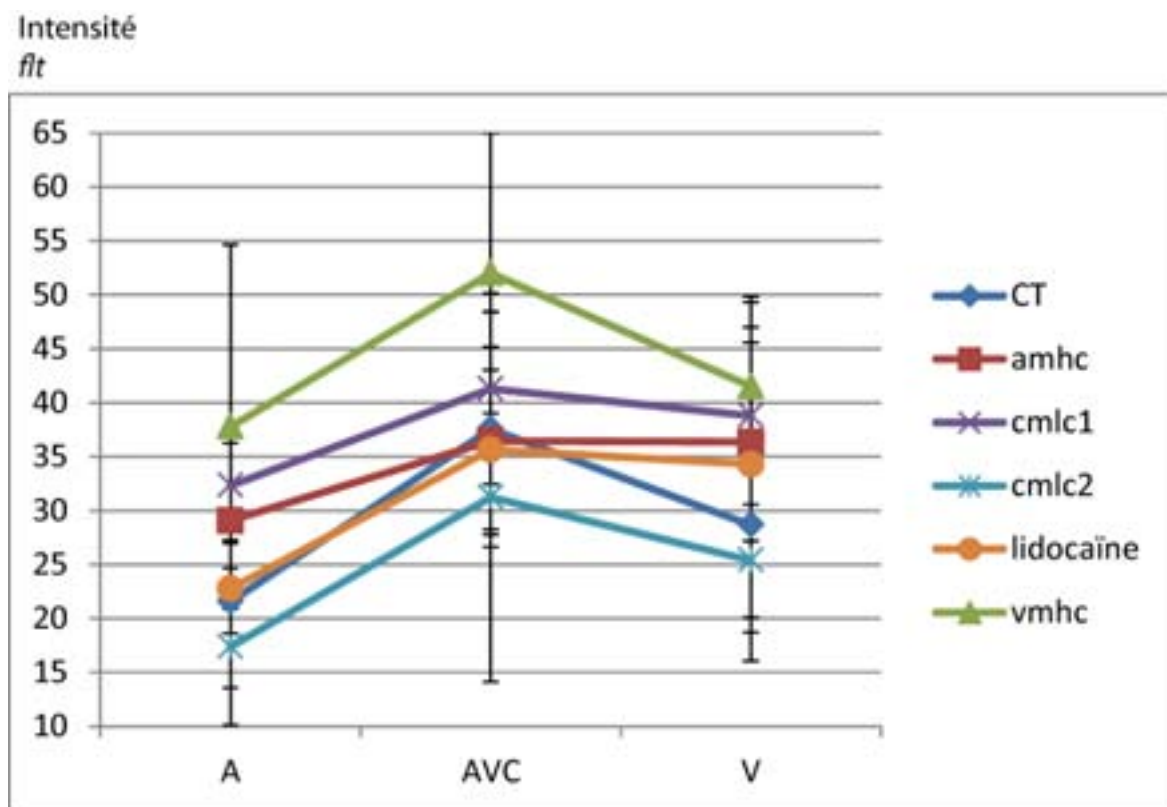


**Grphe 9: L'intensité du transgène nucléaire *klf2a* est diminuée chez les morphants *cmlc1* et *cmlc2*, à 48hpf. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A), de l'AVC et du ventricule (V) des poissons injectés avec les morpholinos *cmlc1* et *cmlc2* par rapport aux poissons contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10, *cmlcMo1* n=5, *cmlc2Mo* n=7. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.**

Dans le but d'observer si les variations, engendrées par l'utilisation des morpholinos précédemment décrits, au niveau de l'expression du gène *klf2a* et de son intensité d'expression nucléaire ne sont pas liées à des défauts plus précoces du développement de l'endocarde des embryons (pattern), j'ai effectué une analyse supplémentaire. En utilisant la lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* croisée avec la lignée *Tg(flt1\_enhancer: td-tomato)*, j'ai pu déterminer l'éventuelle présence de variation dans le développement cardiaque des embryons en réalisant des injections identiques à celles menées auparavant.

La mesure de l'intensité de la *tomato*, marquant la totalité de l'endocarde, a été réalisée en utilisant le logiciel imageJ après définition des zones d'intérêt (atrium, AVC et ventricule) (Cf. matériel et méthodes). Le graphique présenté ci-dessous (**Grphe 10**) ne montre aucune différence de mesure d'intensité *tomato* dans l'AVC et le ventricule des

morphants testés par rapport aux contrôles. Seule une petite différence est visible dans l'atrium des morphants *cmlc1* en comparaison aux poissons non injectés, résultat pouvant peut-être se justifier par le phénotype dramatique induit par ce morpholino.



**Graph 10:** L'intensité du transgène *flt* mesurée dans l'endocarde des morphants est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf. L'AVC et le ventricule (V) des poissons injectés ne présentent pas de différence d'intensité *flt* avec les poissons contrôles (CT). Le morpholino *cmlc1* montre une différence significative de l'intensité *flt* dans l'atrium par rapport aux CT. \*P<0,05.

Mises toutes ensemble, ces données montrent qu'une baisse importante de l'expression génique du transgène *klf2a* ainsi que de son intensité dans l'AVC des poissons présentant un flux sanguin absent (*tnnt2*), réduit (lidocaïne) ainsi qu'une contraction atriale et/ou ventriculaire réduite (*amhc*, *vmhc*, *cmlc1* et *cmlc2*), est présente. Ces résultats nous permettent de conclure que l'expression du transgène *klf2a* dans l'endocarde du poisson

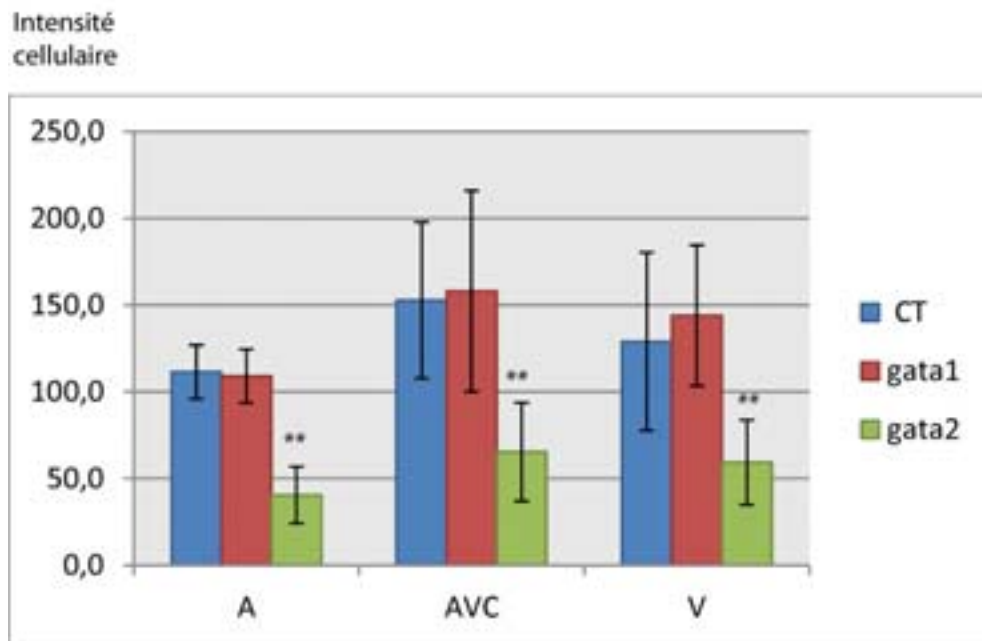
zèbre est dépendante de l'activité cardiaque, en particulier de son activité mécanique correspondant aux contractions du cœur. De plus nous pouvons certifier que ces variations, à 48hpf, ne sont pas dues à un effet du pattern embryonnaire.

### 4.3 Modification de la viscosité cardiaque et expression de *klf2a*

Dans le but de confirmer que le flux, et en particulier le flux reversant, détient un rôle indispensable à l'instauration de l'expression de *klf2a* et à son maintien dans l'endocarde, j'ai joué sur un second paramètre permettant de faire varier le shear stress ; la viscosité sanguine. Pour ce faire, j'ai utilisé deux morpholinos précédemment décrit (Vermot, Forouhar et al. 2009) et observé les effets induit par ces derniers sur l'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp*. L'injection des morpholinos *gata1* (*GATA binding protein 1* ou *Erythroid transcription factor 1*) et *gata2* (*GATA binding protein 2* ou *Erythroid transcription factor 2*) possèdent un phénotype similaire à ceux des poissons contrôles. La seule différence notable provient de la diminution de la viscosité sanguine de 90% chez les morphants *gata1* et 70% chez les morphants *gata2*. Le flux reversant est également augmenté chez les poissons injectés avec *gata1* (55% contre 35% chez les contrôles) et réduit chez les morphants *gata2* (30% contre 35% chez les contrôles) (Vermot, Forouhar et al. 2009). Cette caractéristique va nous permettre de mesurer son impact sur l'expression du transgène *klf2a*.

Le **fractional shortening** mesuré à 48hpf pour ces deux morphants ne présente aucun défaut de contraction de l'atrium ou du ventricule par rapport aux poissons contrôles. Ces données sont importantes car elles vont nous permettre de dissocier les contractions

cardiaques du flux et observer l'implication du flux reversant sur l'expression génique de *klf2a* (Graphe 11 ; Annexe3, vidéo n°2, n°8 et n°9).

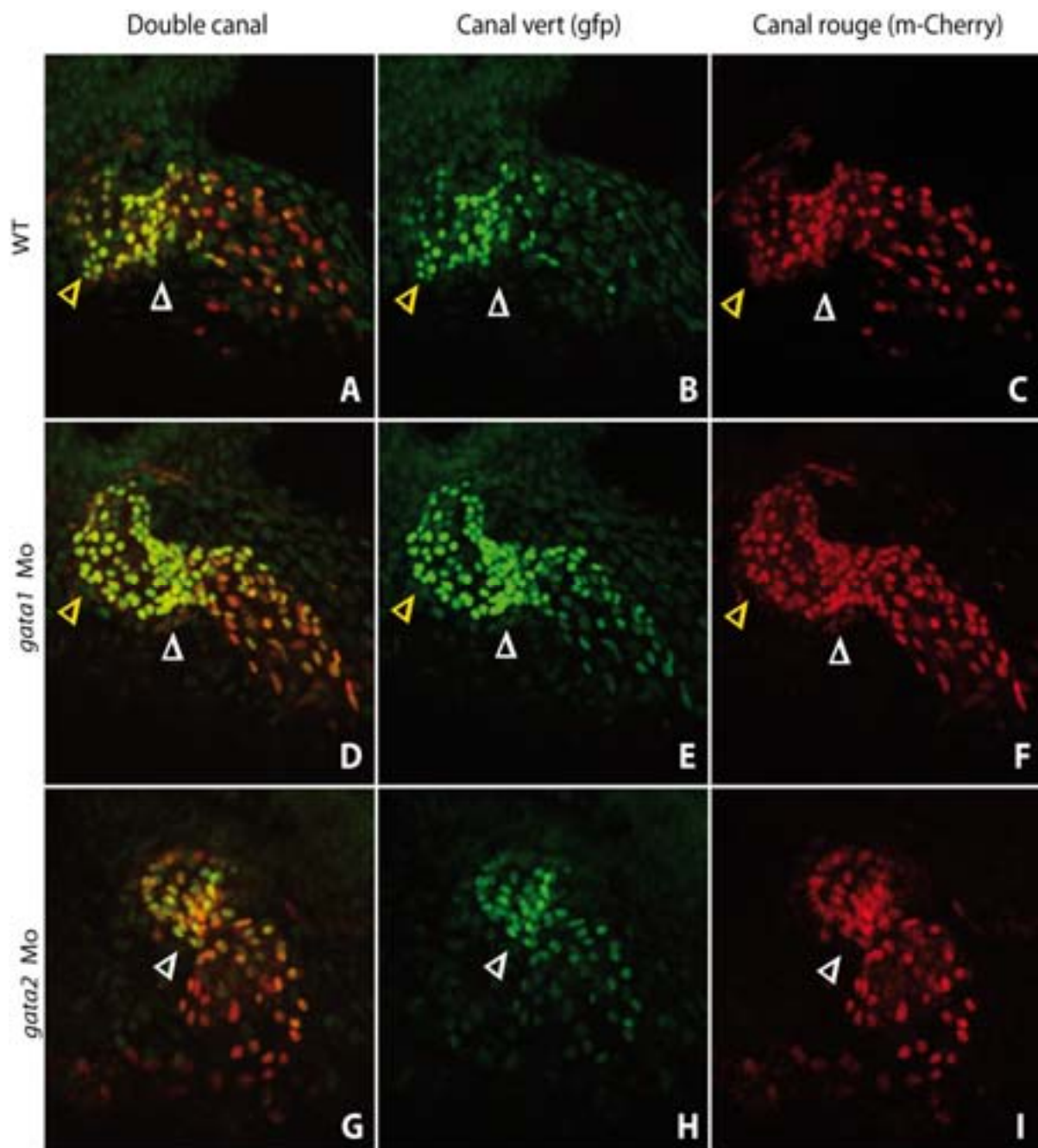


**Graphe 11: Mesure de l'efficacité de contraction cardiaque des morphants *gata1* et *gata2* à 48hpf.** L'efficacité de contraction de l'atrium (A) et du ventricule (V) des morphants est similaire à celle mesurée chez les poissons contrôles à 48hpf. CT n=10, *gata1*Mon=7, *gata2*Mo n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

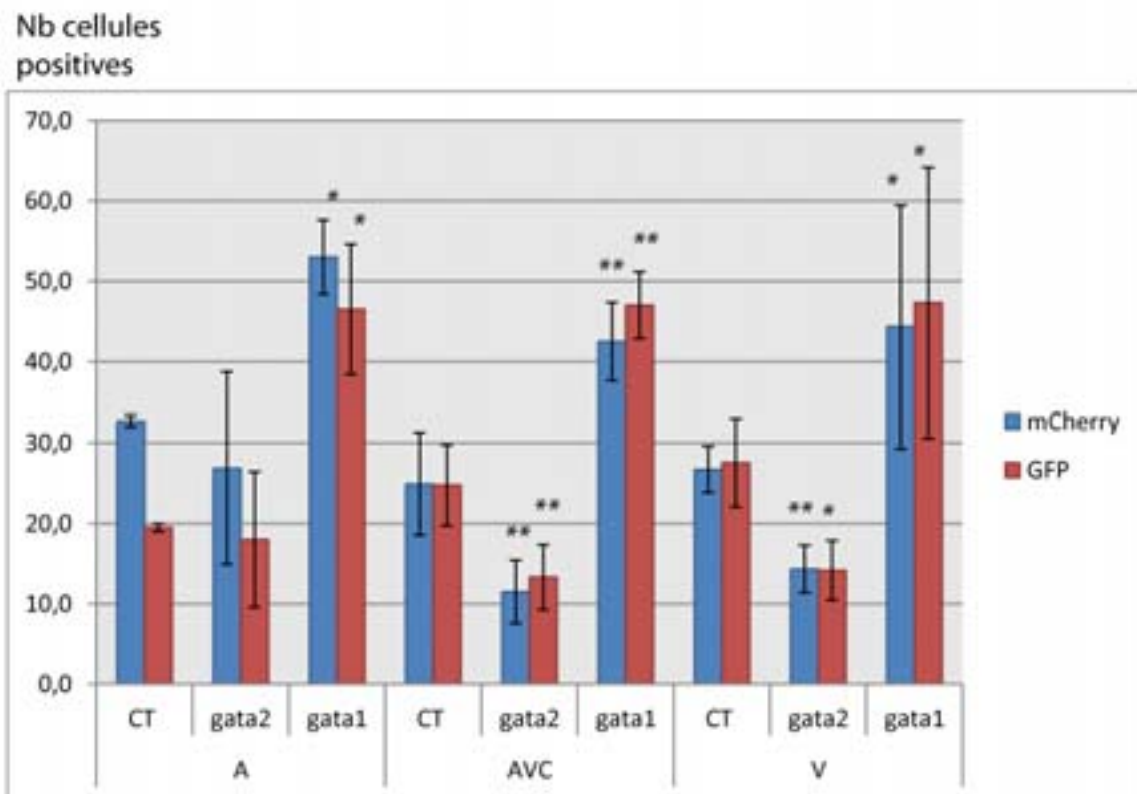
Le **dénombrement cellulaire**, en comparaison aux poissons non injectés, montre une hausse significative de plus de 35% du nombre total de cellules dans l'endocarde et du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-gfp* dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons injectés avec *gata1*Mo (Figure 21 B-E; Graphe 12). Contrairement aux morphants *gata1*, les poissons injectés avec le morpholino *gata2* se caractérisent par une baisse significative de plus de 40% de ces deux paramètres dans l'AVC et le ventricule. Cependant, un nombre similaire de cellules dans l'endocarde et exprimant la *gfp* est



retrouvé au niveau de l'atrium des morphants *gata2* par rapport aux poissons contrôles (Figure 22 G-I; Graphe 12).



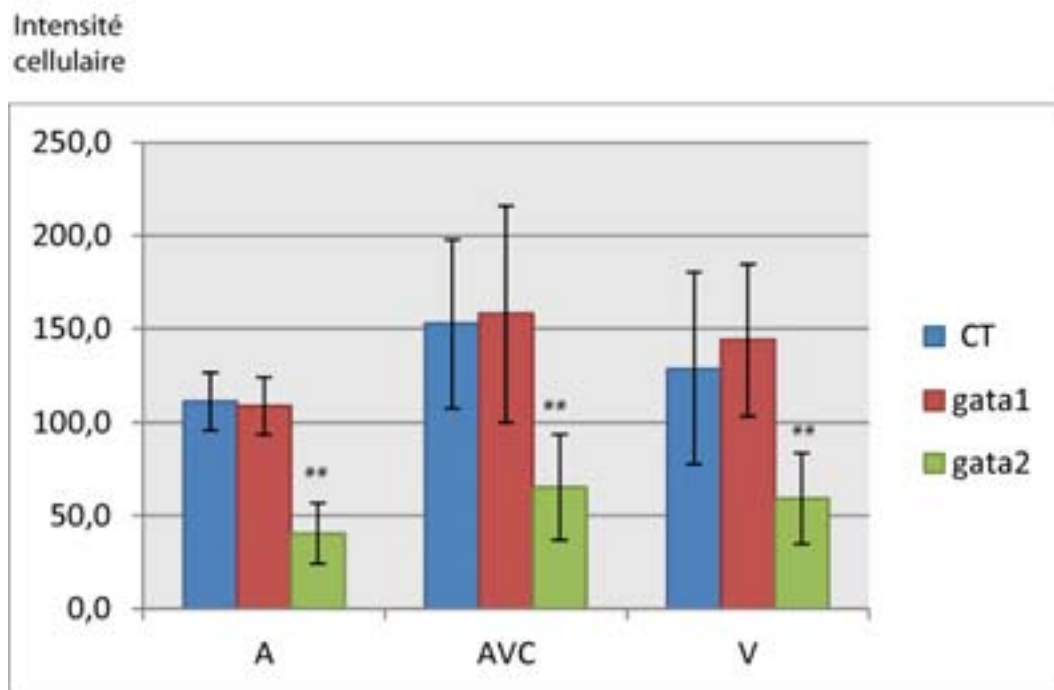
**Figure 22: Visualisation du gène *klf2a* et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants *gata1* et *gata2* à 48hpf.** Projection maximale de cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (D-E) L'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC et du ventricule (Triangle jaune) des morphants *gata1* est augmentée par rapport aux poissons WT. (G-H) Les morphants *gata2* présentent une baisse des cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC. (C,F,I) Nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde.



**Grphe 12: Comptage cellulaire après injection des poissons avec *gata1Mo* et *gata2Mo*, à 48hpf.** Hausse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) et du nombre de cellules exprimant *klf2a* (GFP) dans l'AVC, l'atrium et le ventricule des morphants *gata1* et diminution de ces paramètres dans l'AVC et le ventricule des poissons injectés avec *gata2Mo* par rapport aux contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10, *gata1Mo* n=7, *gata2Mo* n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

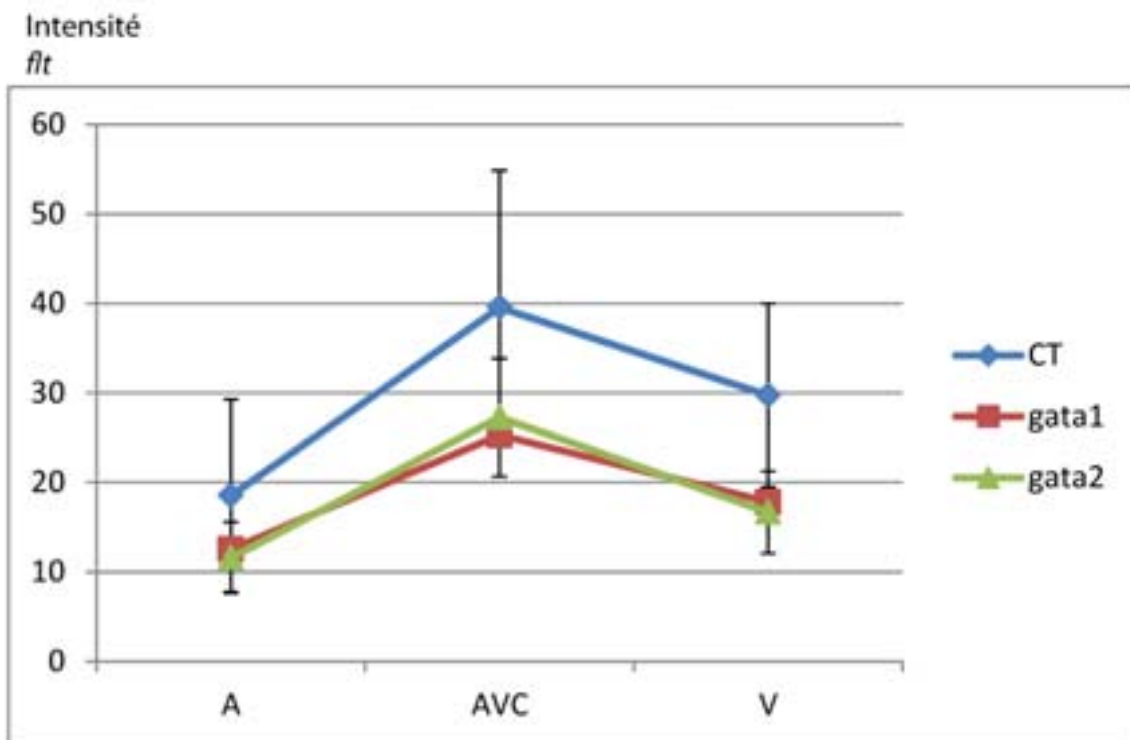
L'intensité du transgène *klf2a* nucléaire mesurée dans les cellules montre une baisse significative de plus de 58% de cette intensité dans les deux chambres cardiaques ainsi que dans le canal AV des morphants *gata2*, par rapport aux poissons contrôles. Les morphants *gata1*, malgré la sensation d'intensité *gfp* augmentée sur les images obtenues avec le microscope confocal SP2, présentent une expression *gfp* dans le cœur d'intensité égale à celle des contrôles (Grphe 13). Cette mesure d'intensité peut être sous-estimée car le signal nucléaire est saturé chez les morphants *gata1*. Une autre mesure en s'assurant de ne pas

saturer les noyaux des poissons injectés avec *gata1*Mo est nécessaire pour valider ces données.



**Graphe 13: L'intensité du transgène nucléaire *klf2a* est diminuée chez les morphants *gata2* et non chez les morphants *gata1*. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules composant l'atrium, le ventricule et l'AVC des poissons injectés avec le morpholino *gata2* par rapport aux poissons contrôle (CT). Aucune différence d'intensité *gfp* n'est visible chez les morphants *gata1*. CT n=10, *gata1*Mo n=7, *gata2*Mo n=6. \*P<0,05 ; \*\*P< 0,001.**

Avant de conclure sur cette partie j'ai également effectué la mesure de l'intensité du marqueur du pattern endocardique *flt* via l'utilisation des lignées *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)\* Tg(flt1\_enhancer : td-tomato)*. La mesure de l'intensité correspondant au pattern cardiaque chez les morphants *gata1* et *gata2* ne présente aucune variation de cette dernière dans les deux chambres cardiaques et l'AVC en comparaison aux poissons contrôles, signifiant que les résultats obtenus sont uniquement dus aux effets du morpholino (Graphe 14).



**Graph 14:** L'intensité *ftl* mesurée dans l'endocarde des morphants *gata1* et *gata2* est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf. Aucune différence n'est observée lors de la mesure de l'intensité du reporter *ftl\_td-tomato* chez les morphants en comparaison aux poissons contrôles (CT).

Dans cette sous-partie, la baisse de l'expression du gène *klf2a* ainsi que de son intensité dans les cellules de l'AVC en l'absence de défaut de contractions cardiaques mais en présence d'une baisse du flux par rapport aux poissons contrôles à 48hpf, nous permet d'inculper la seule présence du flux reversant dans l'expression génique de *klf2a* et non la combinaison contractions-flux supposée lors des expériences menées en diminuant la vitesse cardiaque. Ces résultats sont également indépendants du pattern du cœur embryonnaire.

## 5 Conclusion

Les données générées ci-dessus nous autorisent à conclure sur de nombreux points : la lignée *klf2a\_6kb:h2b-gfp* récapitule l'expression endogène de *klf2a* et ce de manière dépendante du flux et de la contraction cardiaque à 48hpf. La lignée *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)* est donc un bon outil pour l'étude de l'expression de *klf2a* dans le cœur du poisson zèbre.

Cette étude montre également que le nombre total de cellules endocardiques se révèle être sous la dépendance du flux et des contractions. Ceci pourrait être lié au fait que *klf2a* est anormalement exprimé dans les différentes conditions analysées. Enfin, l'absence de variation de l'intensité du signal *flt* dans l'AVC des poissons injectés avec les divers morpholinos testés, nous permet d'exclure un effet indirect d'un défaut de la mise en place de l'endocarde.

La confirmation de la dépendance au flux reversant du gène *klf2a* nous amène à la question suivante : Quels sont les mécanismes capables de sentir ce flux afin de permettre, à terme, l'expression et le maintien du signal *klf2a* dans l'AVC des poissons ? La première idée m'étant venue à l'esprit est la détection fluidique par les cils, présents à la surface membranaire des cellules endocardiques des mammifères, mais encore jamais visualisés au niveau de l'endocarde chez *Danio rerio*.

# **Chapitre 2**

**Mécanodétection endocardique ; le cil  
primaire**

# Chapitre 2 : « Mécanodétection endocardique ; le cil primaire »

## 1 Introduction

Lors du développement cardiaque chez les mammifères, de nombreux changements cellulaires et morphologiques interviennent après apparition du flux sanguin. De nombreuses études démontrent que les cellules endothéliales réagissent différemment en fonction du type de flux auxquels elles sont soumises (Icardo 1989; Topper and Gimbrone 1999; Garcia-Cardena, Comander et al. 2001). La nécessité d'un senseur de flux au niveau des cellules endothéliales est donc apparue comme étant une évidence pour la transmission du signal aux cellules. De nos jours, de nombreux mécanosenseurs endothéliaux ont été décrits (Freund, Goetz et al. 2012) mais le mécanisme permettant aux cellules endocardiques de sentir le flux n'est pas clair. Parmi ces différents mécanodétecteurs, les cils, situés à la surface membranaire, sont des candidats idéaux pour la détection des forces fluidiques. Se présentant sous la forme de « petites antennes » de taille variable (entre 3 et 10 µm en fonction du type cellulaire) et formés de doublets de microtubules, les cils sont déjà connus pour leur rôle de senseurs de flux dans des organes tels que les reins ou le pancréas des mammifères (Praetorius and Spring 2001). Leur rôle de senseur est alors indispensable à l'organisation corporelle gauche-droite de la souris (Nonaka, Tanaka et al. 1998; Essner, Vogan et al. 2002; Nonaka, Shiratori et al. 2002; Yoshiba, Shiratori et al. 2012). Bien que leur fonction de mécanosenseurs dans ces organes ne soit plus à discuter, peu d'études ont démontré leur importance au niveau du système cardiovasculaire et lors du développement cardiaque, tant au niveau des mammifères qu'au niveau du modèle *Danio*

*rerio*. Bien entendu, avant d'évoquer une quelconque implication des cils dans le processus de détection fluide au niveau des cellules cardiaques, la première étape a été d'observer leur présence au niveau endocardique. Ainsi, la présence de cils primaires (structure non motile constituée de 9 doublets de microtubules) a pu être mise à jour au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECS) (Iomini, Tejada et al. 2004) mais aussi au niveau du cœur embryonnaire de poulet (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006) et de souris (Slough, Cooney et al. 2008). Lors du développement embryonnaire de la souris et du poulet, la présence de cils a pu être observée au niveau des cellules endocardiques de l'atrium et du ventricule de même qu'au niveau des cellules mésenchymateuses formant les coussinets endocardiques, et ceci avant la mise en place du flux sanguin. Les cils observés dans l'atrium et le ventricule sont orientés vers le lumen, ce qui n'est pas le cas des cellules mésenchymateuses présentant une organisation plus anarchique (Slough, Cooney et al. 2008). Après intervention du flux, les auteurs ont aussi pu observer une diminution du nombre de cils dans l'endocarde ainsi que de la taille de ces derniers au niveau des zones surexposées au fluide sanguin, amenant à émettre l'hypothèse d'une interaction entre le shear-stress et la répartition des cils primaires dans l'endocarde (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006). Afin de conforter cette idée, Van der Heiden et ses collaborateurs ont eu l'idée de comparer cette distribution ciliaire à l'expression embryonnaire du gène *KLF2*, marqueur de zones où le shear stress est important (Dekker, van Soest et al. 2002). Ainsi, la mise en évidence de cils dans des zones où le shear stress est faible et inversement, l'absence de cils au niveau des cellules de l'AVC et de l'OT (où le shear stress est très élevé) a pu révéler l'instabilité ciliaire dans des zones où le shear stress est fortement présent, mais aussi pu démontrer le processus dynamique de la détection du flux par les cils.



## 2 L'endocarde du poisson zèbre est cilié

Basé sur ces données, et poussée par l'absence de papiers sur ce sujet chez le poisson zèbre, je me suis intéressée à la présence de cils dans l'endocarde embryonnaire et leur éventuelle fonction lors du développement cardiaque. Pour ce faire, nous avons généré deux lignées transgéniques au laboratoire, *Tg(UAS\_arl13b-eGFP:cmlc2-eGFP)* et *Tg(UAS\_arl13b-RFP:cmlc2-eGFP)*, utilisant la protéine ADP-ribosylation factor-like protein 13B ou arl13b, comme marqueur spécifique du cil primaire, et le système Gal4-UAS (Brand and Perrimon 1993) (Figure 23). Codant pour une petite GTPase, la protéine arl13b est retrouvée à la surface membranaire des cils et a été décrite comme jouant un rôle important dans la formation de ces derniers ainsi que dans leur maintien (Hori, Kobayashi et al. 2008). Dans ces lignées, la présence du *cmlc2:eGFP* est nécessaire afin de génotyper plus facilement les animaux transgéniques. Les fusions protéiques fonctionnant relativement bien avec arl13b, de nombreuses protéines, dont la GFP, ont pu être fusionnées en aval de cette protéine afin de permettre la visualisation du cil fluorescent sous microscope. Le système Gal4-UAS est une méthode biochimique de plus en plus utilisée dans la communauté scientifique employant le poisson zèbre comme modèle. Initialement développé chez la drosophile, ce système se compose d'une protéine régulatrice (Gal4) et d'un activateur transcriptionnel (UAS). Placé sous le contrôle du promoteur génique d'intérêt, Gal4 est capable de se lier à l'activateur UAS (Figure 23), permettant alors l'expression, dans notre cas, de la GTPase *arl13b* de façon endothéliale endocardique spécifique dans le cil (cf. matériel et méthodes).



Figure 23: Construction de la lignée *Tg(UAS\_arl13b-eGFP :cmlc2-eGFP)*. Présence des sites Tol2 ainsi que de la fusion protéique *arl13b-cmlc2*.

## 2.1 Validation des lignées transgéniques

La première étape de cette visualisation a été de valider les lignées transgéniques. Pour cela j'ai croisé les lignées *Tg(UAS\_arl13b-eGFP :cmlc2-eGFP) \* Tg(fligalFFUAS-kaede)* et *Tg(UAS\_arl13b-RFP :cmlc2-eGFP) \* Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)* et observé la présence de cils exprimant la GFP ou la RFP au niveau des vaisseaux sanguins, endroit d'observation relativement plus aisé que le cœur du fait de l'absence de mouvements contractiles.

La présence de cils dans les vaisseaux sanguins à 30 et 48hpf permet de valider les lignées transgéniques (Figure 24; Annexe 1, vidéo n°10).

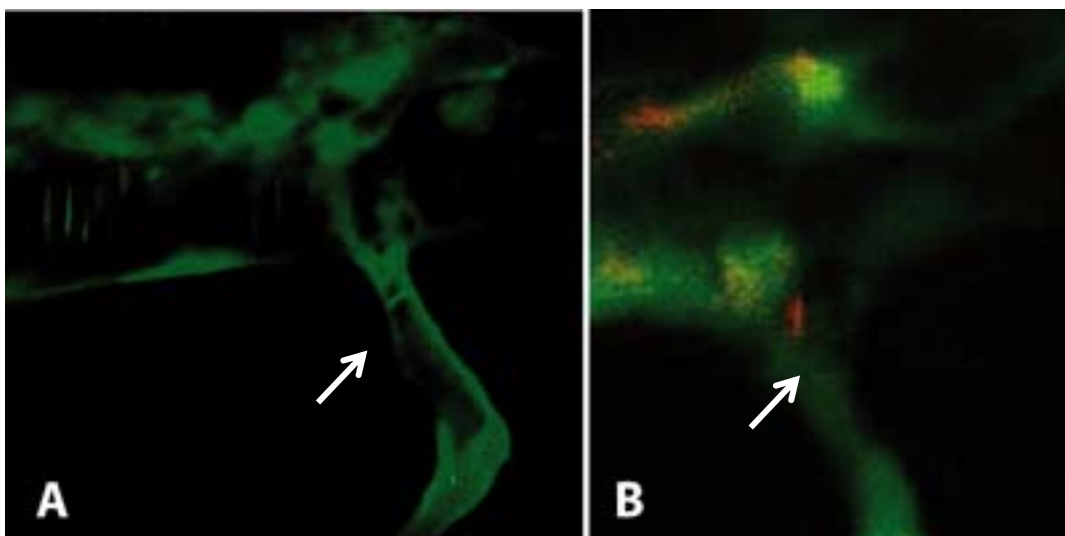


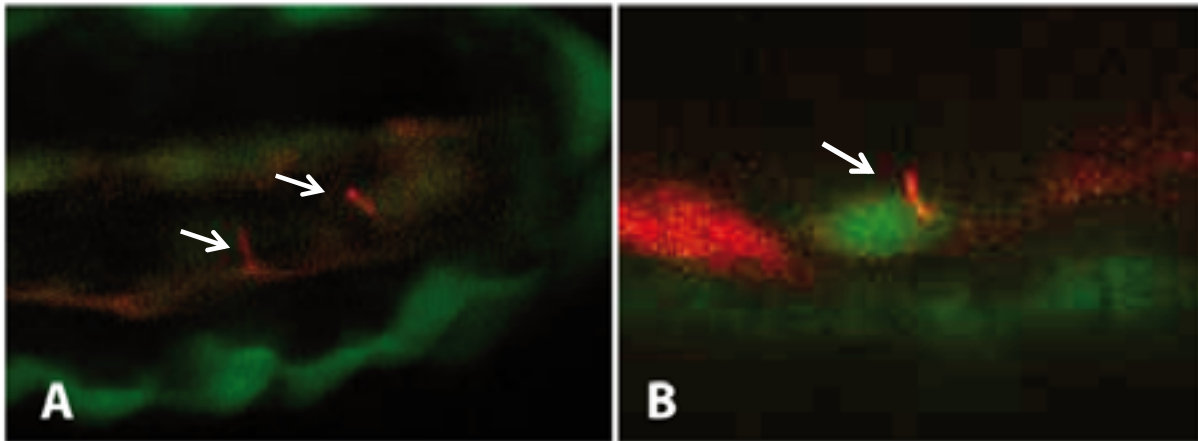
Figure 24: Validation des lignées transgéniques *Tg(UAS\_arl13b-eGFP :cmlc2-eGFP)* et *Tg(UAS\_arl13b-RFP :cmlc2-eGFP)*. Présence de cils (flèches blanches) dans les vaisseaux des lignées (A) *Tg(UAS\_arl13b-GFP : cmlc2-eGFP) \* Tg(fligalFFUAS-kaede)* et (B) *Tg(UAS\_arl13b-RFP : cmlc2-eGFP) \* Tg(flk1 :Gal4-UAS :eGFP)* à 48hpf.

## 2.2 Observation des cils dans l'endocarde

Suite à la validation des lignées transgéniques, j'ai voulu observer la présence de cils dans l'endocarde du poisson zèbre. J'ai ainsi utilisé la lignée *Tg(UAS\_arl13b-RFP :cm1c2-eGFP)* croisée avec la lignée *Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)* et effectué un traitement court de dix minutes des poissons en 2,3BDM dans le but de stopper les contractions cardiaques (Cf. matériel et méthodes). L'imagerie des cœurs a été faite grâce au microscope confocal SP2. (cf. matériel et méthodes).

Lors de l'observation de cœurs embryonnaires de poissons WT à 30hpf, j'ai pu mettre en évidence la présence de nombreuses structures ciliées au niveau des cellules endocardiques du tube cardiaque. Ces cils primaires sont localisés tout le long du tube cardiaque et sont orientés vers le lumen (Figure 25 A; Annexe 1, vidéo n°11).

Suite à la découverte de cils dans l'endocarde à 30hpf et basée sur les découvertes menées par Slough et Van der Heiden, j'ai tout naturellement voulu voir si ces derniers étaient toujours visibles une fois le flux sanguin bien établi (correspondant à un shear stress augmenté au niveau des cellules de l'endocarde) et l'expression de *klf2a* déjà initiée dans l'AVC, c'est-à-dire à 48hpf. A ce moment du développement embryonnaire, la présence de cils primaires est bien visible au niveau de l'atrium et du ventricule ainsi qu'en bordure d'AVC. Comme à 30hpf, les cils sont orientés vers le lumen et possèdent un mouvement de type brownien engendré par l'arrêt des contractions cardiaques (Figure 25 B; Annexe 1, vidéo n°12 et n°13).

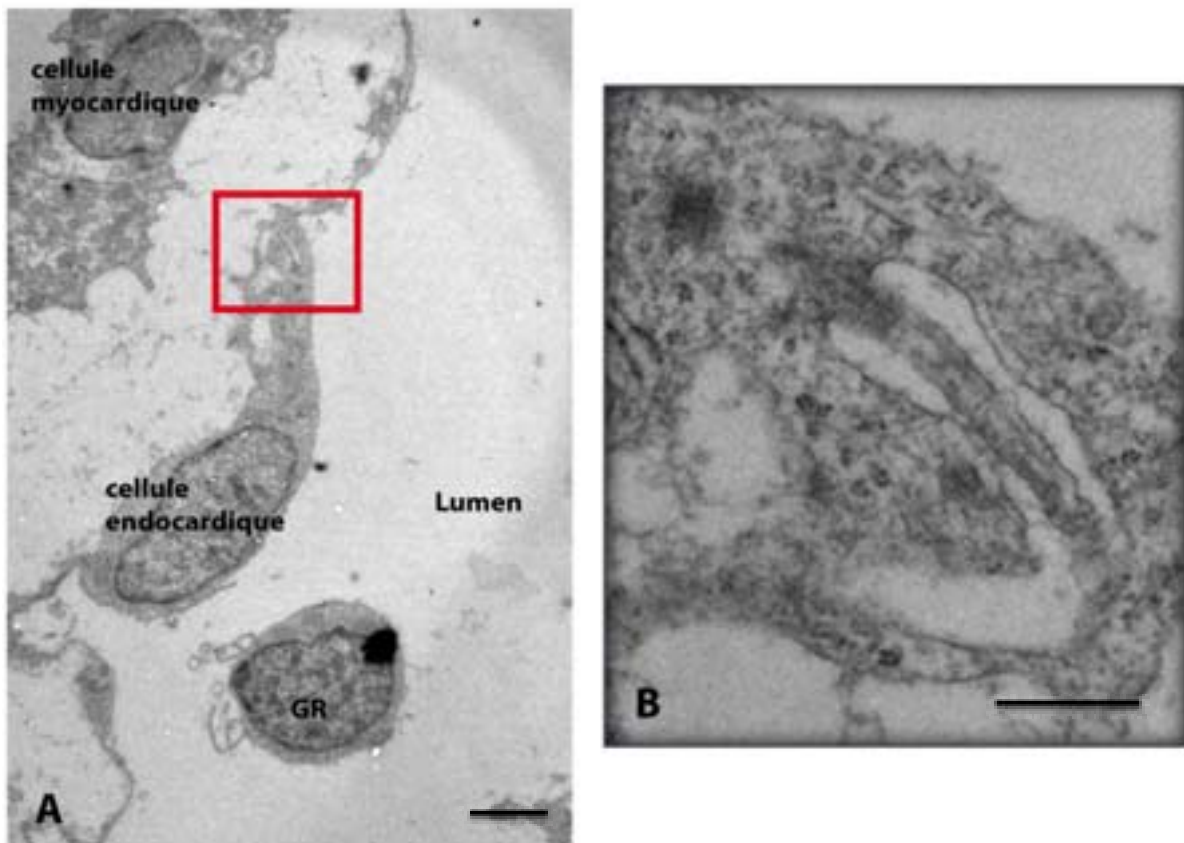


**Figure 25: Localisation des cils dans l'endocarde embryonnaire à 30hpf et 48hpf. Présence de cellules endocardiques ciliées (flèches blanches) à 30hpf (A) et 48hpf (B).**

Afin de confirmer les données obtenues par microscopie confocale et avec l'aide de Yannick SCHWAB, j'ai confirmé leur présence via microscopie électronique à transmission (EMT). (cf. matériel et méthodes.)

Lors de l'observation d'une coupe cardiaque d'un poisson WT à 48hpf, nous avons pu mettre en évidence la présence de cils primaires orientés vers le lumen, dans l'atrium et le ventricule mais également en bordure d'AVC. La coupe présentée en [figure 26](#) est une coupe cardiaque située au niveau des cellules endocardiques formant l'entrée du canal atrio-ventriculaire. La présence de microtubules le long du cil ainsi que du corpuscule basal sont visibles ([Figure 26 B](#)). Aucun cil n'a pu être observé dans le canal atrio-ventriculaire, laissant penser, comme lors du développement cardiaque chez la souris, à une perte du cil lors de l'établissement du flux sanguin. Cependant nous avons pu en voir à l'entrée et à la sortie de l'AVC. On ne peut donc pas exclure l'implication des cils dans la valvulogénèse. Afin de confirmer ces dires, une inactivation de ces derniers serait nécessaire via l'inhibition, par

exemple, des protéines de transport intra-flagellaires ift88, ift57 ou encore ift172, intervenant dans la formation ciliaire (Lunt, Haynes et al. 2009).



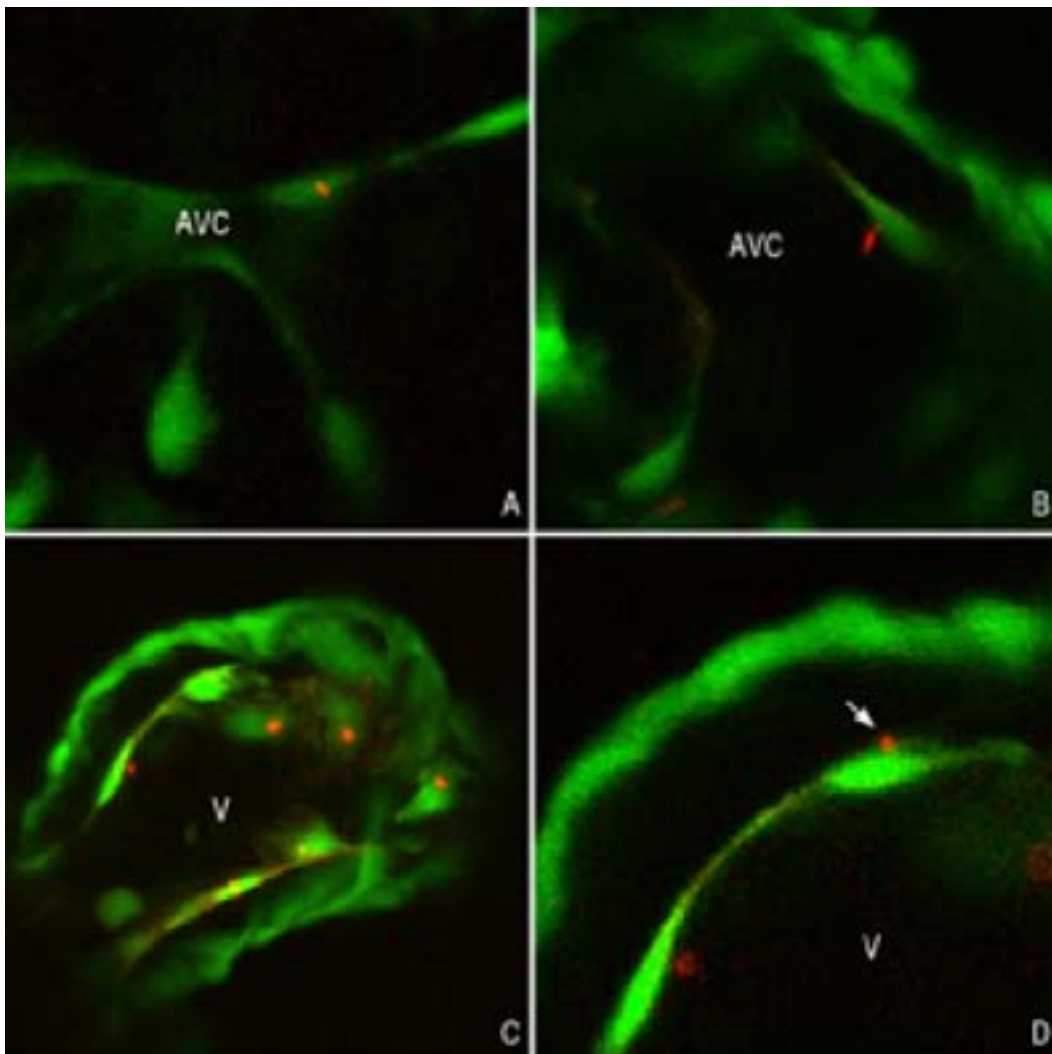
**Figure 26: Microscopie électronique à transmission de l'endocarde à 48hpf. (A) Présence d'un cil (carré rouge) au niveau d'une cellule endocardique en bordure d'AVC, échelle 2µm. (B) Zoom sur la zone ciliée, échelle 0,25µm.**

Les données générées précédemment sur le cœur de souris (Slough, Cooney et al. 2008) et chez le poulet (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006) démontrent toutes une perte ciliaire ou une réduction de leur taille dans les zones exposées à un shear stress élevé. Afin d'observer si la présence de flux et la notion de shear stress jouent un rôle dans la distribution des cils endocardiques chez le poisson zèbre, j'ai voulu observer la présence de ces derniers lors d'un excès, d'un défaut ou d'une absence totale de flux. Pour ce faire, j'ai

respectivement injecté les morpholinos suivant ; *gata1*, *cmlc1*, *cmlc2* et *tnnt2* (cf matériel et méthodes).

Les lignées *Tg(UAS\_arl13b-RFP :cmlc2-eGFP) \* Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)* injectées avec le morpholino *tnnt2*, présentant une absence totale de contractions cardiaques et de flux, et avec le morpholino *cmlc1*, présentant un défaut important de contractions cardiaques ainsi qu'un flux fortement réduit (Cf. Chapitre 1), ont été traitées dix minutes en 2.3BDM et observées au microscope SP5 à 48hpf (Cf. matériel et méthodes). Dans ces morphants, la présence de cils a été retrouvée au niveau de l'endocarde de l'atrium, du ventricule de même qu'au niveau des cellules endocardiques de l'AVC (Figure 27 A-B). Ces derniers sont orientés vers le lumen cardiaque et possèdent un mouvement brownien du fait de l'arrêt des contractions cardiaques par le traitement en 2.3BDM. Contrairement aux poissons WT, la présence de rares cils au niveau du canal atrioventriculaire en l'absence de flux permettrait d'associer le rôle majeur du shear stress à la répartition ciliaire endocardique chez le poisson zèbre.

Afin d'impacter, de façon moins dramatique que le morpholino *cmlc1*, les contractions cardiaques, j'ai utilisé le morpholino *cmlc2*, présentant une efficacité de contraction supérieure à celle des morphants *cmlc1* (Cf. Chapitre 1), mais aussi un flux réduit par rapport aux poissons contrôles. De façon forte intéressante, la répartition ciliaire à 48hpf est majoritairement effectuée au niveau du ventricule (Figure 27 C) et aucun cil n'est retrouvé dans l'AVC. L'organisation des cils se révèle être anarchique, amenant même certains d'entre eux à être orientés vers le myocarde et non vers le lumen (Figure 27 D). Mis bout à bout, ces résultats suggèrent l'importance du flux et de la contraction cardiaque pour la formation du cil et l'orientation de ce dernier vers le lumen.



**Figure 27: Les cils sont présents dans l'AVC des poissons présentant une absence ou une forte réduction du flux, à 48hpf. Présence de cil (en rouge) dans une cellule endocardique de l'AVC d'un poisson injecté avec *tnnt2* (A) ou *cmlc1* (B) à 48hpf. Localisation majoritaire des cils dans le ventricule des morphants *cmlc2* (C) et orientation de ces derniers vers le myocarde (D, flèche blanche).**

Dans le but de confirmer l'implication du shear stress dans la répartition ciliaire, j'ai injecté le morpholino *gata1* qui permet d'augmenter de façon générale ce shear stress au niveau des cellules endocardiques (Vermot, Forouhar et al. 2009). La présence des cils au niveau de l'atrium mais l'absence totale de structures ciliées au niveau de l'entrée et de la sortie de l'AVC, dans l'AVC et dans le ventricule corrèlerait, dans notre cas, avec le fait que

plus le shear stress est élevé, moins nous retrouvons de cils dans l'endocarde (Iomini, Tejada et al. 2004; Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006).

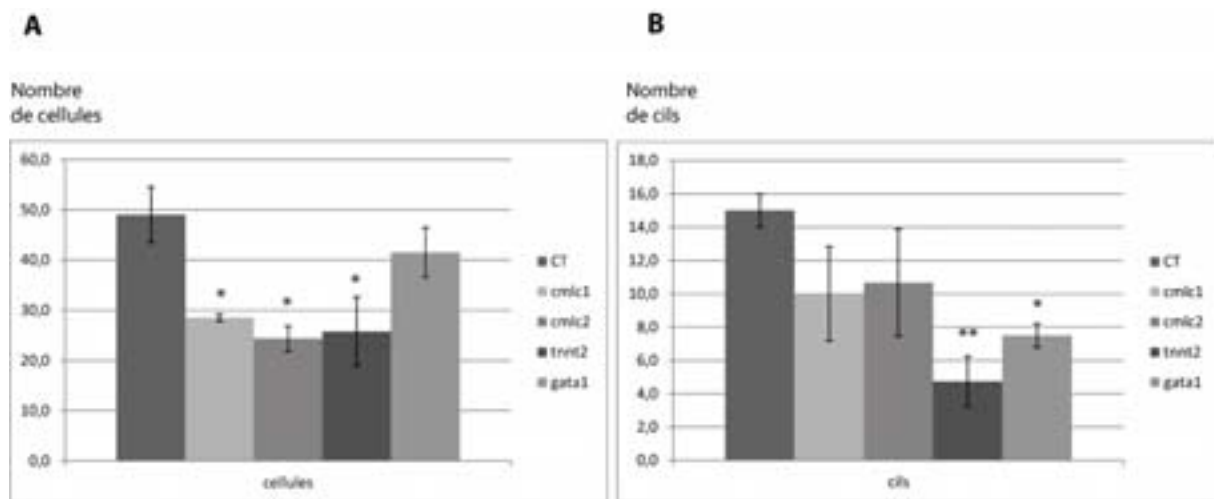
Ainsi, le shear stress et la contraction cardiaque joueraient un rôle prépondérant dans la formation et l'orientation ciliaire dans l'endocarde. Cependant, leur rôle dans cette couche cellulaire interne reste encore à définir.

### 3 Le cil primaire, mécanodétecteur endocardique mineur

Suite à l'observation de cils primaires dans l'endocarde du poisson, je me suis intéressée à leur répartition et éventuel rôle dans la détection fluïdique. Pour ce faire j'ai manuellement compté le nombre de cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'endocarde, ainsi que le nombre de cils exprimant le marqueur fluorescent RFP dans la totalité des cellules endocardiques à 30hpf et 48hpf. J'ai ensuite effectué un ratio cils/cellules pour chaque condition précédemment citées.

A 30hpf, les poissons contrôles présentent près de 67% de cellules endocardiques ciliées (données non montrées). Ce pourcentage baisse pour atteindre 30% à 48hpf, soit environ 15 cils pour 49 cellules ([Graphe 15 A et B](#)). La diminution du nombre de cellules ciliées à 48hpf peut, à ce niveau, être expliquée par la présence importante du shear stress au niveau des cellules endocardiques de l'AVC et du ventricule (Iomini, Tejada et al. 2004).





**Graph 15: Quantification ciliaire et nucléaire dans l'endocarde à 48hpf.** Comptage du nombre total de cellules endocardiques (A) et de cils dans l'endocarde (B) dans des poissons WT et injectés à 48hpf. n=4 pour toutes les conditions. \*P<0,05 vs cellules WT ou cils WT ; \*\*P<0,001 vs cellules WT ou cils WT.

Lors de l'injection des morpholinos *gata1*, peu de cils sont retrouvés au niveau des cellules endocardiques. En effet, seules 18% des cellules sont ciliées à 48hpf. La présence d'un flux augmenté dans certaines régions cardiaques des morphants *gata1* pourrait, encore une fois, expliquer la perte de plus de la moitié des cils par rapport aux poissons contrôles dans l'endothélium cardiaque (Graph 15B), notamment dans les zones soumises à un fort shear stress (AVC, V).

Les poissons injectés avec le morpholino *tnnt2* présentent un nombre de cellules dans l'endocarde et un nombre de cils significativement diminués en comparaison aux poissons contrôles (Graph 15A et B), mais présentent, de façon intéressante, une répartition ciliaire identique à celle des morphants *gata1* (18%). L'utilisation du morpholino *cmic1*, permet quant à elle de distinguer environ 32% de cellules ciliées tout au long de l'endocarde, à 48hpf, soit une proportion ciliaire similaire à celle des poissons contrôles. Ces données permettent d'impliquer le flux, même minime, à la formation ciliaire dans l'endocarde.

Les poissons injectés avec *cm1c2Mo*, présentent quant à eux, et de façon assez surprenante, plus de 40% de cellules ciliées dans l'endocarde. En considérant que le nombre de cellules dans l'endocarde est réduit par rapport à celui des poissons contrôles (Graphe 15 A), la proportion ciliaire est légèrement plus importante dans les morphants que dans les poissons WT. Ces données suggèrent la mise en évidence l'implication du flux dans la répartition ciliaire mais également dans le maintien de ces derniers au cours du développement embryonnaire.

Malgré les données intéressantes générées lors de l'analyse de la répartition ciliaire, nous ne pouvons pas ne pas relever le faible pourcentage de cils retrouvé dans l'endocarde à 48hpf. En effet, les poissons contrôles ne présentent pas plus de 32% de cellules endocardiques ciliées soit une moyenne de 15 cils pour 49 cellules endocardiques (Graphe 15 A-B). Hormis pour le morpholino *cm1c2*, ce faible pourcentage est retrouvé dans les autres conditions testées, indépendamment de la présence de flux ou de contractions. La faible proportion ciliaire pourrait amener à penser à un rôle mineur des cils lors de la mécanodétection fluïdique à 48hpf au profit d'autres mécanosenseurs endocardiques.

## 4 Conclusion

La détection fluïdique à la surface des cellules endocardiques est une des étapes majeure à la propagation du signal intracellulaire (Sharefkin, Diamond et al. 1991). Malgré de nombreux senseurs de flux décrits au niveau des cellules endothéliales, le cil reste un des candidats prédominant à cette détection (Sharefkin, Diamond et al.). Dans cette présente étude, après validation de nouvelles lignées transgéniques spécifique du cil primaire

(*arl13b*), j'ai mis en évidence la présence de cils dans les cellules de l'endocarde de poisson zèbre à 30hpf et 48hpf. Jamais observés dans l'endocarde, cette découverte a tout d'abord permis d'entrevoir, comme décrit chez les mammifères, le cil comme étant un bon modèle de senseur de flux au niveau des cellules endocardiques. De plus, la présence chez les poissons *WT* et chez les morphants *gata1* de cils dans des zones présentant un faible shear stress (atrium) et leur absence dans les zones où ce dernier est élevé (AVC, V), a permis de mettre en évidence un lien direct entre le shear stress et la répartition ciliaire. Cependant, cette notion reste à élucider dans les poissons injectés avec les morpholinos *tnnt2* et *cmlc1*. En effet, l'absence totale de flux dans les morphants *tnnt2* ou la très forte réduction de ce dernier dans les morphants *cmlc1*, permet tout de même la détection de cils dans l'endocarde. Bien que significativement diminués en l'absence totale de flux, le nombre de cils présents dans les poissons injectés avec *cmlc1* se révèle être similaire à ceux des contrôles. Ce taux identique indiquerait que la présence d'un flux, aussi infime qu'il soit, permettrait la formation de cils dans l'endocarde. Ces données semblent être confirmées par le morpholino *cmlc2*, présentant un flux plus important que dans les poissons injectés avec *cmlc1*. Il serait alors intéressant de quantifier ce flux afin de déterminer la quantité minimale nécessaire à la ciliogénèse.

Malgré la découverte forte encourageante de cellules endocardiques ciliées, leur faible répartition dans l'endocarde (moins de 30% de cellules ciliées) ne permet pas l'implication d'un rôle majeur des cils lors du développement cardiaque chez l'espèce *Danio rerio*.

Cette faible proportion laisse présager l'intervention d'un autre mécanodétecteur au niveau des cellules endothéliales, tels les canaux membranaires. Parmi ces derniers, un est tout de même étroitement lié au cil dans l'endocarde ; le complexe TRPV4-TRPP2.

# **Chapitre 3**

**Mécanodétection endocardique:**

**le cas TRPV4-TRPP2**

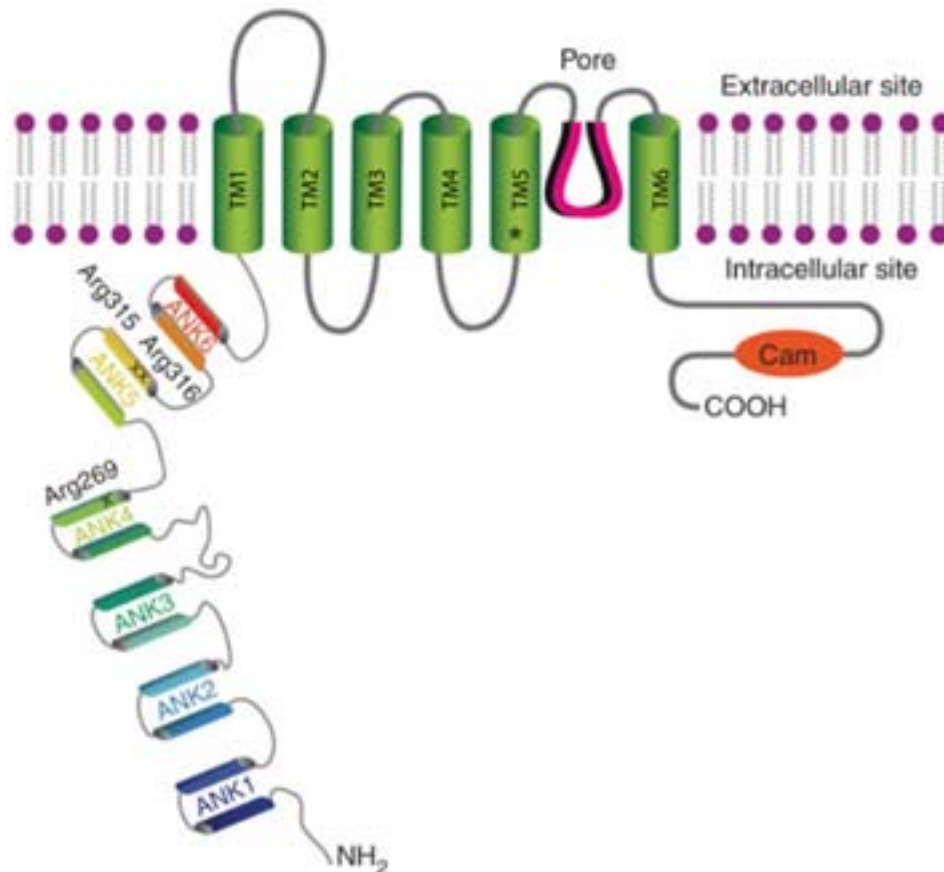
## Chapitre 3 : « Mécanodétection endocardique : le cas TRPV4-TRPP2 »

### 1 Transient Receptor Potential cation channel Vanilloid member 4 : TRPV4

La famille des Transient Receptor Potential (TRP) cation channels, premièrement identifiés dans des cellules photo-réceptrices de la drosophile (Nilius, Watanabe et al. 2003), est constituée de protéines sensorielles exprimées dans la quasi-totalité des tissus et cellules des mammifères (Voets, Talavera et al. 2005). Ces TRPs sont connus pour jouer un rôle majeur dans diverses fonctions homéostatiques. Divisée en sept sous famille, seuls certains membres sont retrouvés au niveau des cellules endothéliales de l'homme et des autres espèces ; les canonical TRP (TRPC), les melastatin TRP (TRPM) et les vanilloid TRP (TRPV) (Hofmann, Schaefer et al. 2002). Bien que le rôle dans l'endothélium des TRPM reste mal défini à ce jour, celui des TRPV a fait l'objet de nombreuses études. Observé pour la première fois dans l'endothélium aortique de souris (Strotmann, Harteneck et al. 2000) puis de rat (Kohler, Heyken et al. 2006), le 4<sup>ème</sup> membre de la sous famille des TRPV, TRPV4, est le seul membre de cette famille à être exprimé dans l'endothélium.

Formé de près de 871 aminoacides (Paavola, Schliffke et al.), TRPV4 possède une extrémité C-terminale et N-terminale intracellulaire ainsi que six hélices  $\alpha$  transmembranaires notées TM1-6 (Figure 28). En plus de ces structures, des domaines riches en proline (PRD) et six répétitions d'ankyrines sont retrouvées du côté N-terminal. Ces dernières permettent les interactions protéiques (Denker and Barber 2002) et pourraient être impliquées dans la

structure tétramérique de TRPV4 (Gaudet 2008). Du côté C-terminal, outre les hélices  $\alpha$  citées ci-dessus, des sites permettant la liaison de la calmoduline, protéine capable de lier des ions calciques pour induire une activation d'autres protéines, dont TRPV4, sont retrouvés.



**Figure 28: Structure de TRPV4.** Présence d'une partie N-terminale (NH<sub>2</sub>) avec 6 domaines ankyrines. Présence de 6 hélices  $\alpha$  (vert) transmembranaires et d'un pore perméable entre les sites TM5 et 6. Du côté C-terminal (COOH) on retrouve un site calmoduline (orange). Image adaptée de Auer-Grumbach et al, *Nature Genetics* 42, 160-164 (2010).

D'abord décrit comme un canal activé suite à l'hypotonie induite par le mouvement des cellules (Wissenbach, Bodding et al. 2000; Nilius, Prenen et al. 2001; Nilius and Voets 2004; Vennekens, Owsianik et al. 2008), TRPV4 s'est rapidement vu promu comme étant un

canal membranaire permettant le passage d'ions calciques  $\text{Ca}^{2+}$  (Hofmann, Schaefer et al. 2002), notamment au niveau des structures TM5-6 (Plant and Strotmann 2007) (Figure 27). En effet, sa perméabilité au calcium a bien été décrite à ce jour (Strotmann, Harteneck et al. 2000; Nilius, Vriens et al. 2004) et peut, en cas de mutation de ce gène, entraîner de graves maladies liées à une augmentation du calcium intracellulaire comme dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth provoquant à terme de nombreux désordres neurologiques. Exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme des mammifères, TRPV4 a également été retrouvé à la base des cils primaires des cellules épithéliales du tractus biliaire de rats (Gradilone, Masyuk et al. 2007), mais aussi au niveau d'une sous-population de cils motiles dans l'isthme et l'ampoule ovarienne de la souris (Teilmann, Byskov et al. 2005). Les études menées par Kottgen et ses collaborateurs ont également permis de mettre en évidence la localisation ciliaire de TRPV4 dans des cellules MDCK (Madin-Dabry Canine Kidney cells) ainsi que sa capacité à interagir avec une autre protéine TRP (TRPP2). Ces études ont également pu établir TRPV4 comme étant un composant majeur de la sensation fluidique (Kottgen, Buchholz et al. 2008).

Comme la majorité des canaux membranaires, TRPV4 peut être activé de diverses façons. En effet, des composés synthétiques ou naturels tels le  $4\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate ( $4\alpha$ -PDD interagissant avec les résidus TM3 et TM4) (Gao, Wu et al. 2003; Watanabe, Vriens et al. 2003) ou certaines plantes indiennes (Vriens, Owsianik et al. 2007), sont capables d'engendrer une activation de TRPV4, amenant alors à une augmentation du calcium intracellulaire. Outre ses capacités à être activé, TRPV4 se révèle aussi être en mesure de réagir à divers stimuli mécaniques et osmotiques (Clapham 2003; Liedtke, Tobin et al. 2003) mais également à des stimuli chimiques et physiques, comme la température (Gao, Wu et al. 2003; Chung, Lee et al. 2004). Cette réactivité lui octroie alors le terme de



mécano- et osmo-TRP. Ce nouveau terme est dès lors justifié par des expériences menées chez la souris, démontrant une perte de l'osmorégulation et de la mécanosensation suite à l'inactivation du gène *TRPV4* (Watanabe, Davis et al. 2002). Ces mêmes pertes ont été observées chez le ver *Caenorhabditis elegans* après mutation du gène homologue à *TRPV4*, *osm-9* (Colbert, Smith et al. 1997).

Suite à ces données, TRPV4 s'avère être un bon **candidat à la détection du flux et shear stress** cellulaire. En effet, dès la découverte de TRPV4 dans l'endothélium de la carotide du rat, l'hypothèse d'une activation de *trpv4* par la stimulation mécanique de l'endothélium, comme une augmentation de la viscosité du flux et donc du shear stress, s'est imposée (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007). Suite à cette hypothèse, de nombreuses études ont été menées chez les mammifères, notamment la souris, afin de déterminer le rôle de *trpv4* vis-à-vis du shear stress (Wu, Gao et al. 2007; Mendoza, Fang et al. 2010; Berrout, Jin et al. 2012). Ainsi, Berrout et ses collaborateurs ont eu l'idée de tester, en 2012, l'implication de *trpv4* en fonction du shear stress. Dans cette expérience, des cellules rénales de souris sont mises en culture et ont été en premier lieu soumises à un flux dix fois plus important que le flux normal, puis soumises à un shear stress connu. Dans les deux cas, en se basant sur la perméabilité au calcium du canal TRPV4 pour pouvoir étudier l'activation de ce dernier, les auteurs ont observé une augmentation du calcium intracellulaire mesuré. Cette augmentation, révélatrice de l'activation de TRPV4, a permis de mettre en évidence la détection fluidique au niveau des cellules endothéliales du canal membranaire TRPV4 vis-à-vis du flux et du shear stress (Berrout, Jin et al. 2012). De nombreuses autres études menées en laboratoire rejoignent cette conclusion (Kohler, Heyken et al. 2006; Wu, Gao et al. 2007). Cependant peu d'études ont été menées dans le cœur, notamment chez le modèle *Danio rerio*.

## 1.1 TRPV4, un mécanodétecteur endocardique potentiel

Chez le poisson zèbre, la protéine Trpv4 est identique à près de 72% à celle de l'homme (Mangos, Liu et al. 2007). La seule différence résulte de la perte de trois domaines ankyrine du côté N-terminal (Mangos, Liu et al. 2007), réduisant la protéine à 841Aa. Exprimé dans de nombreux organes sensoriels et systèmes olfactifs ou encore dans l'oreille interne (Mangos, Liu et al. 2007; Amato, Vina et al. 2012), TRPV4 peut également être observé dans l'endothélium cardiaque (Mangos, Liu et al. 2007).

Cette expression cardiaque, qui débute aux environs de 30hpf, persiste au-delà de 72hpf. Grâce à des techniques d'hybridation *in situ*, Mangos et ses collaborateurs ont décelé une très forte expression endocardique spécifique de l'endothélium ventriculaire. Une plus faible expression est également visible dans l'atrium et à la jonction du canal atrio-ventriculaire (Figure 29).

De part cette découverte endocardique et les autres études menées chez les mammifères, j'ai émis l'hypothèse amenant *trpv4* comme étant le mécanodétecteur endocardique majeur retrouvé chez le poisson zèbre. Dans cette partie des résultats, j'ai utilisé des anticorps et la surexpression de *trpv4* pour mettre en évidence sa présence au niveau des cellules endocardiques *in vivo*. J'ai également utilisé un morpholino Knock down pour évaluer son rôle sur l'expression du gène *klf2a* et la formation des valves cardiaques. De plus, je me suis intéressée aux protéines pouvant interagir avec, notamment TRPP2, autre membre des TRPs connu pour former, avec TRPV4, un complexe polymodal et sensible de canaux calciques transmembranaires.

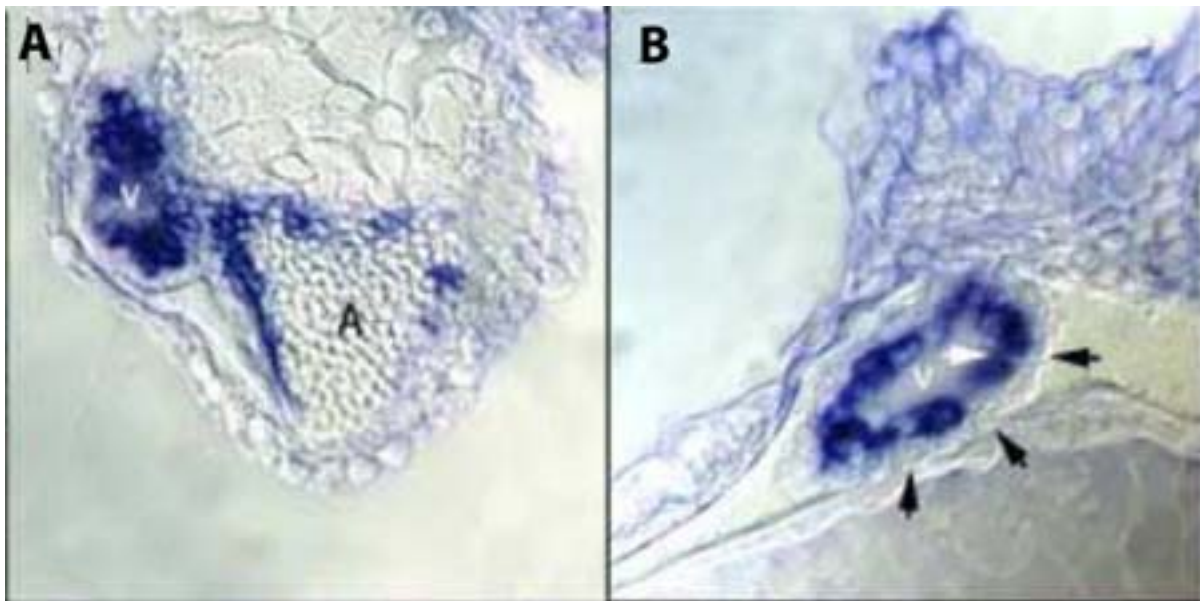


Figure 29: Expression de TRPV4 dans l'endocarde du poisson zèbre. (A) Forte expression dans le ventricule (V) et dans les parties supérieures de l'atrium (A) d'un poisson à 72hpf. (B) Expression spécifique dans l'endocarde du ventricule (flèche blanche). Le myocarde ne présente aucune expression (flèches noires). Image adaptée de Mangos et al, 2006.

## 2 Etude approfondie de TRPV4

### 2.1 TRPV4 est localisé à la surface membranaire des cellules endocardiques

Dans le but de localiser l'expression endocardique du gène *trpv4* de façon *in vivo*, j'ai croisé les lignées *Tg(UAS\_arl13b-RFP: cmlc2-eGFP) \* Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)* que j'ai ensuite injecté avec l'ADN *Tol2-trpv4-mCherry* (cf. matériel et méthodes) au stade une cellule. A 48hpf, et après traitement court de dix minutes en 2,3-BDM, j'ai observé les cœurs de poissons sélectionnés comme étant *flk* et *cmlc2* positifs, sous le microscope confocal SP5. La présence de fluorescence rouge (*mCherry*) au niveau de certaines cellules de l'endocarde et non du myocarde indique une expression endocardique spécifique du gène *trpv4* (Figure

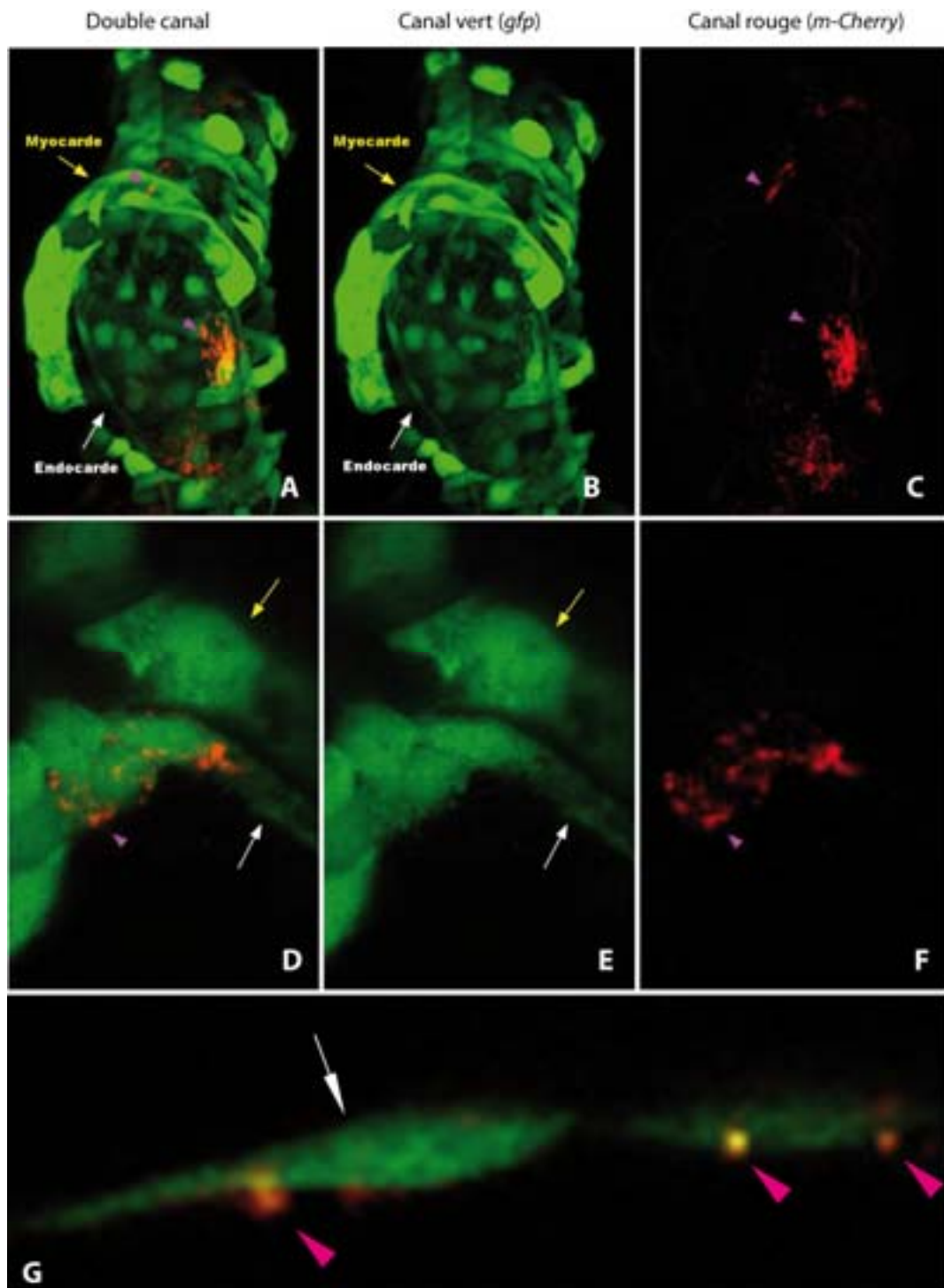
29 A-C). Cette expression est majoritairement retrouvée dans les cellules de l'atrium à 48hpf.

Suite à un plus fort grossissement sous microscope SP5, j'ai également pu observer la localisation en surface cellulaire des nombreux amas rouges, correspondant à la surexpression de *trpv4*, au niveau de l'endocarde (Figure 30 D, F-G). Afin de confirmer ces données, la création de lignées transgéniques par Stéphane Roth et permettant la surexpression de *trpv4* est en cours.

En plus de la localisation de *trpv4* dans l'endocarde, j'ai voulu observer si, comme c'est le cas chez les mammifères, *trpv4* colocalisait avec les cils. Les lignées transgéniques utilisées dans cette expérience, exprimant le promoteur *arl13b-eGFP*, nous permettent de visualiser les cils en même temps que la surexpression de *trpv4*. D'autres expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur ces mêmes lignées afin de visualiser les cils dans l'endocarde et de marquer *trpv4*, de façon *in vitro*, avec un anticorps spécifique (cf. matériel et méthodes).

Dans les deux cas, je n'ai pu observer, dans l'endocarde du poisson zèbre à 48hpf, une colocalisation de l'expression *trpv4* avec les cils primaires. Cette absence de colocalisation pourrait s'expliquer de plusieurs façons, notamment par l'absence de cils moteurs au niveau endocardique (Teilmann, Byskov et al. 2005) ou encore par le fait que peu de cellules endocardiques soient ciliées. Ne pouvant conclure avec certitude ces

résultats via ces méthodes, la confirmation ou infirmation de ces données sera effectuée avec la lignée transgénique surexprimant *trpv4*.



**Figure 30: Localisation de TRPV4 à la surface des cellules de l'endocarde, à 48hpf.** Projection maximale à 48hpf de poissons injectés avec 250ng/ $\mu$ l d'ADN *trpv4-mCherry*. Présence du myocarde (flèche jaune), de l'endocarde (flèche blanche) et de TRPV4 (triangle violet). (A-C) TRPV4 est localisé dans l'endocarde. (D-E-G) TRPV4 est localisé à la surface cellulaire.

Suite à la mise en évidence de l'expression de *trpv4* dans l'endocarde du poisson zèbre, j'ai voulu observer si ce dernier affectait l'expression génique de *klf2a* dans le canal atrioventriculaire.

## 2.2 TRPV4 affecte l'expression de *klf2a*

Afin d'observer si l'expression de *klf2a* varie en absence de *trpv4*, j'ai injecté les lignées transgéniques *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP) \* Tg(fli-NLS-mCherry) roy<sup>+/-</sup>* avec le morpholino *trpv4* (cf. matériel et méthodes).

Les poissons injectés présentent un petit œdème cardiaque ainsi qu'une forte hydrocéphalie (Figure 31), caractéristique du phénotype TRPV4, décrit par Köttgen et al en 2008. Les poissons présentent également une légère courbure de la queue vers, un retournement cardiaque incomplet mais une fréquence cardiaque et une circulation sanguine similaire à celle des poissons WT.

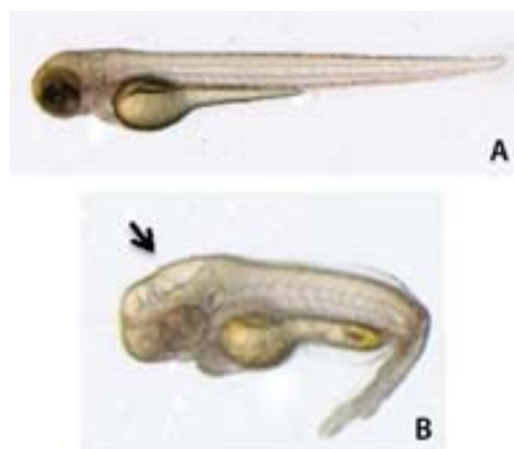
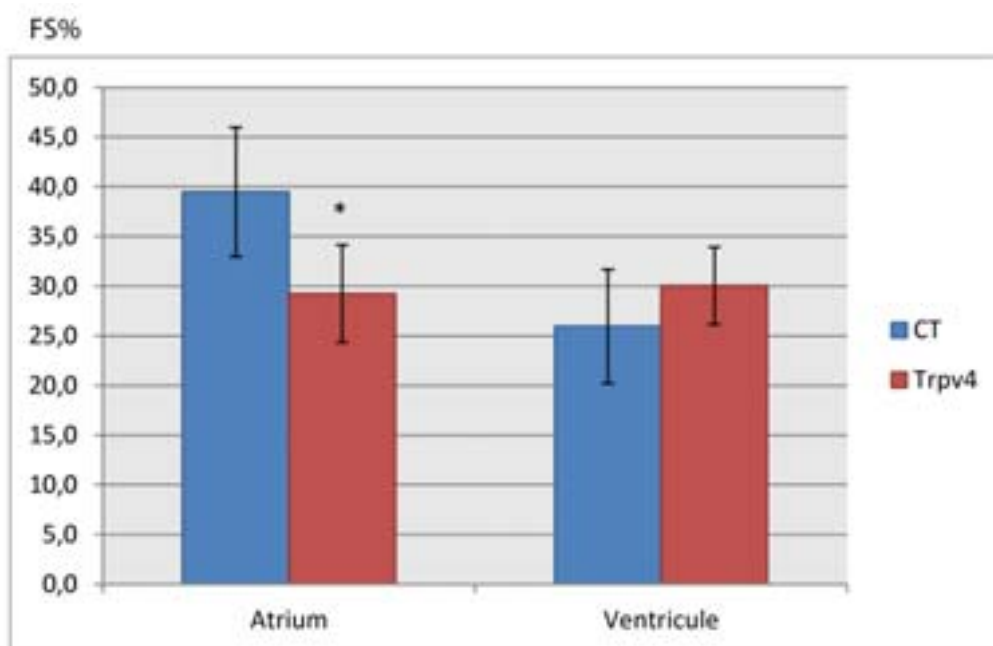


Figure 31 : Phénotype, à 48hpf, d'un poisson injecté avec le morpholino *trpv4*. (A) Poisson contrôle. (B) Hydrocéphalie marquée (flèche) chez un poisson injecté avec *trpv4*Mo. Image adaptée de Köttgen et al, 2008.

La mesure préalable de l'**efficacité de contraction** des poissons injectés avec le morpholino *trpv4*, imagés à la caméra rapide Sa3 (cf. matériel et méthodes) montre, en comparaison avec l'efficacité de contraction des poissons contrôles, un léger défaut contractile de l'atrium mais non du ventricule, à 48hpf. En effet, la capacité de contraction de l'atrium d'un poisson injecté avec *trpv4*Mo est de 29% contre 39,5% pour un poisson contrôle (Graph 16). Cette diminution n'empêche pas le sang d'être éjecté en totalité dans le ventricule et de circuler correctement dans le cœur du poisson. La contraction du ventricule n'est quant à elle pas atteinte et reste aux alentours de 30% (Graph 16, Annexe 1, vidéo n°14).

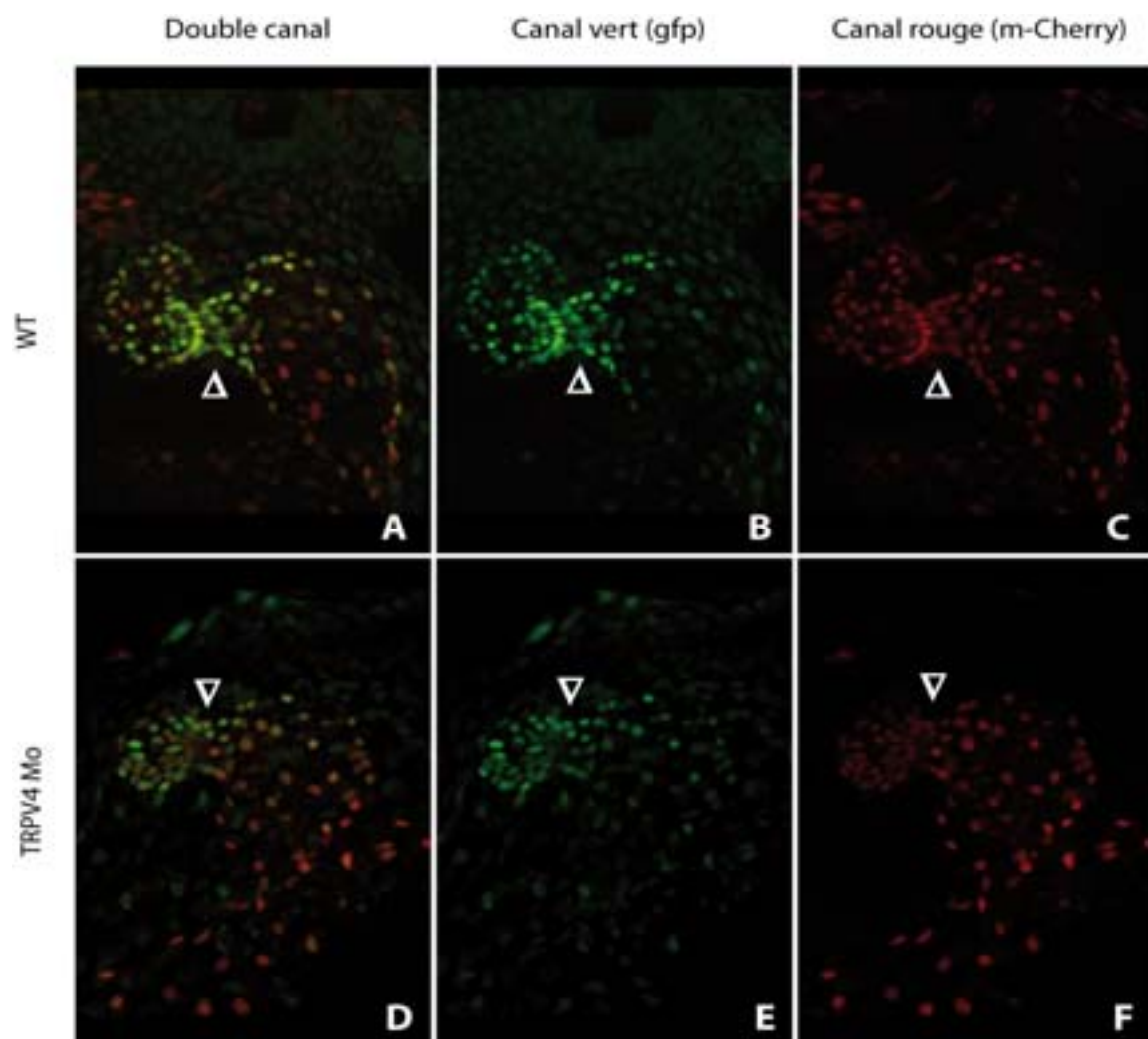


**Graph 16: Efficacité de contraction du morphant *trpv4*, à 48hpf.** Baisse significative de la contraction de l'atrium par rapport aux poissons contrôles (CT). La contraction du ventricule est normale. CT n=10, *trpv4*MO n=6. \*P<0,05.

Lors de l'observation de l'**expression du gène *kif2a*** ainsi que du **comptage cellulaire**, de larges différences sont visibles tant au niveau du nombre total de cellules (*Fluorescence*-

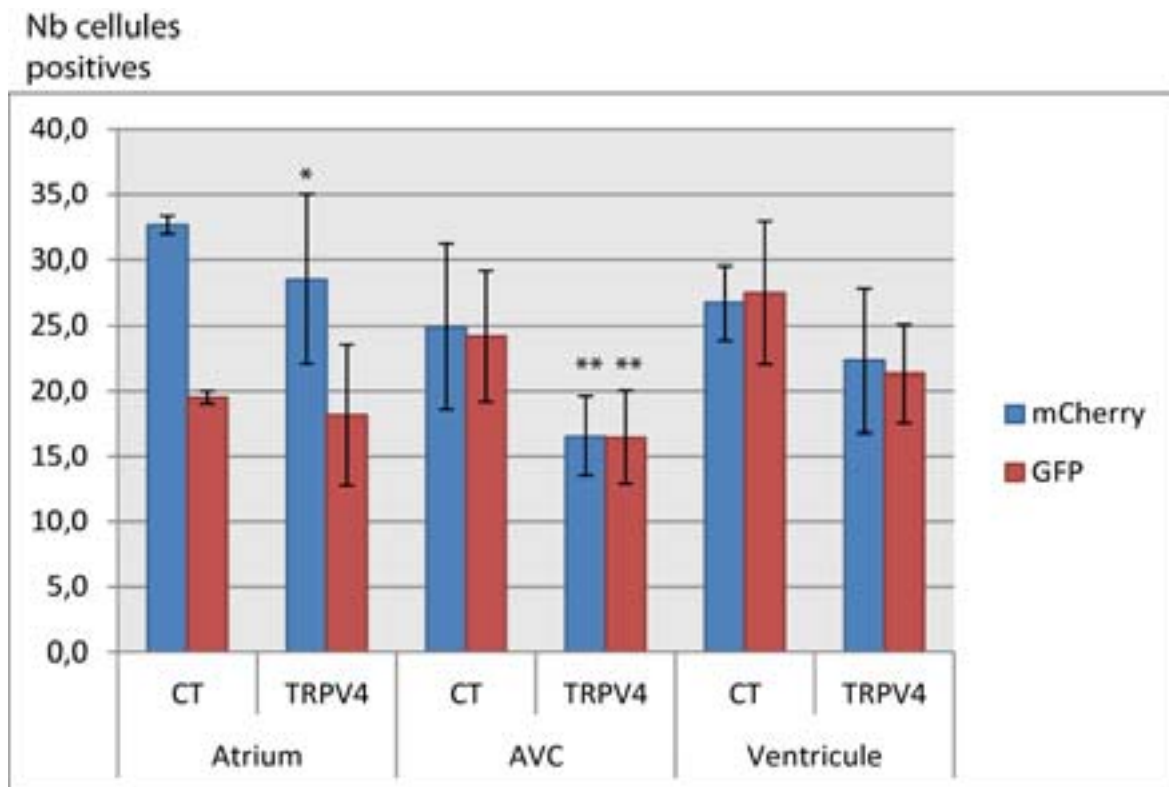


*mCherry*) que du nombre de cellules exprimant *klf2a* (cellules *gfp* positives) dans l'AVC. En effet, en comparaison avec les poissons non injectés à 48hpf, les poissons ayant reçu le morpholino présentent une baisse significative d'environ 34% du nombre total de cellules dans l'endocarde (*mCherry*) et du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans le canal atrio-ventriculaire. Une baisse de 13% du nombre de cellules totales dans l'atrium des morphants, à 48hpf est également visible (Figure 32 et Graphe 17).



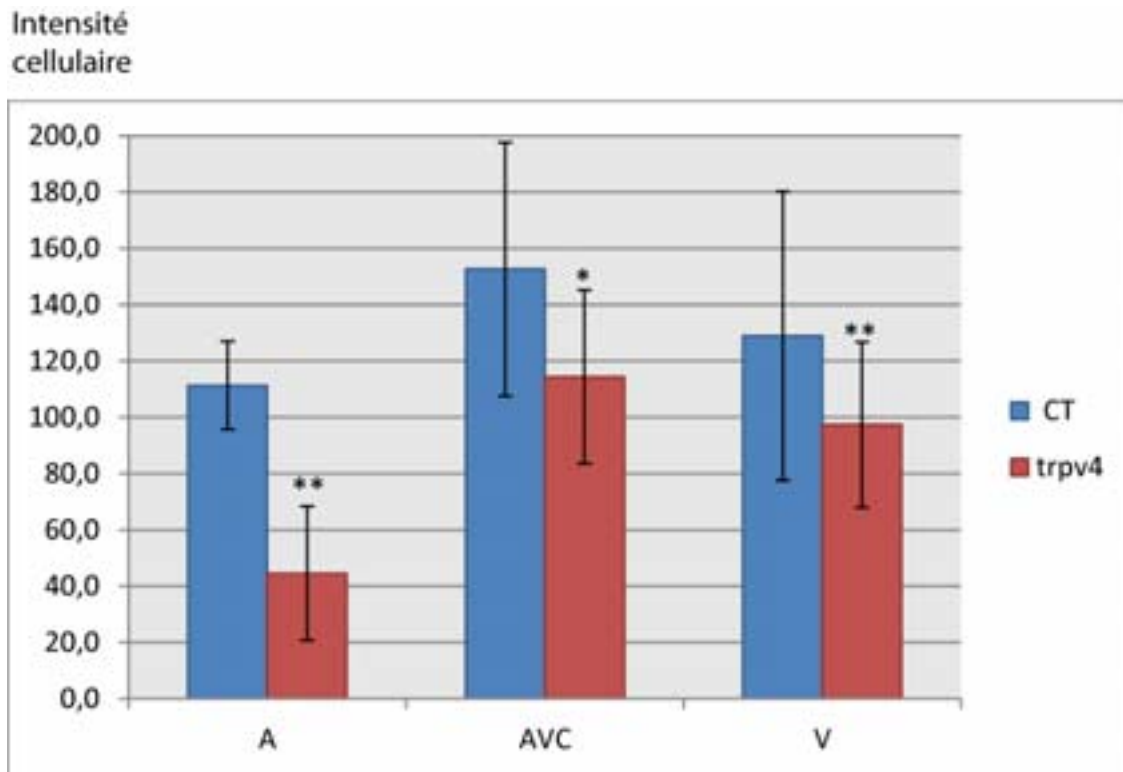
**Figure 32: Expression du gène *klf2a* et nombre total de cellules dans l'endocarde des morphants *trpv4*.** Projection maximale de cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons WT. (D-E) Le nombre de cellules dans l'AVC des morphants est diminué. (C et F) Le nombre total de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb :h2b-eGFP* dans l'endocarde est diminué dans l'AVC des morphants.





**Grphe 17: Comptage cellulaire après injection du morpholino *trpv4*.** Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) dans l'AVC et l'atrium et du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* (GFP) dans l'AVC des morphants en comparaison aux poissons contrôles (CT) à 48hpf. CT n=10, *trpv4MO* n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

Si nous regardons plus en détail les images montrées ci-dessus (Figure 31), ces dernières semblent présenter une expression *gfp* plus faible dans le cœur par rapport aux contrôles. Pour vérifier cela, j'ai mesuré l'intensité de fluorescence relevée par le transgène *klf2a* nucléaire au niveau des deux chambres cardiaques ainsi que dans l'AVC, à 48hpf. Le [graphe 18](#) présenté ci-dessous permet de mieux se rendre compte cette baisse. L'expression de l'intensité nucléaire du transgène *klf2a* est diminuée de façon significative au niveau de l'atrium (baisse de 64%), du ventricule (diminution de 27%), mais aussi au niveau de l'AVC (baisse de 25%) des poissons ayant été injectés avec *trpv4Mo* par rapport aux poissons contrôles.



**Graph 18: L'intensité du transgène *klf2a* nucléaire est diminuée chez les morphants *trpv4*, à 48hpf. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A), de l'AVC et du ventricule (V) des morphants en comparaison aux poissons contrôles. CT n=10, *trpv4* MO 4 n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.**

Ces résultats, une fois regroupés, nous permettent de confirmer la position en amont de *trpv4* par rapport au gène *klf2a*, ainsi que son importance dans le maintien de l'expression de ce gène à 48hpf.

### 2.3 L'absence de TRPV4 affecte la valvulogénèse

Afin de voir si la diminution du nombre de cellules totales, la baisse de cellules *gfp* positives ainsi que la faible expression du gène *klf2a* dans les poissons injectés avec le

morpholino *trpv4* impacte la formation des valves cardiaques, j'ai procédé à des techniques d'immunofluorescences permettant de visualiser la répartition cellulaire au niveau de l'AVC.

Pour ce faire, j'ai croisé entre eux les poissons de la lignée *Tg(fli-NLS-mCherry)* *nacre*<sup>+/-</sup> afin de marquer la totalité des noyaux endocardiques en rouge. Après sélection et fixation des poissons fluorescents à 72hpf en PFA 4% pendant trois heures, j'ai procédé selon la technique d'immunofluorescence décrite dans la partie matériel et méthodes. L'utilisation de l'anticorps primaire Zn-8 et secondaire GAM-Alexa488 permet de révéler les membranes cytoplasmiques entourant les cellules endocardiques en vert (expression *gfp* positive).

Ainsi, l'observation à 72hpf au microscope confocal sp5 permet de constater la présence de bourrelets endocardiques chez les poissons non injectés (Figure 33 A et C). Cette caractéristique cellulaire est légèrement marquée par la présence de Zn-8 (ou Dm-grasp) autour des cellules de l'AVC (Figure 33 A et B), indiquant la fin de la différenciation cellulaire décrite dans le processus d'EMT (Beis, Bartman et al. 2005). Contrairement aux *WT*, les poissons ayant reçu l'injection de morpholino *trpv4* ne présentent pas de bourrelets endocardiques à ce stade, mais un amoncellement de cellules marquées par la *m-Cherry* au niveau de l'AVC (Figure 33 D et F). Cet amas cellulaire est fortement marqué par le marqueur Zn-8 (Figure 33 D et E), permettant de mettre en évidence la différenciation cellulaire de ces cellules (Beis, Bartman et al. 2005). Afin d'observer si l'absence de *trpv4* entraîne un délai dans la formation des valves cardiaque ou un arrêt de la valvulogénèse, il faudrait observer l'AVC à des stades plus tardifs que 72hpf, expérience que je n'ai pas encore menée au laboratoire.

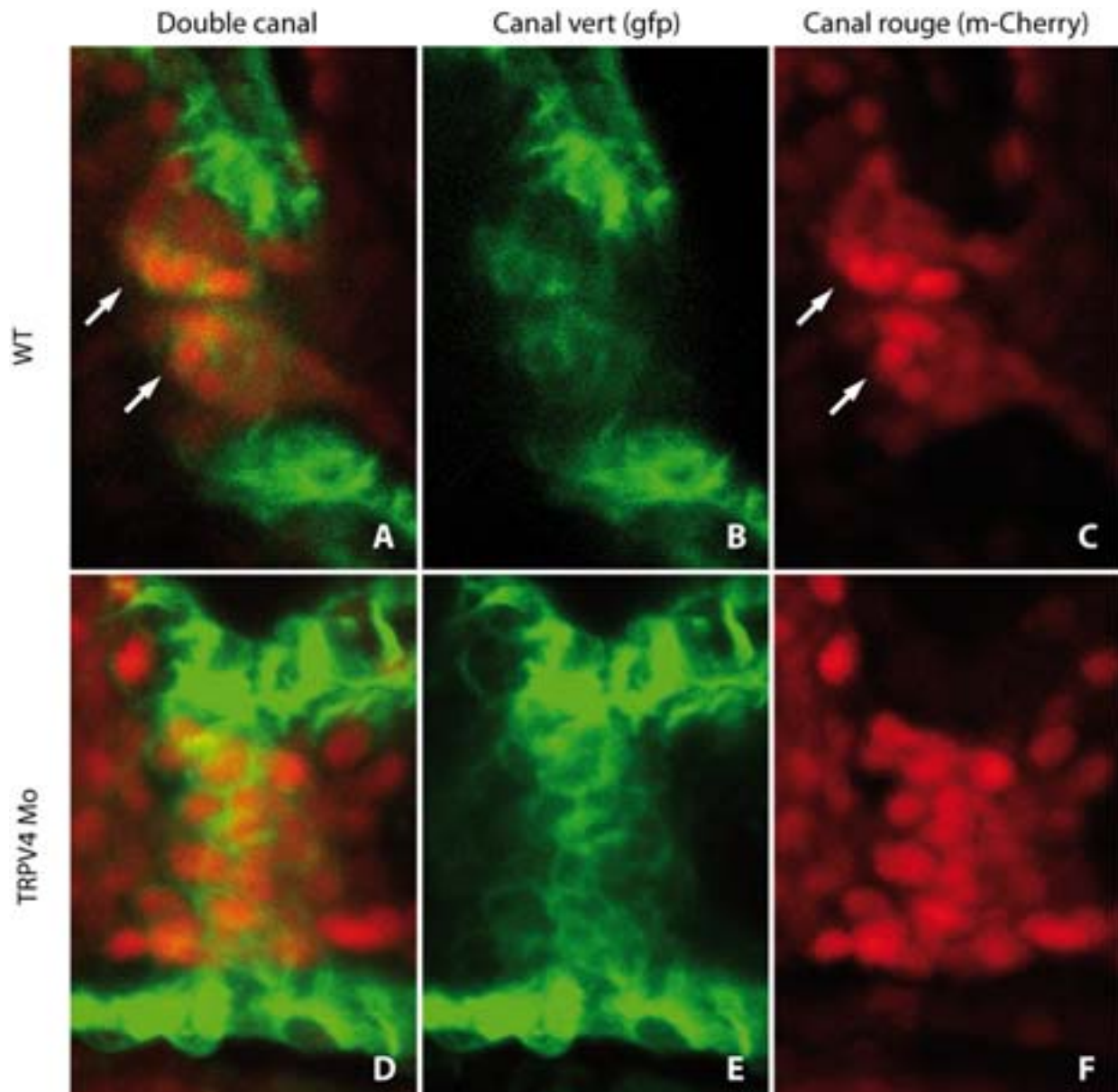


Figure 33: **L'absence de TRPV4 affecte la valvulogénèse.** (A et C) Présence de bourrelets endocardiques (flèches blanches) à 72hpf dans les poissons contrôles (WT) faiblement marqués par l'anticorps ZN8 à ce stade (B). Les poissons injectés avec *trpv4*Mo présentent une forte population cellulaire au niveau de l'AVC mais pas de bourrelets endocardiques (D et F). Le marquage Zn8 est très prononcé dans les morphants *trpv4* à 72hpf (E).

### 3 Conclusion

L'analyse de tous ces résultats permet d'impliquer *trpv4* dans le processus de la formation valvulaire. La confirmation de la localisation de *trpv4* au niveau de la surface des cellules endocardiques permet, (malgré l'absence de colocalisation avec les cils primaires), de supposer un rôle de senseur de flux par ces canaux membranaires. Les poissons injectés avec le morpholino *trpv4* présentent une hydrocéphalie importante ainsi qu'un retournement cardiaque incomplet accompagné d'une efficacité de contraction légèrement réduite au niveau de l'atrium, en comparaison aux *WT*. L'absence de *trpv4* impacte de façon dramatique le nombre de cellules totales et l'expression du gène *klf2a* au niveau du canal atrio-ventriculaire mais également le nombre de cellules totales dans l'atrium, à 48hpf. Basée sur les expériences menées lors de la caractérisation de la lignée transgénique *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP)*, une très faible proportion de ces baisses pourraient être justifiées par le fait que l'atrium présente une contraction moindre que celle des poissons contrôles. Cependant, la bonne éjection du sang dans le ventricule et la bonne circulation sanguine en général ne permet pas d'en faire la cause majeure de la diminution significative du nombre de cellules totales et de cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC dans les morphants. Les diminutions cellulaires citées ci-dessus ainsi que la réduction de l'intensité *gfp* cellulaire dans l'atrium, l'AVC et le ventricule, permettent de suggérer que TRPV4 se positionne en amont du gène *klf2a* et de mettre en évidence son importance pour l'expression et le maintien de l'expression de *klf2a* dans le cœur du poisson zèbre. Enfin, l'absence de bourrelets endocardiques et la mise en place de l'EMT, révélée par la forte expression de Zn-8 autour de l'amas cellulaire observé dans l'AVC à 72hpf des poissons injectés, renforce l'implication de *trpv4* dans le processus de valvulogénèse, ce qui n'est pas surprenant compte tenu du

rôle connu de *klf2a* dans le processus de maturation des valves cardiaques (Vermot et al, 2009).

Ayant un rôle dans la mécanodétection, il a été démontré que TRPV4 était capable de réagir avec d'autres protéines, dont TRPP2, un autre membre des TRPs.

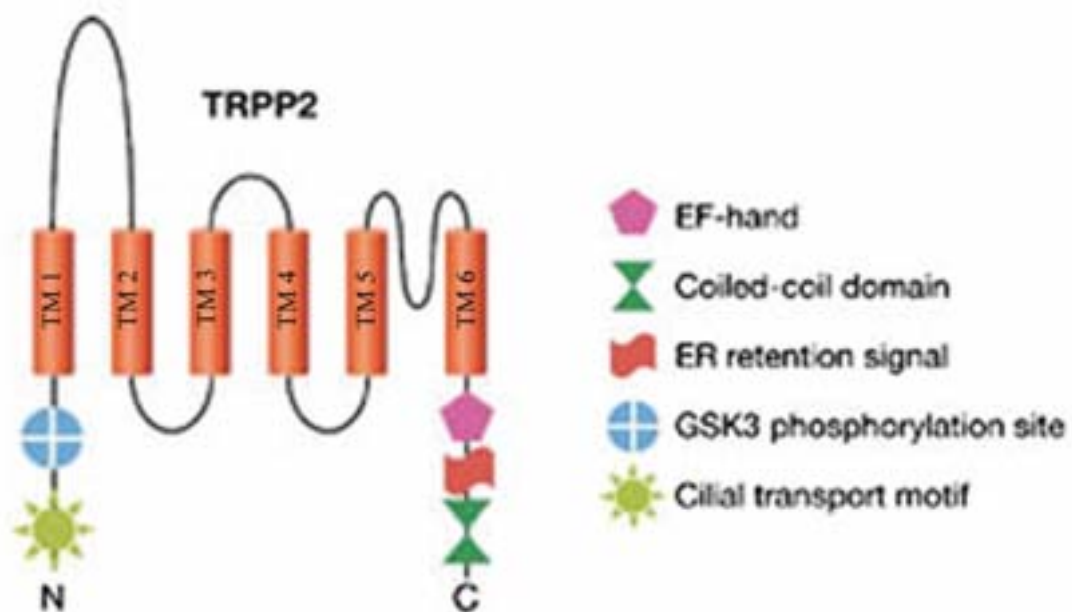
## 4 Etude approfondie de TRPP2

### 4.1 Introduction à TRPP2

Les Transient Receptor Potential cation channels polycystin ou TRPP font également partis de la grande famille des TRPs (Nilius and Voets 2005). Nommée ainsi suite à la découverte du gène *PKD2* ou polycystin kidney disease-2 (Mochizuki, Wu et al. 1996), cette sous famille est composée de trois protéines homologues ; *PKD2* ou TRPP2, *PKD2L1* ou TRPP3 et *PKD2L2* ou TRPP5 (Montell 2005). Les protéines polycystines sont retrouvées chez tous les êtres vivants et peuvent structurellement être séparées en deux groupes ; les PKD1-like proteins et les PDK2 (TRPP2)-like proteins (Delmas, Nomura et al. 2002; Delmas 2004).

Codé par le gène *PKD2*, TRPP2 diffère de par sa structure des autres protéines TRPP citées ci-dessus. En effet, cette protéine, formée de 968 aA, est la seule à posséder, du côté C-terminal, un site de liaison au calcium (EF-hand motif) ainsi qu'un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique (ER) et une hélice  $\alpha$  plus longue entre les composés transmembranaires (TM) TM1 et TM2 (Figure 34). Malgré la présence des six motifs

transmembranaires, aucune répétition d'ankyrine n'est retrouvée au niveau de cette structure, différence notable avec les autres membres des TRPs. Le pore membranaire permettant le passage d'ions mono- ou bivalents est retrouvé, comme pour TRPV4, entre les structures TM5 et TM6 (Figure 34). La présence d'éléments protéiques acides dit Phosphofurin acidic cluster proteins ou PACS1 et PACS2 au niveau du C-terminal permet le transport de TRPP2 du réticulum endoplasmique vers les autres compartiments cellulaires (Kottgen, Benzing et al. 2005). D'autres éléments comme un domaine coiled-coil (C-c) permettant la liaison à divers TRPs, comme PKD1 (Qian, Germino et al. 1997; Tsiokas, Kim et al. 1997), ainsi qu'un site de phosphorylation et de liaison au cil primaire sont retrouvés du côté N-terminal.



**Figure 34: Structure de TRPP2.** Présence d'un domaine C-terminal incluant un site Coiled-coil, un site de rétention pour le réticulum endoplasmique et un site de liaison au calcium (EF hand). Présence d'une longue hélice  $\alpha$  entre les sites TM1 et TM2 ainsi qu'un pore membranaire entre les sites transmembranaires TM5 et TM6. Présence en C-terminal d'un site de phosphorylation GSK3 ainsi que d'un site de liaison au cil. Image adaptée de Giamarchi et al., *Nature* 2006.

De par sa structure et son appartenance à la famille des TRPs, TRPP2 est décrit comme un canal permettant le passage d'ions, le calcium en particulier, au niveau des diverses structures cellulaires (Delmas, Padilla et al. 2004). La mutation de cette protéine entraîne une polykystose rénale autosomique dominante ou ADPKD (Mochizuki, Wu et al. 1996) et touche près d'une naissance sur mille (Gabow 1993; Grantham 1993). Cette mutation, responsable d'environ 15% des ADKPD (Rossetti and Harris 2007), entraîne la formation de kystes hépatiques mais aussi des anévrismes des artères cérébrales et des anomalies cardiaques comme le prolapsus de la valve mitrale (Gabow 1993; Wilson 2004). Cette mutation est également responsable d'un défaut de symétrie gauche-droite lors du développement embryonnaire de la souris (Pennekamp, Karcher et al. 2002) et résulte en une mort in utéro de l'embryon (Wu, Hayashi et al. 1998).

**L'expression du gène TRPP2** est retrouvée dans la majorité des tissus épithéliaux, comme les reins, et les muscles vasculaires lisses de la souris (Ong 2000). Plus intéressant encore, TRPP2 a été décrit comme étant exprimé lors du développement et de la maturation du système cardiovasculaire. Ainsi, l'expression de cette protéine est présente dans les ECs de l'aorte, des artères intracrâniennes (Griffin, Torres et al. 1997; Boulter, Mulroy et al. 2001), mais aussi au niveau des myocytes ventriculaires du rat (Volk, Schwoerer et al. 2003). De manière générale, TRPP2 est une protéine membranaire principalement retrouvée au niveau des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique des cellules (Cai, Maeda et al. 1999) où son rôle consiste, après activation par le calcium (Koulen, Cai et al. 2002), à réguler le relâchement calcique de cette cavité, en vue de contrôler l'apoptose cellulaire (Koulen, Cai et al. 2002; Wegierski, Steffl et al. 2009). Dans la cellule, TRPP2 a été observé au niveau des fuseaux mitotiques et au niveau de la membrane plasmique basolatérale



(Foggensteiner, Bevan et al. 2000; Rundle, Gorbsky et al. 2004). Chez le poisson zèbre, la protéine PKD2 a été localisée dans les bandes sarcomériques des fibres musculaires (Obara, Mangos et al. 2006) ainsi que dans le cil primaire (Yoder, Hou et al. 2002; Nauli, Alenghat et al. 2003). Il a été montré chez *C.elegans*, que TRPP2, localisé au niveau de cils neuronaux, régulate le comportement reproductif du ver mâle (Barr and Sternberg 1999; Barr, DeModena et al. 2001). D'autres études, menées dans des cellules endothéliales de rein de souris (Nauli, Alenghat et al. 2003) ont permis de visualiser l'implication de TRPP2 couplé au cil dans la détection fluidique. En utilisant des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire (hélice  $\alpha$ ) de la polycystine 2, Nauli et ses collaborateurs ont été capables d'observer, en se basant sur la capacité du canal TRPP2 à faire entrer les ions calciques dans la cellule, l'absence totale d'influx calcique en réponse au flux, dans des cellules WT. Ces données, qui sont à l'opposées de celles obtenues dans les cellules WT présentant un canal TRPP2 viable, permettent d'impliquer le rôle de TRPP2 à la base du cil dans la mécanosensation fluidique (Nauli, Alenghat et al. 2003). Des données complémentaires admettent ces mêmes implications au niveau du rein et dans le système cardiaque de la souris (Praetorius and Spring 2001; Pennekamp, Karcher et al. 2002).

**La localisation de TRPP2** au niveau du réticulum endoplasmique (Cai, Maeda et al. 1999) est sujette à un trafic cellulaire s'effectuant entre le ER et la membrane plasmique de la cellule. En effet, afin d'assurer la régulation de l'homéostasie ionique et la transmission du signal intracellulaire, Köttgen et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'un mouvement de TRPP2 dans la cellule. Via la liaison des PACS-1 et PACS-2 (Figure 34) au niveau des structures acides du côté C-terminal de la protéine, la translocation de TRPP2 s'effectue vers la membrane plasmique (Hanaoka, Qian et al. 2000). Le phénomène de

liaison des PACS décrit ci-dessus dépend de la phosphorylation de la sérine Ser812 par la protéine kinase caséine-kinase 2, au niveau du site de phosphorylation GSK3 (Figure 27). L'absence de phosphorylation entraîne la rétention de TRPP2 dans le réticulum endoplasmique via son site de liaison à ce dernier (Koulen, Cai et al. 2002; Cai, Anyatonwu et al. 2004).

C'est au niveau de ces structures cellulaires que **TRPP2 est capable de se lier à d'autres protéines** afin d'accomplir son rôle au sein de la cellule. La liaison la mieux décrite à ce jour reste celle de TRPP2-PDK1. Cette liaison, s'effectuant par l'intermédiaire des sites coiled-coil du côté C-terminal de chaque protéine (Qian, Germino et al. 1997; Tsiokas, Kim et al. 1997) (Figure 34), permet au complexe de fonctionner comme un canal récepteur d'ions ; PDK1 jouant le rôle de récepteur et TRPP2 celui de canal (Hanaoka, Qian et al. 2000; Delmas, Nomura et al. 2002; Delmas 2005). Ainsi, et après activation de certaines protéines G par PKD1 (Delmas, Nomura et al. 2002), ce complexe est capable de jouer plusieurs rôles majeurs indispensables pour la cellule. La sensation par le complexe le long des cils détectant le flux nodal chez la souris, serait alors responsable de la répartition gauche-droite des viscères dans les modèles murins (Pennekamp, Karcher et al. 2002; McGrath, Somlo et al. 2003). Bien que personne n'ait démontré le rôle exact de l'inclinaison du cil dans la mécanosensation, la détection du shear stress au niveau des cils primaires de la membrane plasmique des cellules épithéliales serait ainsi reliée à cette inclinaison en fonction du flux et à la présence du complexe TRPP2-PKD1 (Praetorius and Spring 2001; Nauli, Alenghat et al. 2003). Cependant, il a été démontré que l'absence dans le cil primaire de PKD1 permettait tout de même la mise en place de la latéralité chez les souris (Karcher, Fischer et al. 2005),

indiquant la capacité de TRPP2 à sentir de façon autonome, les divers signaux engendrés à la surface cellulaire.

Outre sa capacité à se lier à la protéine PKD1, il a récemment été montré que TRPP2 était capable de se lier à la protéine TRPV4 (Kottgen, Buchholz et al. 2008) au niveau du cil primaire. Afin de tester l'hypothèse de la formation d'un complexe polymodal et sensible de canaux suite à la liaison avec TRPV4, Kottgen et ses collaborateurs ont testé la fonction de thermosensation en exprimant les deux protéines dans les oocytes de *Xenopus laevis* et en observant la valeur du courant calcique induit dans ces cellules. Ainsi, les auteurs ont observés, par électrophysiologie, une large augmentation de ce dernier dans les oocytes lorsque TRPP2 est lié à TRPV4. D'autres tests menés chez la souris afin de tester la sensation à la chaleur de ces dernières en absence de TRPV4 (Liedtke, Tobin et al. 2003; Mizuno, Matsumoto et al. 2003) ont également été menés. Le test de résistance à la chaleur chez les souris démontre une augmentation significative du temps d'immersion de la queue de la souris dans l'eau à 46°C dans les souris TRPV4<sup>-/-</sup> TRPP2<sup>-/-</sup> ou TRPP2<sup>+/-</sup> par rapport aux souris TRPV4<sup>-/-</sup> TRPP2<sup>+/-</sup> (Kottgen, Buchholz et al. 2008). Ces données suggèrent donc toutes deux la formation d'un complexe polymodal et sensible entre les canaux TRPP2 et TRPV4.

Suite à ces observations, j'ai émis l'hypothèse que TRPP2 pouvait être impliqué dans le mécanisme de mécanodétection endocardique. J'ai donc analysé la localisation de la protéine PKD2, son rôle sur l'expression du gène *klf2a* et la formation des valves cardiaques.

J'ai ensuite analysé l'effet de l'injection d'un double morpholino (TRPV4-TRPP2) sur l'expression endocardique de *klf2a*.

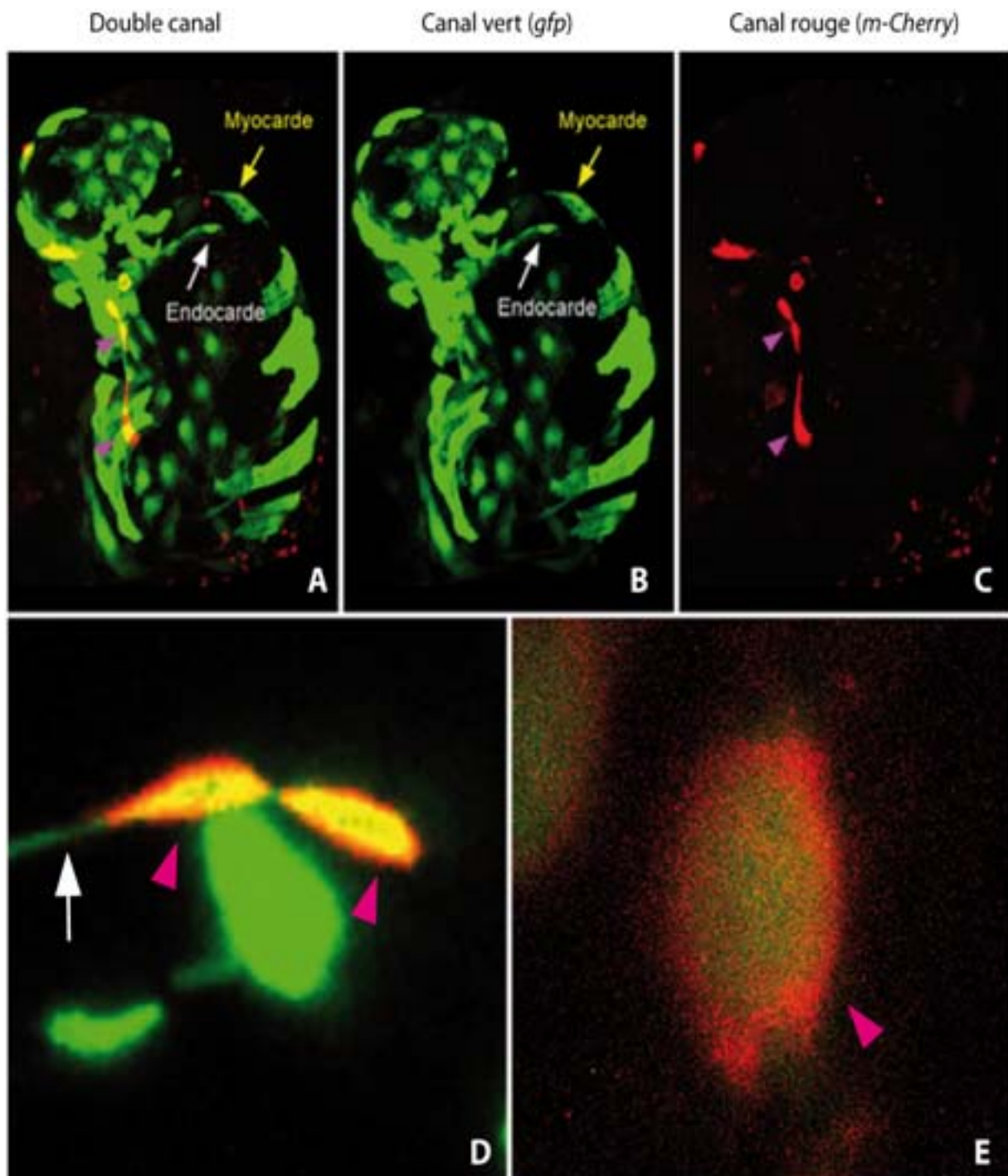
## 4.2 TRPP2 est localisé dans le cytoplasme cellulaire des cellules endocardiques

Afin d'analyser la localisation cellulaire de TRPP2, j'ai croisé la lignée *Tg(UAS\_arl13b-RFP: cm1c2-eGFP)*, permettant le marquage du myocarde en vert et des structures ciliées en rouge (*RFP*), avec la lignée *Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)* marquant l'endocarde en vert (*gfp*), grâce au système Gal4-UAS. L'injection d'ADN *Tol2-PKD2-mCherry* au stade une cellule (Cf. matériel et méthodes) permet de sélectionner les poissons présentant à 48hpf les deux caractéristiques citées ci-dessus et d'observer, après traitement des poissons en 2,3-BDM pendant dix minutes, la répartition cellulaire de TRPP2.

L'analyse des images obtenues au microscope confocal SP5 montrent la présence de TRPP2 au niveau des cellules atriales et ventriculaires de l'endocarde (Figure 35 A-C). Comme pour TRPV4, aucune expression n'est retrouvée dans le myocarde. A plus fort grossissement, nous pouvons apercevoir la localisation cytoplasmique de TRPP2 (Figure 35 D-E). Suite aux données générées par d'autres laboratoires (Cai, Maeda et al. 1999), nous pouvons supposer que TRPP2 se situe au niveau du réticulum endoplasmique des cellules.

Lors de la visualisation de l'expression de TRPP2 dans l'endocarde du poisson zèbre, je n'ai pu mettre en évidence une colocalisation avec le cil primaire à 48hpf. Cependant, comme pour TRPV4, le faible nombre de cellules ciliées dans l'endocarde du poisson à 48hpf ne permet pas de confirmer ces observations avec certitude. Afin de confirmer ou infirmer

ces données préliminaires, la génération de lignées transgéniques surexprimant TRPP2 est en cours.



**Figure 35: Localisation de TRPP2 dans le cytoplasme des cellules de l'endocarde.** Projection maximale à 48hpf de poissons injectés avec 250ng/ $\mu$ l d'ADN *trpp2*-mCherry. Présence du myocarde (flèche jaune), de l'endocarde (flèche blanche) et de TRPP2 (triangle violet). (A-C) TRPP2 est localisé dans l'endocarde. (D-E) TRPP2 est localisé dans le cytoplasme des cellules endocardiques.

### 4.3 TRPP2 affecte l'expression de *klf2a*

Pour tester l'expression du gène *klf2a* en l'absence de la protéine PKD2, j'ai croisé les lignées transgéniques *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP) \* Tg(fli-NLS-mCherry) roy+/-* permettant le marquage du nombre total de cellules endocardiques en rouge (*m-Cherry*) et marquant les cellules exprimant *klf2a* en vert (*gfp*). J'ai ensuite analysé l'effet d'un morpholino dirigé contre *pkd2* (cf matériel et méthodes) dans ces animaux.

Après Knock down, les embryons âgés de 48hpf présentent un œdème péricardique ainsi qu'un retournement cardiaque incomplet. Cependant, l'atrium et le ventricule contractent normalement et la circulation s'effectue correctement entre les chambres cardiaques et le reste de l'animal. Une particularité des poissons injectés avec ce morpholino résulte en une queue recourbée vers le haut (Figure 36) aussi observé dans la plupart des mutants connus de *pkd2* (Giamarchi, Feng et al. 2010; Mangos, Lam et al. 2010). Le nombre de contractions cardiaques est également diminué (148 bpm) par rapport aux poissons contrôles (188 bpm), ce qui corrèle avec les observations menées par Paavola et son laboratoire (Paavola, Schliffke et al. 2013).

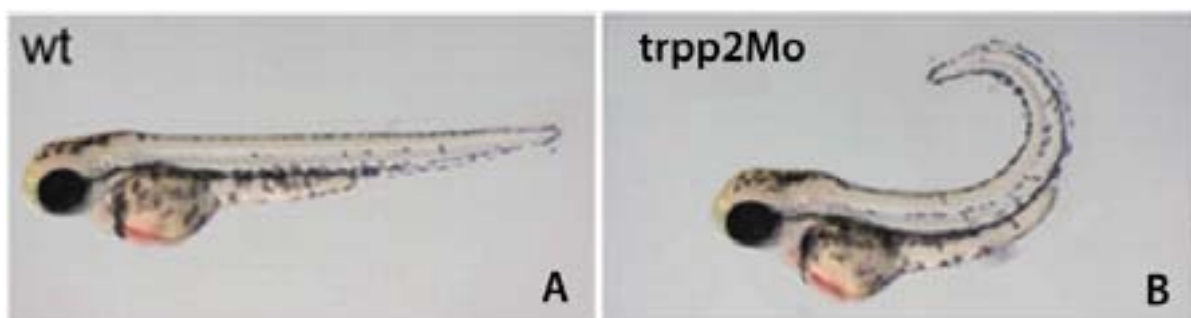
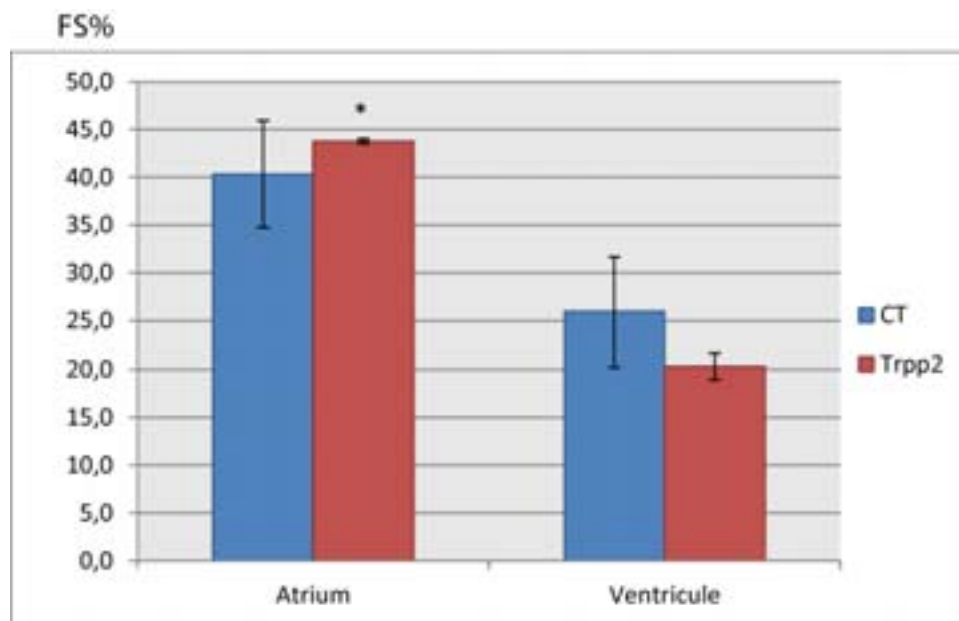


Figure 36 : Phénotype, à 48hpf, d'un poisson injecté avec le morpholino *trpp2*. (A) Poisson contrôle. (B) Poisson injecté avec le morpholino *trpp2*. Image adaptée de Schottenfled et al, 2007.

La mesure du **fractional shortening** révèle une augmentation significative de la contraction de l'atrium par rapport à la contraction atriale chez les poissons contrôles, à 48hpf. En effet, malgré un retournement cardiaque incomplet, la contraction atriale chez les poissons injectés avec *trpp2Mo* augmente de près de 7% par rapport aux contrôles (Graphe 19; Annexe 1, vidéo n° 2 et n°15). Le ventricule n'est pas atteint et présente une efficacité de contraction similaire à celle des *WT*.



**Graphe 19: Efficacité de contraction cardiaque du morphant *trpp2* à 48hpf.** L'efficacité de l'atrium chez les poissons injectés avec *trpp2Mo* est significativement augmentée par rapport aux poissons contrôles (CT). La contraction du ventricule n'est pas affectée et est similaire à celles des poissons contrôles. CT n=10, *trpp2MO* n=5. \*P<0,05.

**L'expression du gène *klf2a*** en absence de TRPP2 est réduite par rapport aux poissons contrôles. Lors de l'observation à la loupe binoculaire, nous pouvons déjà noter qu'une baisse du signal *gfp* au niveau de l'AVC est d'ores et déjà visible chez les morphants à 48hpf. (Figure 37 B et E).



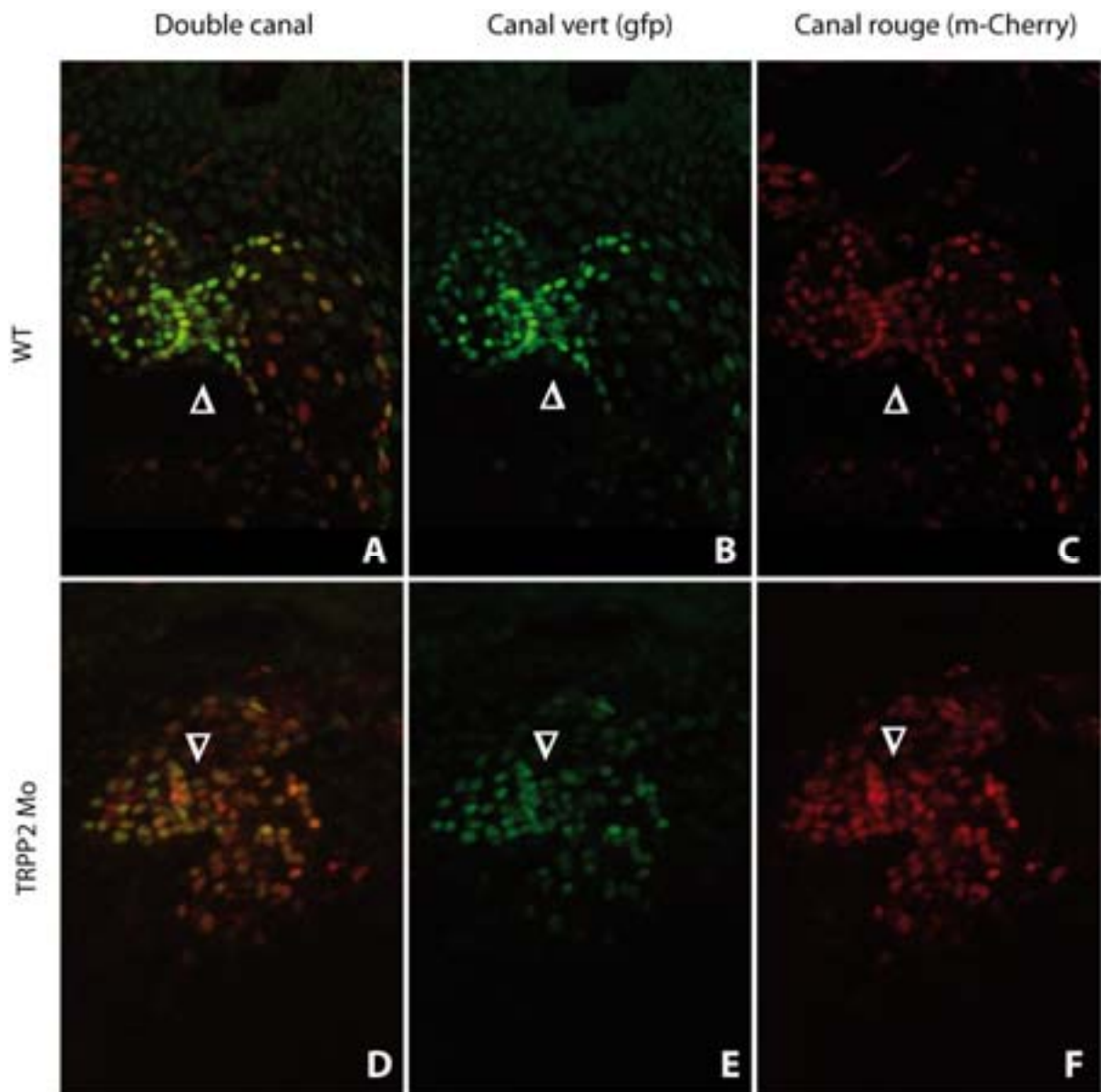
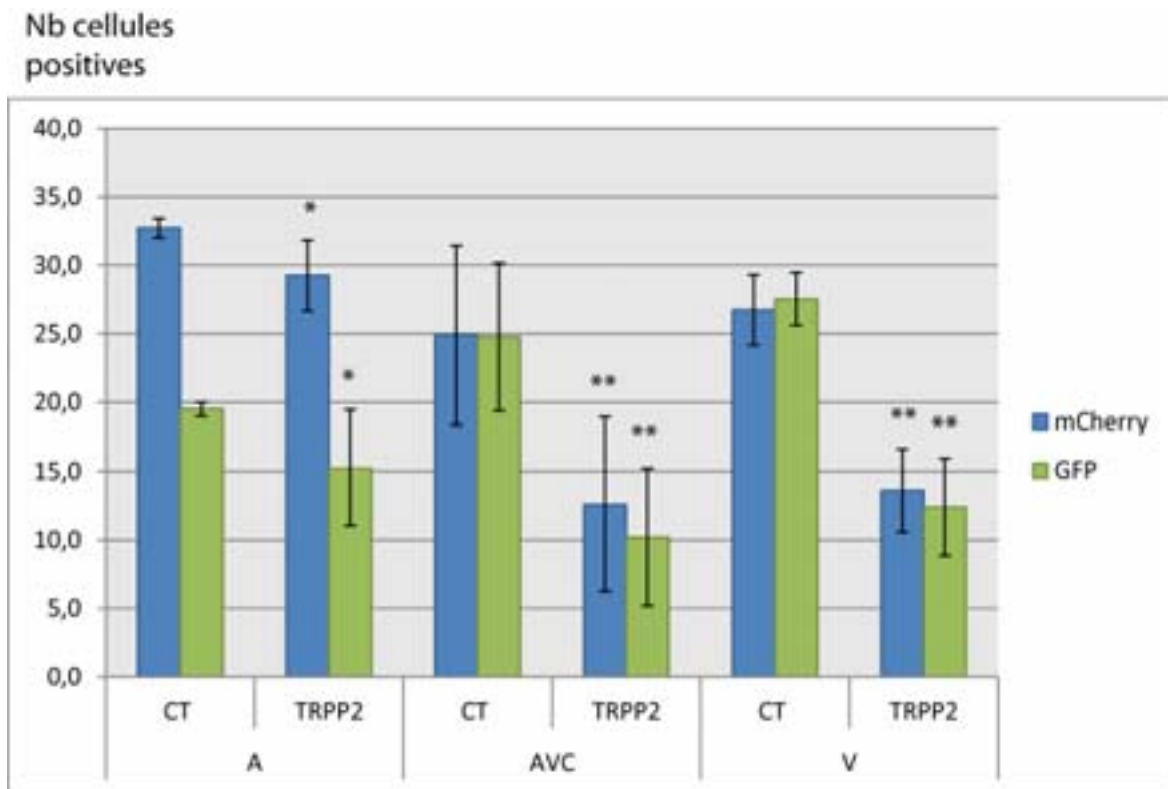


Figure 37: Expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants *trpp2* à 48hpf. Projection maximale de cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (D-E) Le nombre de cellules au niveau de l'AVC des morphants est diminué. (C-F) Visualisation du nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde des morphants et contrôles.

Lors du **comptage cellulaire**, le nombre total de cellules dans l'endocarde des poissons injectés avec *trpp2*Mo ainsi que le nombre de cellules exprimant la *gfp* sont significativement diminués dans les deux chambres cardiaques ainsi que dans l'AVC par rapport aux poissons *WT* (Graphe 20). L'AVC est la région la plus atteinte en l'absence de TRPP2. En effet, nous pouvons observer une baisse de près de 60% des cellules exprimant le



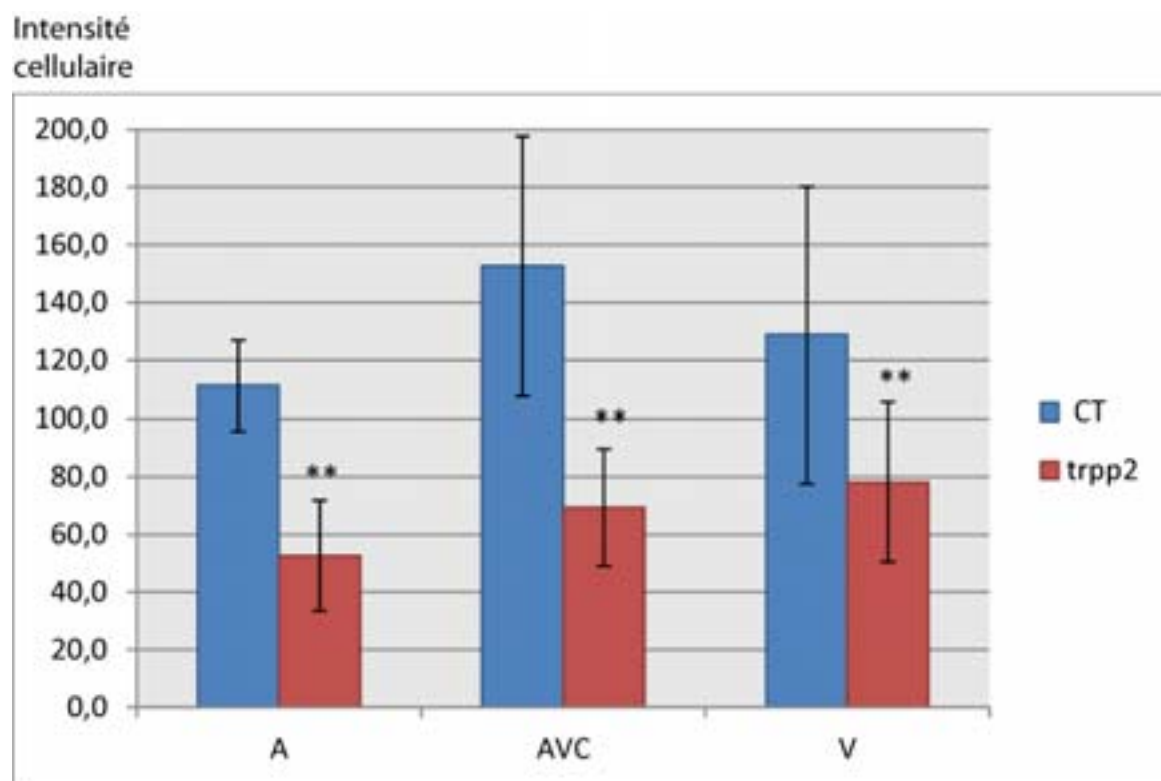
promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* et une diminution d'environ 50% du nombre de cellules totales dans l'endocarde des morphants en comparaison aux poissons contrôles.



**Grphe 20: Comptage cellulaire après injection du morpholino *trpp2*, à 48hpf.** Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) et du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* (GFP) dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des morphants. CT n=10, *trpv4MO* n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

Si nous observons mieux les images de la Figure 37, nous pouvons déjà apercevoir une baisse de l'intensité dans l'AVC de la *gfp* des poissons injectés avec le morpholino *trpp2* (Figure 37 E) par rapport aux poissons contrôles (Figure 37 B).

La mesure de l'intensité de fluorescence nucléaire du transgène *klf2a* au niveau du canal atrioventriculaire révèle une baisse de plus de 50% de l'intensité *gfp* au niveau des cellules composant l'atrium et l'AVC et une diminution d'environ 40% de l'intensité des cellules exprimant le transgène *klf2a* pour le ventricule.



**Graphe 21: Mesure de l'intensité de fluorescence du transgène *klf2a* dans les noyaux endocardiques des morphants *trpp2*, à 48hpf. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A), de l'AVC et du ventricule (V) des morphants par rapport aux contrôles. CT n=10, *trpp2* n=6. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.**

Ces importantes diminutions démontrent l'implication de TRPP2 dans l'expression du gène *klf2a*, et suggère que TRPP2 est positionné en amont dans la cascade de régulation de *klf2a*.

#### 4.4 L'absence de TRPP2 affecte la valvulogénèse

De la même façon que pour TRPV4, j'ai voulu observer l'impact provoqué par l'absence de TRPP2 sur la valvulogénèse.

Afin d'analyser le développement des valves à 72hpf, j'ai utilisé les embryons de la lignée *Tg(fli-NLS-mCherry) nacre<sup>+/-</sup>* qui marquent la totalité des noyaux endocardiques en rouge. Après fixation, j'ai procédé à un marquage cellulaire en utilisant l'anticorps primaire Zn-8 et secondaire GAM-Alexa488 afin de révéler les membranes cytoplasmiques entourant les cellules endocardiques en vert (expression *alexa 488* positive ; procédé selon la technique d'immunofluorescence décrite dans la partie matériel et méthodes).

L'observation des projections maximales nous permettent de distinguer la présence de bourrelets endocardiques au niveau de l'AVC des poissons contrôles (Figure 38 A et C) ainsi qu'un marquage léger du Zn-8 indiquant, comme lors de l'observation avec TRPV4, la fin de différenciation cellulaire dans cette région (Beis, Bartman et al. 2005). La présence de cellules compactes ne formant pas les prémises des bourrelets endocardiques est détectée au niveau du canal atrioventriculaire des poissons injectés avec le morpholino *trpp2* (Figure 38 D et F). Les cellules sont situées dans l'AVC et sont fortement marquées par le marqueur membranaire Zn-8, indiquant alors une différenciation cellulaire encore en cours (Beis, Bartman et al. 2005).

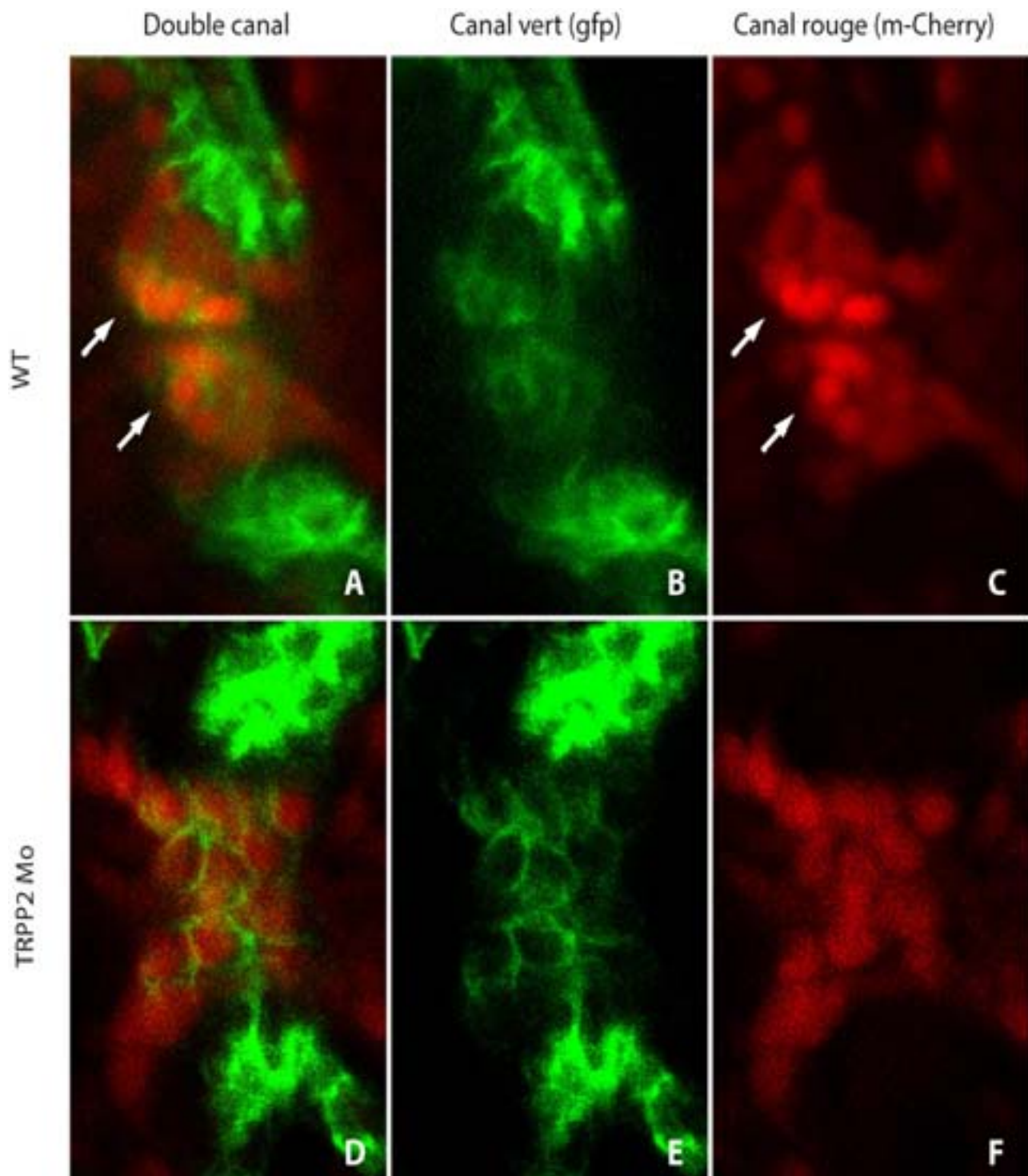


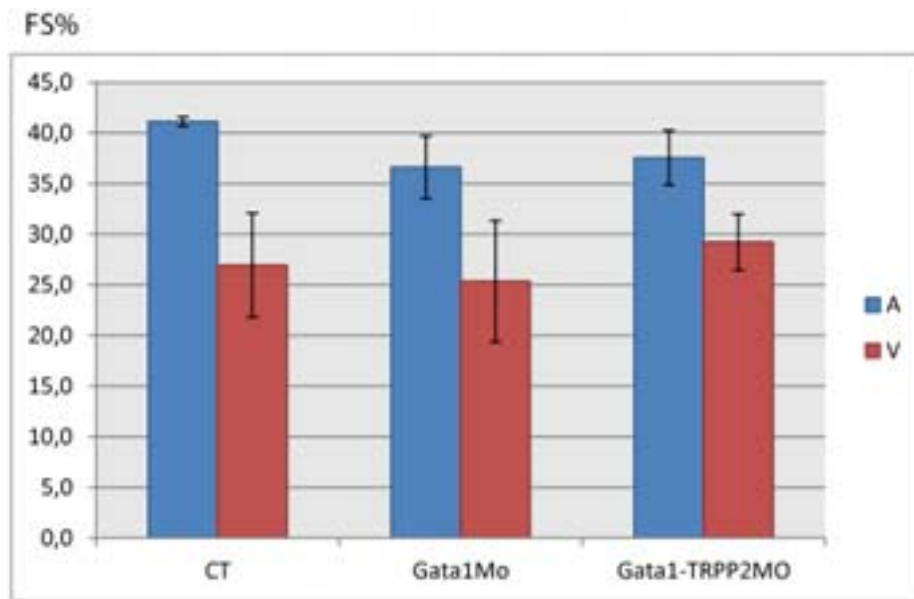
Figure 38: **L'absence de TRPP2 affecte la valvulogénèse.** (A et C) Présence de bourrelets endocardiques (flèches blanches) à 72hpf dans les poissons contrôles (WT) et marquage faible des cellules de l'AVC par l'anticorps Zn-8 (B). Les poissons injectés avec *trpp2*Mo présentent une forte population cellulaire au niveau de l'AVC mais pas de bourrelets endocardiques (D et F). Le marquage Zn-8 est assez prononcé dans les morphants à 72hpf (E).

#### 4.5 TRPP2 est flux-dépendant

Si la mécanodétection du flux par TRPV4 est à ce jour bien démontrée (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007), des questions se posent quant à la capacité de TRPP2 à sentir ce flux au niveau des cellules endocardiques du poisson zèbre. Afin de répondre à cette question, j'ai injecté un double morpholino ; *TRPP2-Gata1* dans les lignées transgéniques *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP) \* Tg(fli-NLS-mCherry) roy+/-*. Le choix de l'injection du morpholino *TRPP2* avec le morpholino *gata1* a été fait suite aux données générées par ce dernier sur l'expression du gène *klf2a*. En effet, connu pour réduire la viscosité sanguine (Galloway, Wingert et al. 2005), ce morpholino a également montré une augmentation du flux reversant au niveau du canal atrioventriculaire (Vermot, Forouhar et al. 2009) ayant pour conséquence une surexpression du gène *klf2a* (Vermot, Forouhar et al. 2009) (cette étude partie Résultats Chapitre 1) dans cette zone cardiaque. Cet excès de mécanodétection par les morphants *gata1* co-injectés avec le morpholino *trpp2* permettra donc de déceler directement le rôle de TRPP2 vis-à-vis du shear stress.

Les poissons injectés avec ce double morpholino présentent au stade 48hpf, un œdème cardiaque ainsi qu'un cœur mal retourné. Comme lors de l'injection de *trpp2*Mo seul, la courbure anormale de la queue est également présente et le nombre de battements cardiaques légèrement diminué par rapport aux poissons contrôles (170bpm vs 188bpm).

La mesure du **fractional shortening** à 48hpf pour les poissons injectés avec le double morpholino ne montre aucun défaut de contraction cardiaque atriale ni ventriculaire. Les valeurs obtenues sont similaires à celles des contrôles mais aussi à celles mesurées pour le morpholino *gata1* injecté seul (Graphe 22; Annexe 1, vidéo n° 2, n°8 et 16).

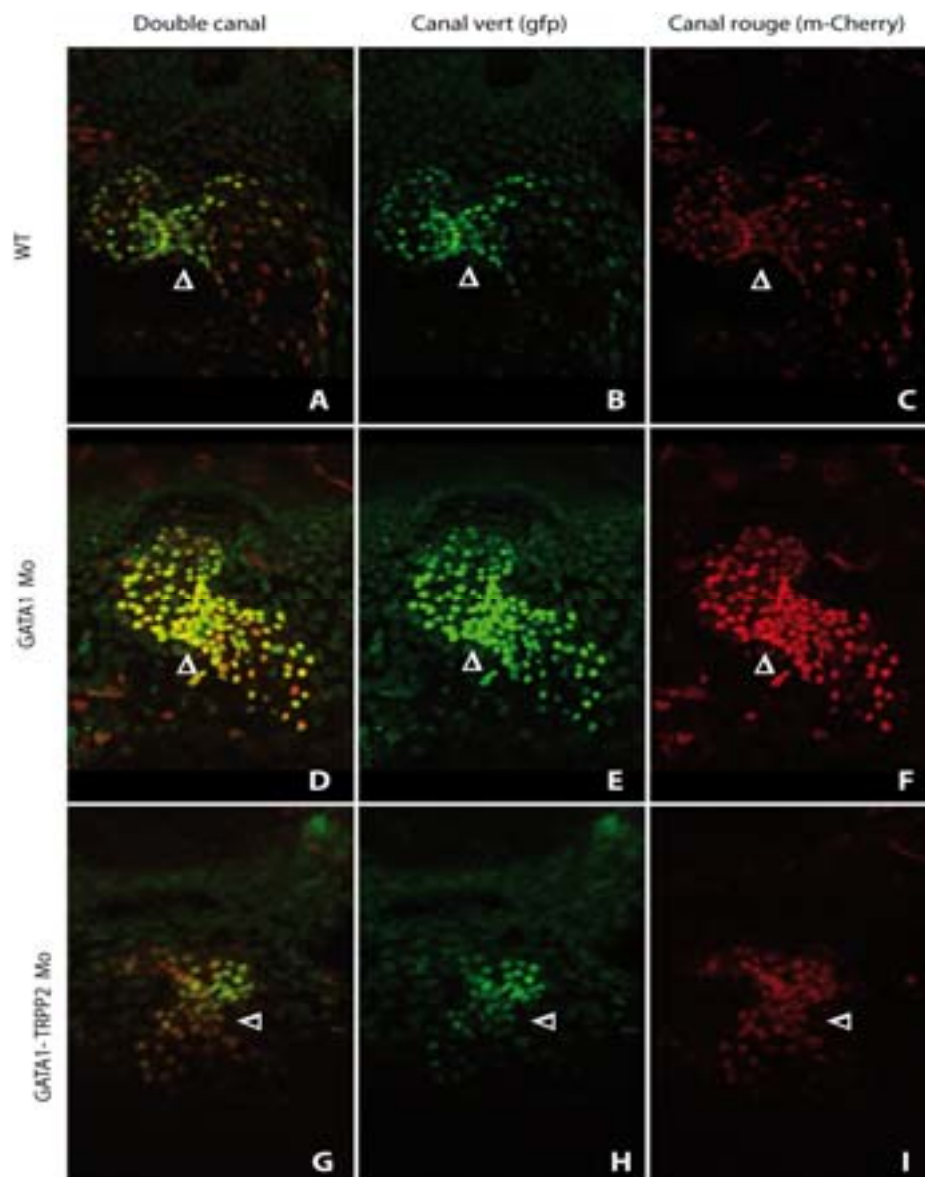


**Graphe 22: Efficacité de la contraction cardiaque à 48hpf chez les doubles morphants *gata1-TRPP2*.** L'efficacité de la contraction de l'atrium et du ventricule n'est pas affectée par l'injection du double morpholino, en comparaison aux poissons contrôles (CT) et aux poissons injectés avec *gata1Mo* seul. CT n=10, *gata1MO* n=7, *gata1-trpp2Mo* n=5.

De façon forte intéressante, l'expression du gène *klf2a* après double injection correspond à une baisse très prononcée au niveau de l'AVC des morphants (Figure 38), en comparaison aux poissons contrôles (*WT*). En analysant les images obtenues pour le morpholino *gata1* et celles obtenues pour la double injection, nous pouvons d'ores et déjà mentionner une réponse au flux de la part de TRPP2 (Figure 38).

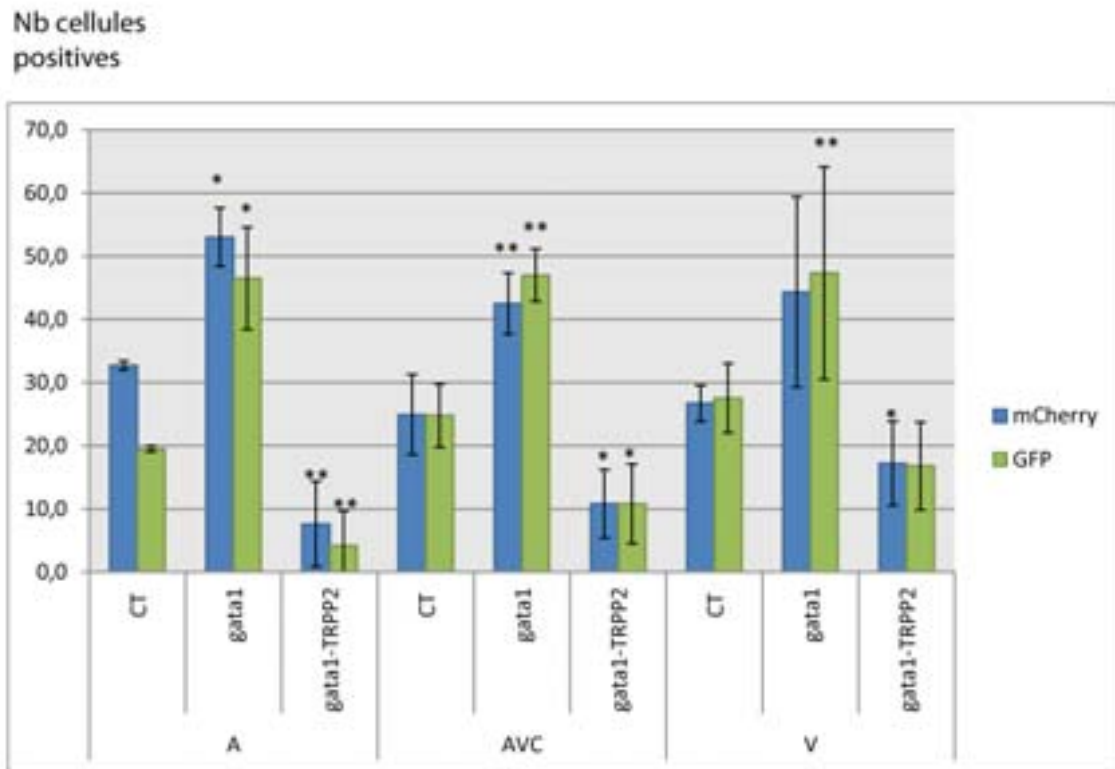
Les **comptages cellulaires** effectués sur les poissons doublement injectés présentent une baisse significative du nombre total de cellules dans l'endocarde, et ceci au niveau de l'atrium (baisse de 75%), du ventricule (diminution de 30%) et de l'AVC (baisse de 66%) par rapport aux poissons contrôles. Le nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* est également fortement diminué au niveau de l'atrium (baisse de 79%) et de l'AVC (baisse de 48%) des poissons injectés avec *trpp2-gata1* par rapport aux poissons *WT*. Les poissons injectés avec *gata1Mo* seul, présentent quant à eux une augmentation

significative du nombre total de cellules exprimant la *m-Cherry* (+ 40% dans l'atrium, l'AVC et le ventricule) ainsi qu'une forte progression du nombre de cellules exprimant *klf2a* (+ 59% dans l'atrium, +45% dans l'AVC et + 43% dans le ventricule) par rapport aux poissons contrôles (Graphe 23).



**Figure 39: Expression du promoteur *klf2a\_6kb :h2b-eGFP* et nombre total de cellules dans le cœur des doubles morphants *gata1-TRPP2*, à 48hpf. Projection maximale de cœurs à 48hpf. (A-B, D-E) Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). (G-H) Le nombre de cellules totales au niveau de l'AVC des poissons doublement injectés est diminué. (C, F, I) Visualisation du nombre total de cellules exprimées dans l'endocarde.**



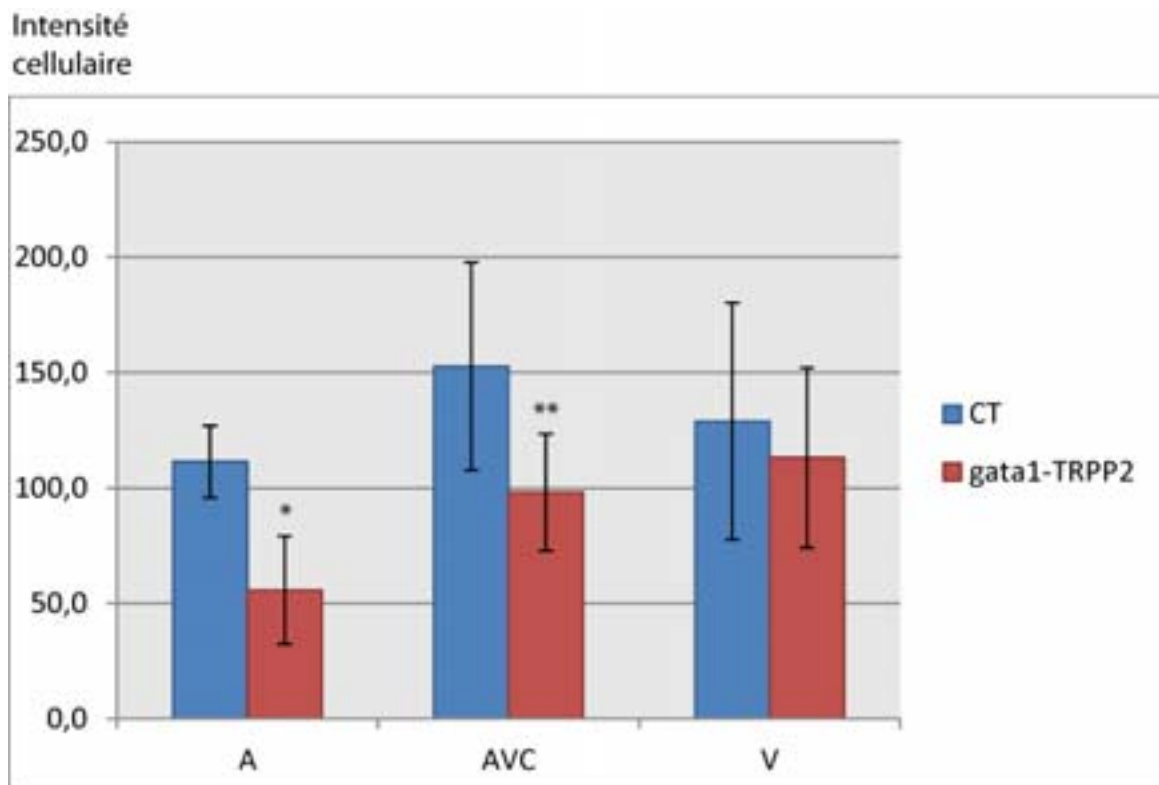


**Grphe 23: Comptage cellulaire après injection du double morpholino *gata1-TRPP2*, à 48hpf.** Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) dans l'AVC, le ventricule et l'atrium et diminution significative du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* (GFP) dans l'atrium et l'AVC des doubles morphants, par rapport aux CT. Augmentation significative des cellules exprimant la *gfp* dans les deux chambres cardiaques et l'AVC des morphants *gata1* ainsi que du nombre de cellules exprimant le marqueur fluorescent *mCherry* dans l'atrium et l'AVC de ces derniers. CT n=10, *gata1MO* n=7, *gata1-trpp2Mo* n=5. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

La comparaison du nombre total de cellules dans l'endocarde et le nombre de cellules exprimant *klf2a* dans les poissons injectés uniquement avec *gata1Mo* et ceux doublement injectés permet de montrer la forte dépendance au flux de TRPP2.

Les mesures d'intensité de fluorescence au niveau des cellules exprimant le transgène *klf2a* permettent elles aussi de montrer une baisse significative de la fluorescence *gfp* au niveau de l'atrium et de l'AVC des poissons injectés avec le double morpholino *gata1-TRPP2* (Grphe 24).





**Graphe 24:** L'intensité de fluorescence *gfp* relevée par le transgène *klf2a* nucléaire est diminuée dans les morphants *gata1-TRPP2*, à 48hpf. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A) et de l'AVC des poissons doublements injectés, à 48hpf. CT n=10, *gata1MO* n=7, *gata1-trpp2Mo* n=5. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

L'analyse de tous ces résultats permet de localiser TRPP2 comme étant en amont du gène *klf2a* et lui confère un rôle majeur dans l'expression et le maintien de ce dernier. En plus de jouer un rôle dans l'expression de *klf2a* et dans la valvulogénèse, j'ai pu démontrer la dépendance de TRPP2 au shear stress au niveau des cellules de l'endocarde chez *Danio rerio*.

Nous avons vu précédemment que la protéine TRPP2 était capable de se lier à d'autres TRPs. Parmi ces dernières, Köttgen et ses collaborateurs ont mis en évidence la formation, après liaison de TRPP2 à TRPV4, d'un complexe polymodal et sensible de canaux calciques (Kottgen, Buchholz et al. 2008). Afin de voir si TRPP2 et TRPV4 interagissent

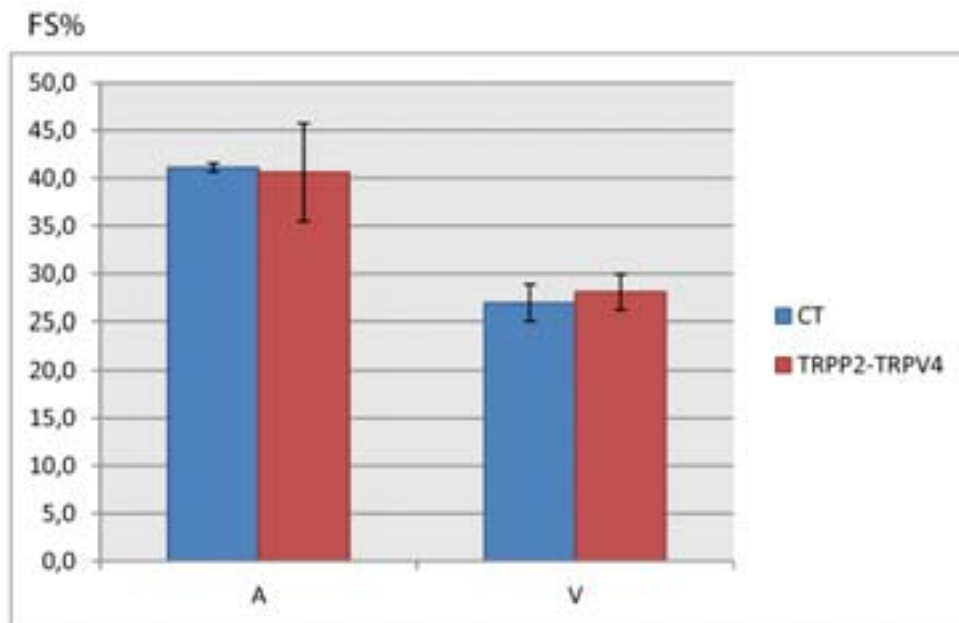
ensemble au niveau de l'expression de *klf2a*, j'ai voulu quantifier cette expression en absence de deux composés.

#### 4.6 TRPP2 et TRPV4 affectent l'expression de *klf2a*

Afin d'observer une éventuelle interaction entre TRPV4 et TRPP2 au niveau de l'expression génique de *klf2a*, j'ai croisé les lignées transgéniques *Tg(klf2a\_6kb : h2b-eGFP) \* Tg(fli-NLS-mCherry) roy+/-* que j'ai injecté avec le double morpholino TRPP2-TRPV4. L'observation à 48hpf au microscope confocal SP2, permet de détecter les cellules totales formant l'endocarde en rouge ainsi que les cellules exprimant le transgène *klf2a* en vert.

Les poissons injectés présentent un petit œdème cardiaque ainsi qu'un cœur mal retourné. Une hydrocéphalie ainsi que le phénotype en « tire-bouchon » de la queue du poisson sont également visibles. La circulation sanguine est effective malgré la diminution du nombre de battements par minute (145 bpm vs 180bpm chez les *WT*).

Le **fractional shortening** calculé se révèle être similaire aux mesures effectuées chez les poissons contrôles. Aucun défaut de contraction n'est relevé autant au niveau de l'atrium que du ventricule (Graphe 25; Annexe 1, vidéo n° 2 et n°17).



**Grphe 25: Efficacité de contraction cardiaque du double morphant *TRPP2-TRPV4*, à 48hpf.** L'efficacité de contraction de l'atrium et du ventricule n'est pas affectée par l'injection du double morpholino, en comparaison aux poissons contrôles (CT). CT n=10, *trpv4-trpp2Mo* n=5.

L'observation des images générées avec le microscope confocal SP2 (Figure 40) ainsi que le **comptage cellulaire** (Grphe 26) révèlent, en comparaison avec les contrôles, une baisse significative de près de 60% du nombre total de cellules dans l'endocarde ainsi que du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'AVC des poissons doublement injectés. Outre l'impact du double morpholino sur les cellules de l'AVC, nous pouvons aussi apercevoir une diminution du nombre de cellules exprimant la *gfp* au niveau du ventricule. Aucun changement clair n'est visible au niveau de l'atrium. En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour *TRPP2Mo* et *TRPV4Mo*, nous pouvons observer une baisse plus importante de la *mCherry* et de l'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* au niveau de l'AVC seulement. Ces données indiquent un rôle essentiel du complexe TRPP2-TRPV4 pour l'expression du gène *klf2a* au niveau des zones présentant un shear stress élevé (AVC).

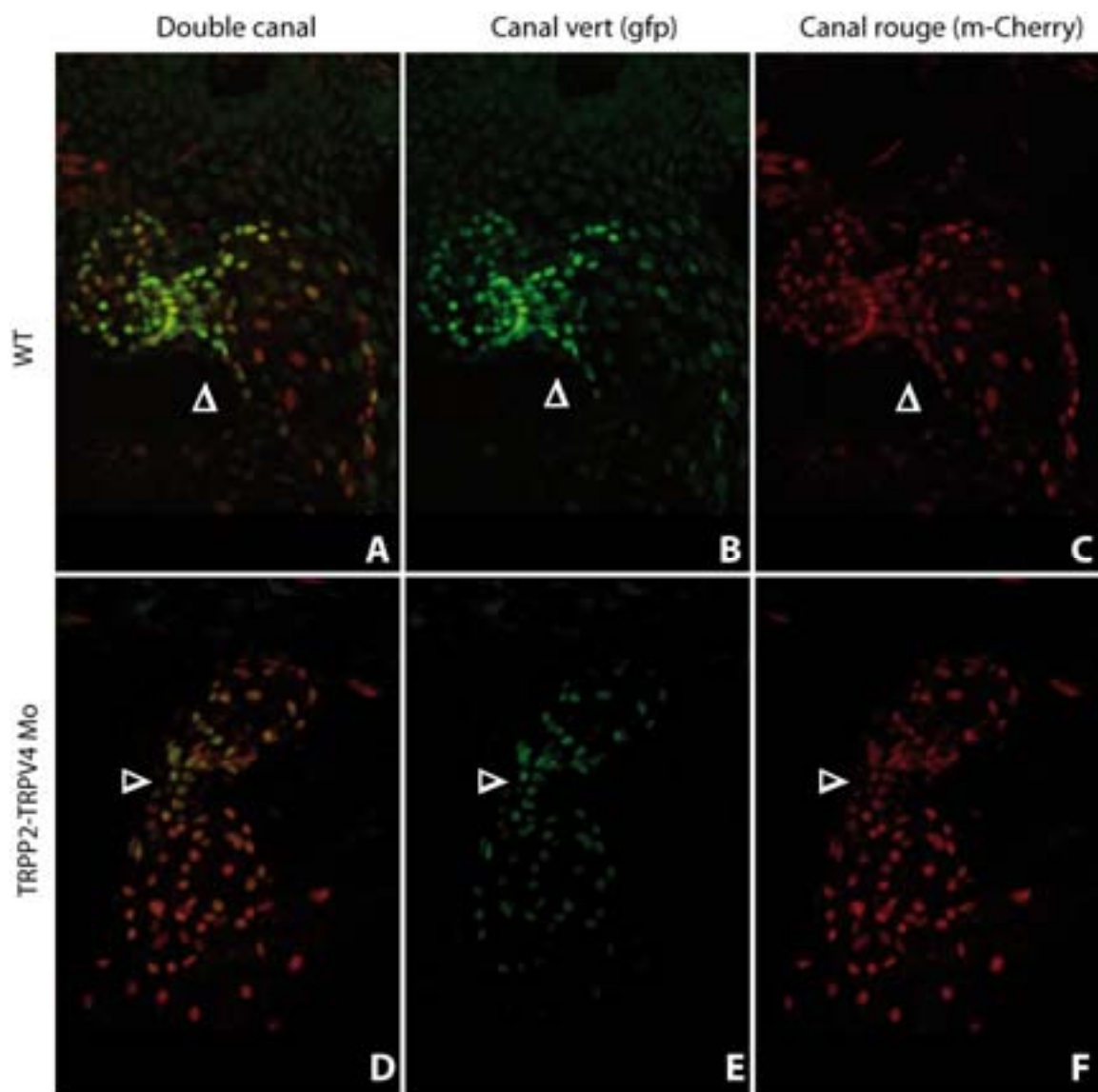
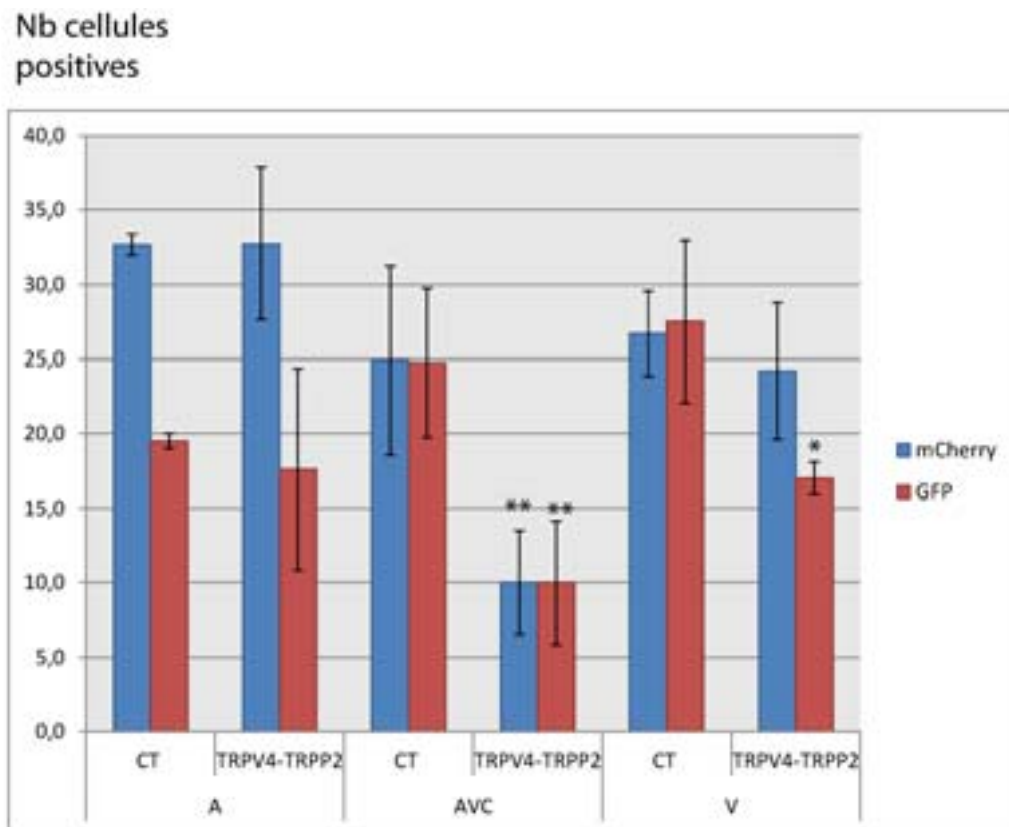
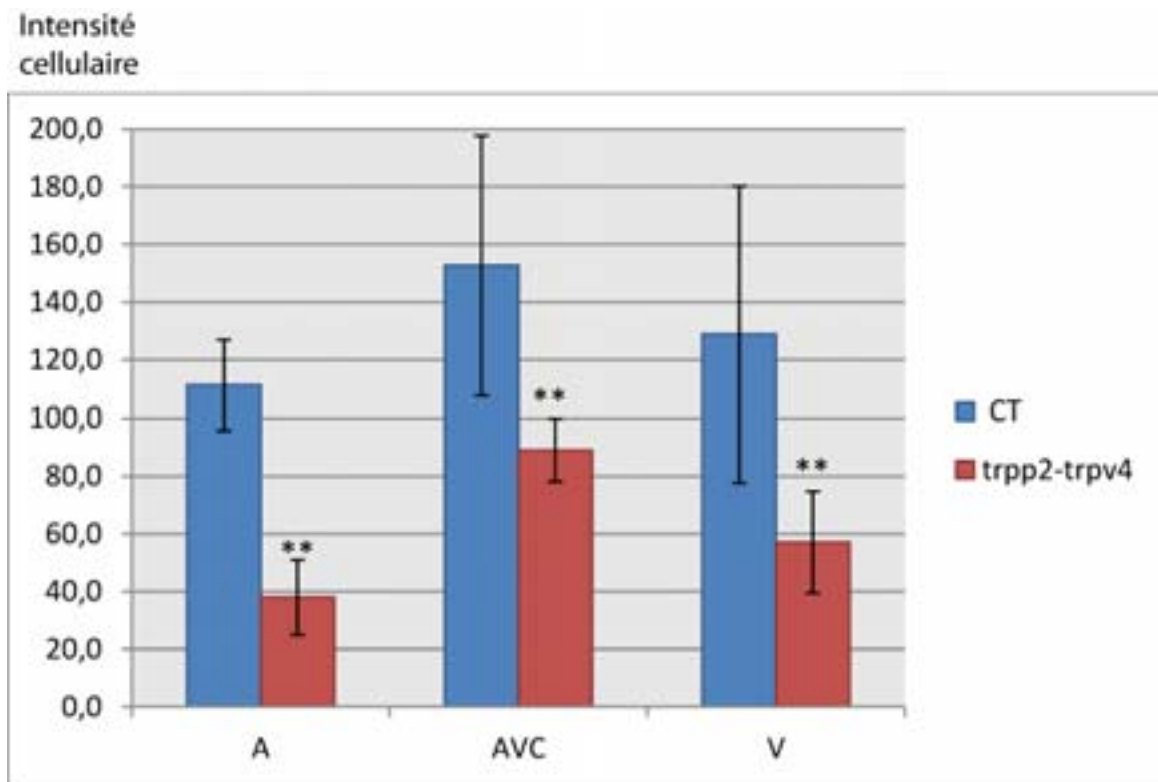


Figure 40: Expression du transgène *klf2a* et du nombre total de cellules dans le cœur des morphants *TRPP2-TRPV4*, à 48hpf. Projection maximale de cœurs à 48hpf. Présence de nombreuses cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC (triangle blanc) des poissons contrôles (WT). Le nombre de cellules exprimant le transgène *klf2a* au niveau de l'AVC des morphants est diminué (D-E), ce qui n'est pas le cas du nombre total de cellules dans l'endocarde (*mCherry*) (C et F).



**Graphe 26: Comptage cellulaire après injection du double morpholino *TRPP2-TRPV4*, à 48hpf.** Baisse significative du nombre total de cellules (*mCherry*) dans l'AVC et diminution du nombre de cellules exprimant le transgène *klf2a* (GFP) dans l'AVC et le ventricule des morphants. CT n=10, *trpv4-trpp2Mo* n=5. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

La mesure de **l'intensité cellulaire** confirme une diminution significative de l'expression du transgène *klf2a* au niveau de l'atrium, du ventricule ainsi que de l'AVC chez les poissons injectés avec le double morpholino et en comparaison avec les poissons contrôles. Respectivement, nous observons une baisse de 65%, 44% et 54% dans l'atrium, l'AVC et le ventricule (Graphe 27).



**Grphe 27:** L'intensité de fluorescence relevée par le transgène *kf2a* nucléaire est diminuée dans les morphants *TRPP2-TRPV4*, à 48hpf. Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium (A), de l'AVC et du ventricule des poissons doublements injectés, par rapport aux poissons contrôles à 48hpf. CT n=10, *trpv4-trpp2Mo* n=5. \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

## 5 Conclusion

Dans cette partie, j'ai pu mettre en évidence la localisation à la surface cellulaire de TRPV4 ainsi que la localisation cytoplasmique de TRPP2. Afin de confirmer une expression spécifique de TRPP2 dans le réticulum endoplasmique, il faudrait pouvoir faire des images bien plus précises que celles obtenues par microscope confocal SP5. Lors de la visualisation de l'emplacement de ces deux protéines dans l'endocarde, je n'ai pu mettre en évidence une colocalisation ciliaire. En effet, le nombre de cellules ciliées étant faible à 48hpf, il est possible que la colocalisation se retrouve elle aussi réduite. Suite aux travaux de Teilmann et ses collaborateurs (Teilmann, Byskov et al. 2005), nous pouvons aussi penser que la

présence de cils dans l'endocarde ne soit pas de type « moteur » et ne colocalisent donc pas avec les protéines TRPs. Cependant, il serait bon d'observer une éventuelle colocalisation en utilisant des lignées transgéniques surexprimant TRPV4 et TRPP2 dans l'endocarde. Cette surexpression permettrait de mieux caractériser la présence de ces protéines dans les cellules endocardiques. Les lignées permettant cette manipulation sont actuellement en cours de génotypage au laboratoire.

Lors de l'observation de l'expression du gène *klf2a* dans le cœur, nous observons une baisse significative du nombre total de cellules de l'endocarde et des cellules exprimant la *gfp*, au niveau de l'AVC, quel que soit le morpholino utilisé (*TRPV4Mo*, *TRPP2Mo*, *TRPP2-TRPV4Mo*). Cette diminution permet en premier lieu de situer TRPP2 et TRPV4 comme étant en amont du gène *klf2a*, mais aussi de mentionner leur importance dans l'expression et le maintien de ce dernier au niveau des zones subissant un fort shear stress comme l'AVC. En l'absence de PKD2 nous avons aussi enregistré une diminution significative de l'intensité de fluorescence du transgène *klf2a* au niveau des cellules de l'AVC des morphants. Notons également la présence de quelques variations pouvant être observées au niveau du nombre cellulaire total dans l'endocarde et exprimant le transgène *klf2a* au niveau de l'atrium et du ventricule, indépendamment de l'efficacité de contraction atriale et ventriculaire des poissons injectés.

La relation entre TRPV4 et le shear stress, bien décrite de nos jours (Kohler, Heyken et al. 2006; Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007; Wu, Gao et al. 2007; Berrout, Jin et al. 2012), nous a permis d'émettre l'hypothèse de la dépendance au flux de TRPP2 au niveau de l'endocarde de *Danio rerio*. L'utilisation du morpholino *gata1* présentant un flux reversant fortement augmenté au niveau de l'AVC nous a servi de contrôle interne dans la

manipulation permettant alors de mettre en évidence la dépendance au flux de TRPP2. En effet, et en comparaison avec les poissons *WT* et ceux injectés avec *gata1*Mo seul, l'injection du double morpholino *gata1-TRPP2* présente une baisse conséquente du nombre total de cellules dans l'endocarde et du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* au niveau des deux chambres cardiaques et de l'AVC. Nous avons aussi remarqué une perte de l'intensité de fluorescence du transgène *klf2a* dans ces régions cardiaques, par rapport aux poissons contrôles. Ces données permettent de conclure à la dépendance au flux de TRPP2 dans l'endocarde du poisson zèbre, notamment dans les régions soumises à un fort shear stress (AVC).

Outre la dépendance au flux, les expériences permettant de visualiser la présence de bourrelets endocardiques au niveau de l'AVC, nous ont permis via la présence d'amas cellulaire fortement marqués par le marqueur de différenciation cellulaire Zn-8, de révéler l'implication directe ou indirecte, de TRPV4 et TRPP2 dans la valvulogénèse.

Sachant que TRPV4 et TRPP2 correspondent à des canaux membranaires permettant le passage d'ions calciques dans la cellule. Le calcium pourrait être un élément indispensable au bon fonctionnement cellulaire et à la détection du shear stress. Dans le but d'approfondir les résultats obtenus avec TRPP2 et TRPV4, je me suis donc tout naturellement orientée, dans un premier temps, vers le signal calcique intracellulaire pouvant être retrouvé dans les cellules endocardiques du poisson zèbre, puis vers les différentes voies moléculaires induites par le calcium.



# Chapitre 4

**Le calcium, élément indispensable à la  
mécanodétection**

# Chapitre 4 : « Le calcium, élément indispensable à la mécanodétection »

## 1 Introduction

Les ions calciques, molécules ubiquitaires et versatiles, sont nécessaires à l'activité d'une variété de signaux extracellulaires et jouent un rôle indispensable dans la régulation de la majorité des processus cellulaires (Berridge, Lipp et al. 2000). De nombreuses fonctions sont accordées au signal calcique, notamment lors de la transmission synaptique, le relargage de neurotransmetteurs, la régulation du métabolisme cellulaire ainsi que la prolifération cellulaire et la contraction musculaire (Clapham 1995; Berridge 1998). La migration cellulaire ainsi que la dépolarisation des cellules sont souvent associés à l'entrée du calcium dans la cellule, via la présence de canaux membranaires (Anyatonwu and Ehrlich 2004). Ces stimuli sont également associés à un relargage du calcium intracellulaire de par la présence de canaux membranaires situés au niveau du réticulum endoplasmique (Moller, Andersen et al. 1982). De nos jours, les relations entre la variation du taux calcique intracellulaire, les cils et les organites internes de la cellule ainsi que les canaux membranaires ont bien été décrites (Koulen, Cai et al. 2002; Kottgen, Buchholz et al. 2008). Par ailleurs, les études menées sur l'inclinaison du cil primaire localisé à la membrane cellulaire et engendrée par la présence de flux, ont démontré son rôle dans l'entrée du calcium dans la cellule (Praetorius and Spring 2001; Nauli, Alenghat et al. 2003; Praetorius, Frokiaer et al. 2003). De même, la mise en évidence du blocage de l'entrée calcique malgré la présence de shear stress au niveau des cellules ciliées, après utilisation d'un anticorps anti-TRPP2 agissant au niveau de la longue hélice  $\alpha$ , a permis de définir la relation directe

entre le flux, sa détection par le cil et l'entrée du calcium dans la cellule par la protéine TRPP2 (Nauli, Alenghat et al. 2003). Récemment, la mise en évidence de la nécessité de la localisation ciliaire de TRPP2 pour la détection fluidique dans les cellules nodales de souris a également permis de mettre à jour le rôle essentiel de ce canal pour la détermination de l'asymétrie gauche-droite chez ce mammifère (Yoshiba, Shiratori et al. 2012). En fonction de sa localisation, TRPP2 est alors décrit comme étant un canal calcique localisé à la membrane plasmique (Hanaoka, Qian et al. 2000; Nauli, Alenghat et al. 2003) ou un canal localisé dans le ER permettant le relargage du calcium intracellulaire après activation par ce dernier (Koulen, Cai et al. 2002; Cai, Anyatonwu et al. 2004). Outre l'implication de TRPP2 dans la signalisation calcique, la mise en évidence de l'intervention de TRPV4 dans l'entrée du calcium au niveau de cellules épithéliales du tube rénal humain a également été démontrée (Gao, Wu et al. 2003; Strotmann, Schultz et al. 2003; Watanabe, Vriens et al. 2003). Comme TRPP2, l'entrée du calcium dans la cellule via TRPV4 nécessite une activation du canal par le calcium lui-même (Watanabe, Vriens et al. 2003).

L'entrée du calcium dans la cellule s'effectue à deux endroits distincts; au niveau de la membrane plasmique (via TRPV4 et TRPP2) mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique (via TRPP2) (Koulen, Cai et al. 2002). Ce processus complexe nécessite en premier lieu l'entrée du calcium engendrée par l'inclinaison du cil à la surface membranaire et en réponse au flux puis l'activation des canaux membranaires par ce calcium, en particulier ceux retrouvés dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène est communément appelé « calcium induced calcium release » (Praetorius and Spring 2001; Nauli, Alenghat et al. 2003; Praetorius, Frokiaer et al. 2003). Cette activation s'effectue par l'intermédiaire de deux récepteurs principaux, le récepteur inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>R) ainsi que le récepteur à la ryanodine (RYR) (Ehrlich 1995). La liaison de protéines

régulatrices, telles l'inositol-triphosphate (IP3) et la calmoduline, à ces récepteurs permet l'activation du canal calcique afin d'entraîner une réponse rapide (correspondant à des pics de calcium intracellulaire) ou longue (identifiée par un flux calcique transitoire ou encore par des phénomènes de vagues calciques) (Kasri, Holmes et al. 2004). Outre la nécessité d'une première activation du canal par le calcium, l'état de phosphorylation de la protéine TRPP2 joue un rôle important dans sa capacité à être régulée par cet ion. Ainsi, une mutation de la sérine 812 ou une déphosphorylation de la protéine au niveau du site GSK3 (Figure 27) entraîne une baisse de sensibilité du canal vis-à-vis du calcium (Cai, Anyatonwu et al. 2004).

Ce phénomène d'activation primaire, principalement retrouvée au niveau du RE, amène à supposer que le relargage du calcium par cet organite, est l'une des sources majeures de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Koulen, Cai et al. 2002).

Suite à la mise en évidence de l'importance des protéines TRPV4 et TRPP2 dans l'établissement d'une concentration calcique intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ), et via la capacité de ces dernières à sentir le flux, des études ont été menées afin d'observer la relation entre le shear stress et la concentration calcique intracellulaire. Ainsi Helmlinger et son laboratoire ont eu l'idée de tester différentes conditions de flux sur des cellules endothéliales de l'aorte bovine. L'application d'un flux régulier connu (entre 5 et 70 dyn/cm<sup>2</sup>), d'un flux pulsatile non reversant (40 +/- 20 dyn/cm<sup>2</sup>), reversant (20 +/- 40 dyn/cm<sup>2</sup>) ou encore un flux oscillatoire (0 +/- 20 dyn/cm<sup>2</sup>), permettent d'évaluer la concentration calcique intracellulaire en fonction du shear stress imposé aux cellules. Toutes ces conditions montrent une oscillation asynchrone calcique dans la cellule, induite par le flux. Ainsi, la présence des pics oscillatoires est bien plus grande lorsque les cellules sont soumises à un flux pulsatile que

celles soumises à un flux régulier, et ceci indépendamment la valeur du  $\text{dyn/cm}^2$  appliquée (Helmlinger, Berk et al. 1996). En plus de ces pics oscillatoires, il a été montré que le nombre de cellules capables d'entraîner une oscillation calcique augmentait au fur et à mesure de l'application croissante de la valeur du flux régulier, mais aussi lors de l'application d'un flux oscillatoire. Ainsi, Helmlinger et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence la réponse des cellules endothéliales aux différentes conditions de flux de par la variation de ces dernières au calcium intracellulaire.

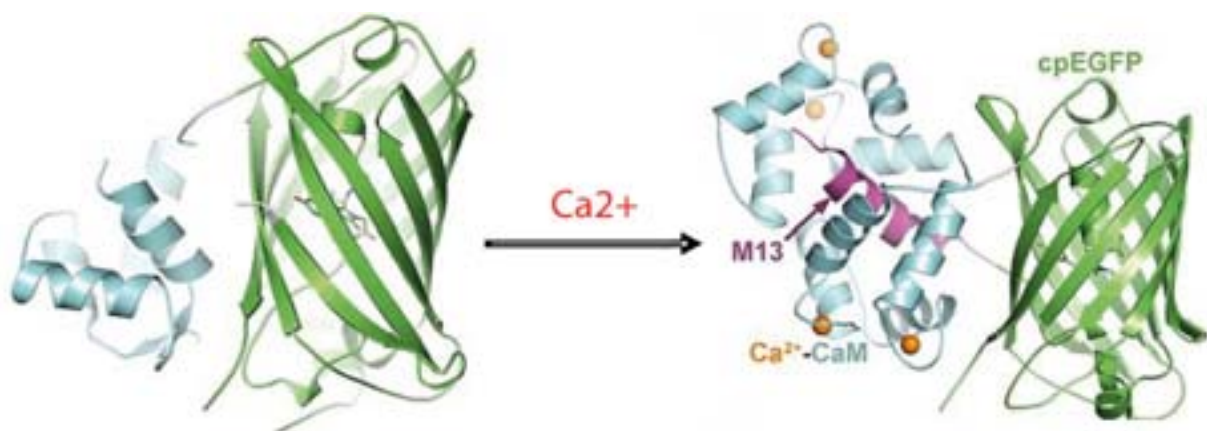
Mises bout à bout, ces données permettent de relier la détection du shear stress par les cils et l'entrée calcique par les canaux calciques TRPV4 et TRPP2 à l'augmentation de calcium intracellulaire après activation de ces derniers par d'autres molécules régulatrices.

Basée sur ces données, j'ai voulu à mon tour, détecter la présence de calcium intracellulaire au niveau des cellules endocardiques du poisson zèbre, et caractériser sa dépendance au flux ainsi qu'aux canaux membranaires TRPP2 et TRPV4.

## 2 Visualisation du calcium endocardique : description d'un poisson contrôlé

Afin de détecter la présence de calcium dans l'endocarde, la première idée a été de visualiser de façon rapide le calcium intracellulaire en utilisant la caméra Sa3 (cf. matériel et méthodes) ainsi que les lignées *Tg(FliGalFF : UAS-kaede) \* Tg(UAS\_1020\_GCamp3.0)*. Cette lignée fait intervenir le système Gal4-UAS établi par Brand et Perrimon. La lignée GCamp3.0 permet de révéler la présence de calcium intracellulaire. La protéine Gcamp résulte de la fusion d'une *gfp*, d'une calmoduline et d'une kinase M13 (Figure 41). Lorsque le calcium est

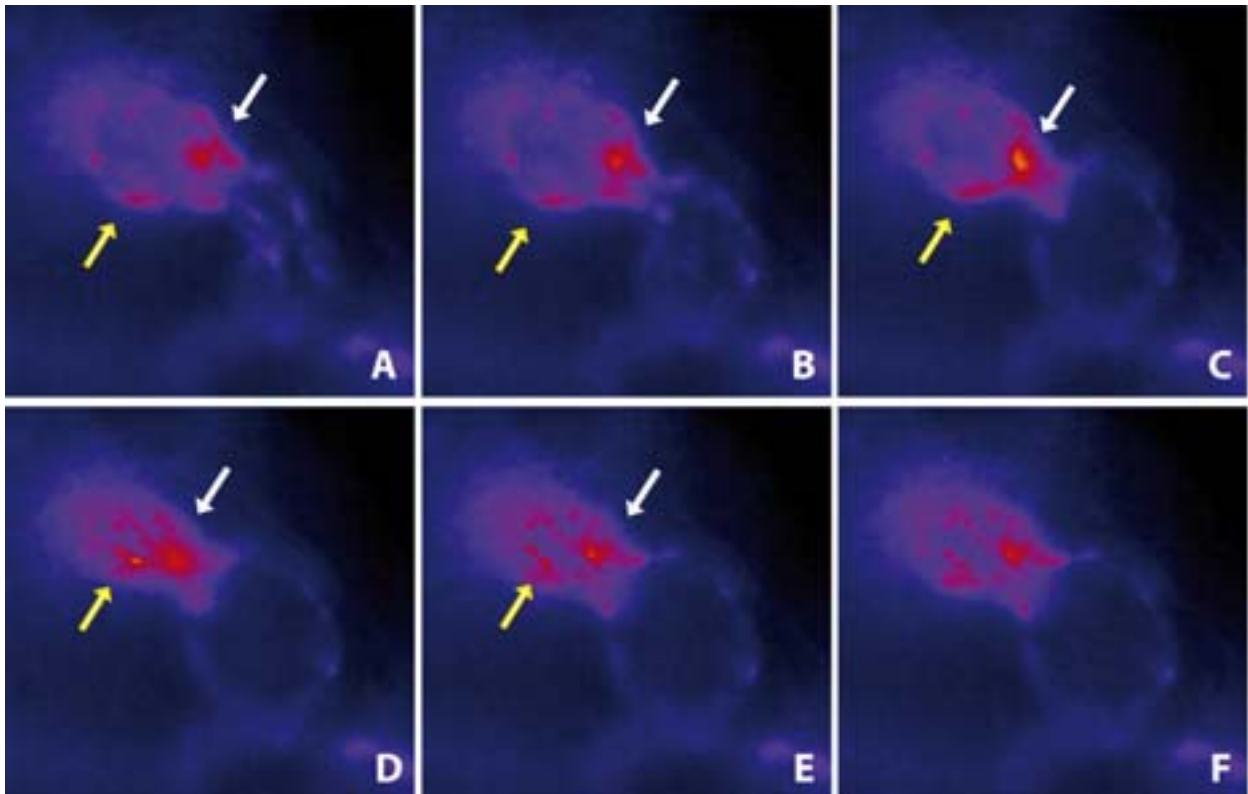
présent, ce dernier va se lier à la calmoduline induisant un changement de conformation spatiale de la kinase M13 et une augmentation du signal de la fluorescence *gfp*. Durant toute cette partie, les images et le signal correspondant au marqueur fluorescent *gfp* seront représentés non pas par la couleur verte caractéristique de la protéine fluorescente, mais par la pseudo-couleur « fire » permettant de mieux observer les faibles variations d'intensité calciques et les phénomènes de saturation, qui apparaîtront en jaune-orangé.



**Figure 41: Représentation schématique de la structure GCamp3.0. La présence de calcium entraîne, après liaison à la calmoduline, un changement de conformation de la kinase M13 ainsi qu'une augmentation de l'intensité de la *gfp*.**

L'imagerie rapide par épifluorescence des cœurs de poissons à 48hpf, nous permet de détecter la présence d'un signal *gfp* dans l'endocarde ainsi qu'une variation de cette dernière dans le ventricule et l'AVC lorsque la contraction intervient (Figure 42). Lorsque l'atrium est en phase systolique (contraction), le ventricule et l'AVC sont en diastole (relâchement). A ce moment, un signal calcique basal est observé au niveau de l'AVC ainsi que du ventricule (Figure 42, A-B). Un premier pic calcique est visible lorsque l'atrium se relâche et que la contraction de l'AVC et du ventricule commence. Le signal *gfp* est alors

fortement augmenté dans ces deux régions (Figure 42, C-D). Un second pic calcique intervient au niveau de l'AVC peu de temps après la fin de la systole ventriculaire puis est suivi d'un retour à la normale (Figure 42, E-F; Annexe 1, vidéo n° 18).



**Figure 42: Observation de la concentration calcique intracellulaire lors de la contraction cardiaque à 48hpf.** (A) Systole auriculaire et présence de signal basal *gfp* dans l'AVC (flèche blanche) et le ventricule (flèche jaune). (B) Fin de systole et début de diastole auriculaire. (C-D) Fin de diastole auriculaire et systole ventriculaire maximale. Premier pic de calcium observé dans l'AVC et le ventricule. (E) Fin de systole ventriculaire. Second pic de calcium dans l'AVC. (F) Fin de systole ventriculaire et retour du calcium à un taux basal.

Bien qu'encourageantes, ces données ne sont pas suffisantes pour démontrer la présence d'une réelle variation calcique dans l'endocarde. En effet, s'agissant d'une acquisition microscopique sur un seul plan, des cellules pourraient être amenées à entrer et

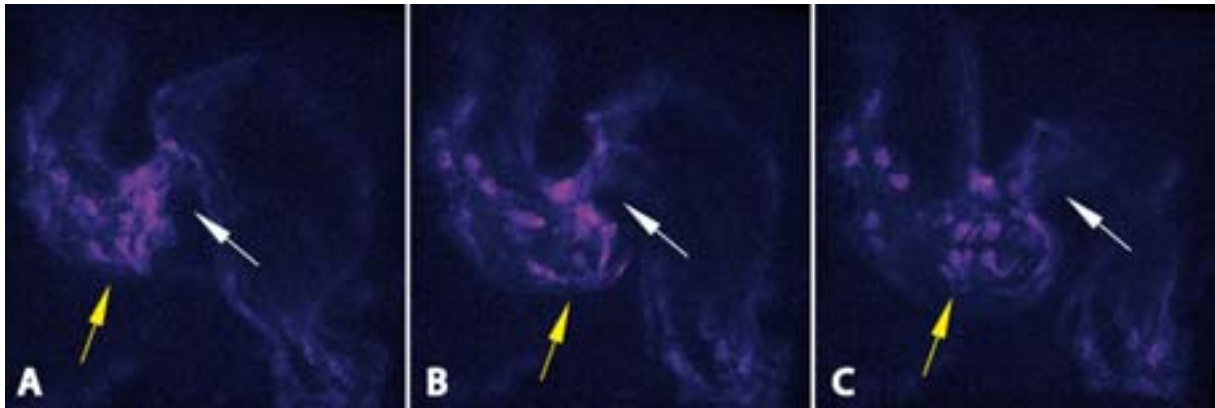
sortir du plan focal lors de la contraction cardiaque et pourraient être à l'origine de l'effet de fluctuation calcique observé.

Afin de confirmer que la présence d'une variation calcique au niveau des cellules de l'endocarde n'est pas due à un artefact, j'ai de nouveau croisé ces lignées afin d'observer les cœurs de poissons *WT* à 48hpf au microscope confocal SP5 puis d'effectuer une reconstruction cardiaque en trois dimensions, basée sur la méthode de Michael Liebling (cf. matériel et méthodes).

Après montage des poissons sans traitement préalable, l'imagerie et la reconstruction 3D effectuées révèlent une variation du calcium intracellulaire lorsque le cœur contracte. L'effet de vague calcique se propageant de l'atrium au ventricule est alors bien visible tout au long du battement cardiaque. Cependant il est intéressant de noter la faible intensité *gfp* au niveau de l'atrium, ce qui n'est pas le cas au niveau du ventricule et dans l'AVC.

De la même façon que l'observation des poissons en microscopie à épifluorescence, la présence de deux pics calciques est visible, le premier intervenant lorsque l'atrium entame sa diastole et que la systole ventriculaire commence, et le second apparaît en fin de systole ventriculaire, lorsque le ventricule commence à se relaxer et l'AVC à s'ouvrir de nouveau (Figure 43; Annexe 1, vidéo n° 19).





**Figure 43: Observation des pics calciques intervenant lors de la contraction cardiaque à 48hpf. (A) Premier pic calcique au niveau de l'AVC (flèche blanche) et du ventricule (flèche jaune) lors de la systole ventriculaire. (B) Second pic de calcium dans l'AVC en fin de systole ventriculaire. (C) Retour à un taux calcique basal dans l'AVC et dans le ventricule.**

Ces deux pics calciques correspondent au moment où le flux sanguin passe de l'atrium au ventricule ainsi qu'au phénomène de flux reversant. Afin d'émettre une relation directe entre le flux et l'intensité calcique au niveau des cellules de l'endocarde, des mesures permettant de relier la présence du shear stress au moment où l'intensité calcique est la plus élevée, sont en cours.

### 3 Le calcium dépend du flux et de la contraction cardiaque

Dans le but d'observer si l'expression calcique dans l'endocarde du poisson zèbre dépend du flux, j'ai, comme lors de la caractérisation de la lignée transgénique *Tg(klf2a\_6Kb:h2b-eGFP)*, testé différents morpholinos affectant la vitesse et la viscosité du flux sanguin. Etant donné que le signal calcique est plus important lors de la systole, les mesures présentées ci-dessous correspondent au moment où la systole ventriculaire et auriculaire est maximale.

Contrairement aux poissons *WT*, l'utilisation de morpholinos affectant la vélocité (*tnnt2*, *cmhc1* et *vmhc*) présente une baisse visible du signal calcique dans le cœur des morphants (Figure 44; Annexe 1, vidéo n° 19, n°20, n°21 et n°22). Après mesure de l'intensité calcique, cette dernière reste similaire dans le ventricule et l'atrium, mais baisse de moitié dans le canal atrio-ventriculaire des poissons injectés avec *tnnt2* et *cmhc1* et de 45% dans les morphants *vmhc* (Graphe 28). L'injection du morpholino *cmhc2*, affectant lui aussi la contractilité cardiaque, présente quant à lui une hausse importante de ce signal dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons injectés par rapport aux contrôles (Graphe 28 ; Figure 44 ; Annexe 1, vidéo n° 19, n°23). En effet, nous observons une augmentation de l'intensité calcique de près de 70% pour l'atrium, 44% pour l'AVC et 65% pour le ventricule. Bien qu'opposé aux résultats obtenus avec les autres morpholinos affectant la vélocité, ce phénomène pourrait être expliqué par le stress physique engendré par les cellules lors du développement cardiaque. En effet, il est connu que le stress cellulaire augmente la concentration de calcium intracellulaire (Bialecki, Kulik et al. 1992).

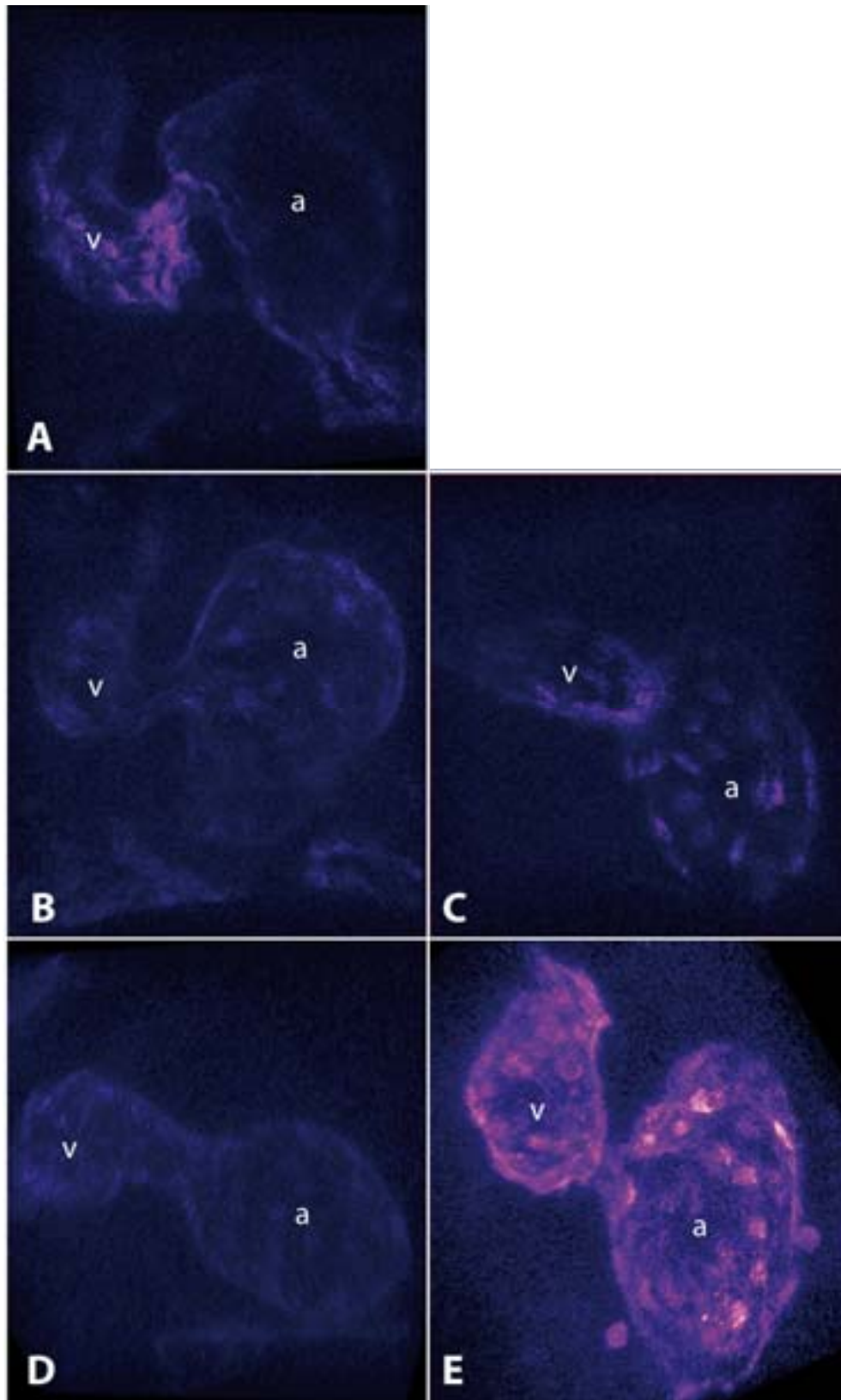
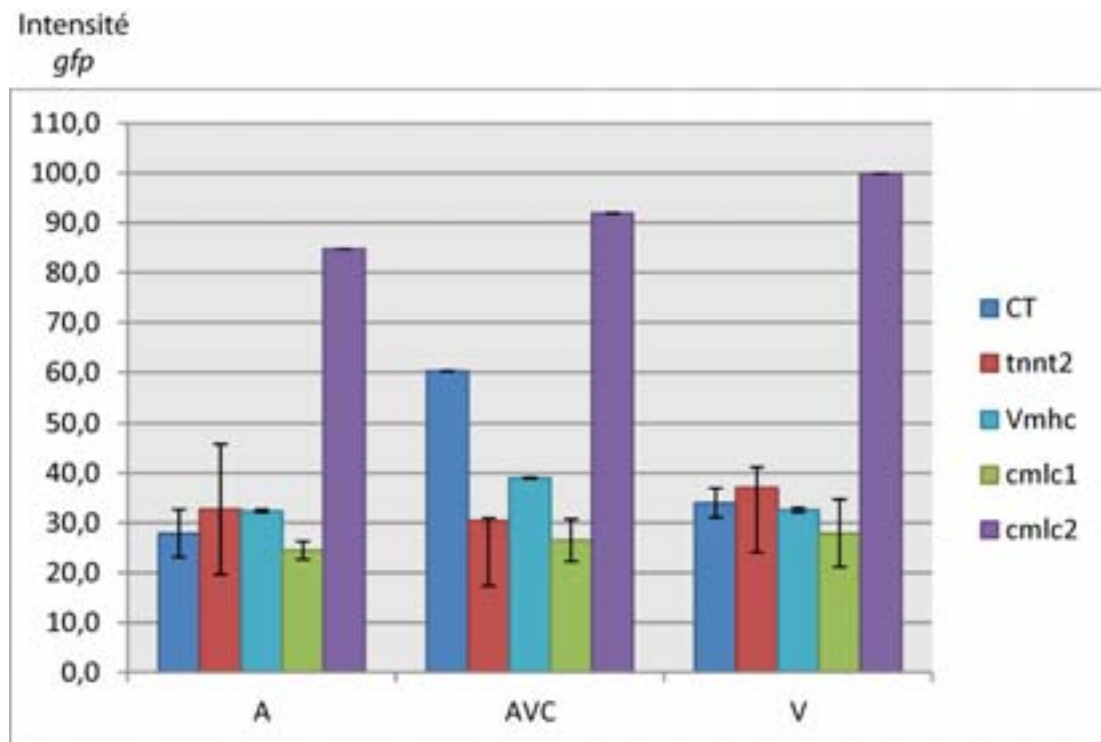


Figure 44: **Observation du calcium intracellulaire après altération de la vitesse du flux, à 48hpf.** Présence d'un signal *gfp* dans l'AVC et le ventricule (v) des poissons contrôles (A) et baisse importante de ce signal dans les poissons injectés avec *tnnt2* (B), *vmhc* (C) et *cmlc1* (D). Les morphants *cmlc2* présentent une augmentation de ce signal dans l'atrium et le ventricule en comparaison aux poissons contrôles (E).



**Graph 28: Mesure de l'intensité calcique après atteinte de la vélocité fluide à 48hpf. L'intensité du signal *gfp* est fortement diminuée dans l'AVC des poissons injectés avec les morpholinos *tnnt2* et *cmlc1* et *vmhc*. Les morphants *cmlc2* montrent une intensité *gfp* bien supérieur à celles des contrôles (CT) dans l'AVC et les deux chambres cardiaques. n=3 pour chaque conditions.**

L'utilisation de morpholinos affectant la viscosité, montre, à 48hpf, une augmentation du signal calcique dans l'AVC des poissons injectés avec *gata1Mo* et une légère baisse de ce signal dans l'AVC chez les poissons injectés avec *gata2Mo* par rapport aux contrôles (Figure 45). Le signal relevé dans l'atrium et le ventricule des deux morphants reste identique à celui des contrôles (Graph 29; Annexe 1, vidéo n° 19, n° 24 et 25).

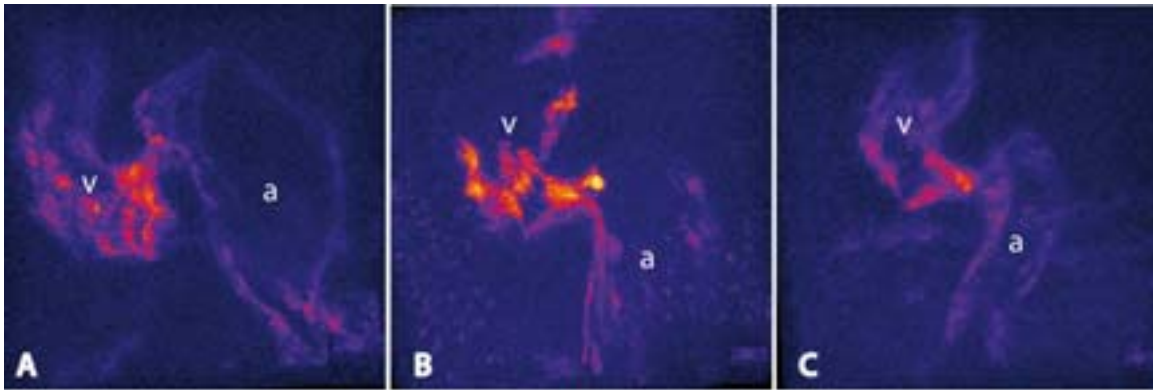
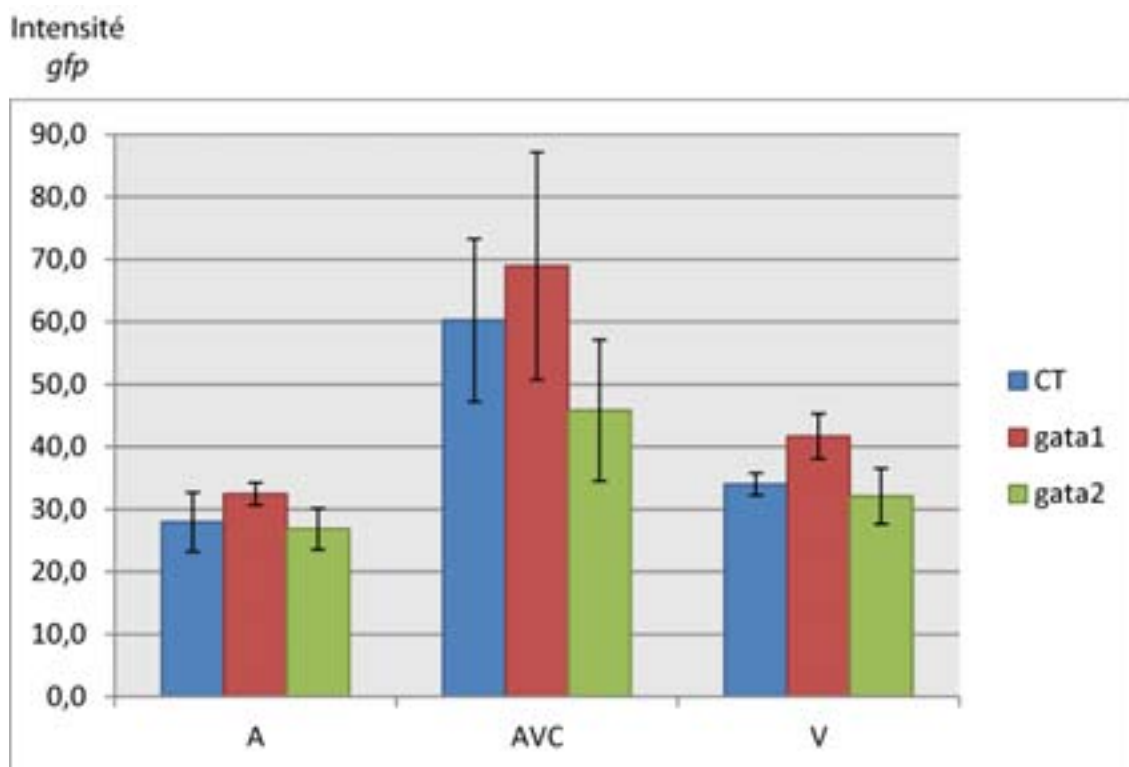


Figure 45: **Observation du calcium intracellulaire après altération de la viscosité du flux, à 48hpf.** Présence d'un signal *gfp* dans l'AVC et le ventricule (v) des poissons contrôles (A). Le signal *gfp* est augmenté dans l'AVC et le ventricule des morphants *gata1* (B) et légèrement diminué dans les morphants *gata2* par rapport aux contrôles (C).



Graphe 29: **Mesure de l'intensité calcique après atteinte de la viscosité fluide à 48hpf.** Les poissons injectés avec le morpholino *gata1* présentent une augmentation de l'intensité *gfp* dans l'AVC par rapport aux poissons contrôles (CT). Les poissons injectés avec le morpholino *gata2* présentent une diminution de l'intensité *gfp* perçue dans l'AVC par rapport aux poissons contrôles. n=4 pour chaque conditions

Ces données permettent de mettre en évidence la dépendance du signal calcique intracellulaire au flux ainsi qu'aux contractions cardiaques.

#### 4 Dépendance du calcium à TRPP2 et TRPV4

Suite aux données de la littérature, j'ai également voulu observer si le calcium intracellulaire observé dans le cœur des poissons dépendait des canaux calciques TRPV4 et TRPP2. Pour ce faire, j'ai injecté les morpholinos permettant le blocage de ces canaux dans les lignées *Tg(FliGalFF : UAS-kaede) \* Tg(UAS\_1020\_GCamp3.0)*.

L'observation des morphants TRPP2 montre une baisse importante du signal calcique dans l'AVC par rapport aux poissons contrôles (Figure 46), mais se révèle être légèrement augmenté dans les morphants au niveau de l'atrium et du ventricule (Graphe 30; Annexe 1, vidéo n°19 et n° 26) à 48hpf.

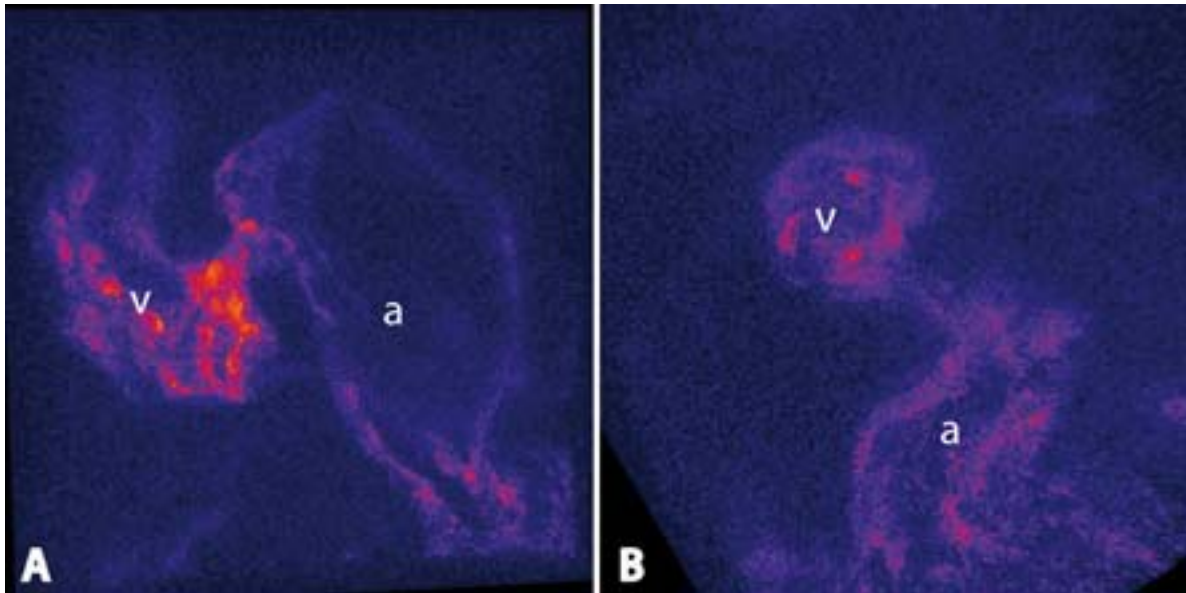
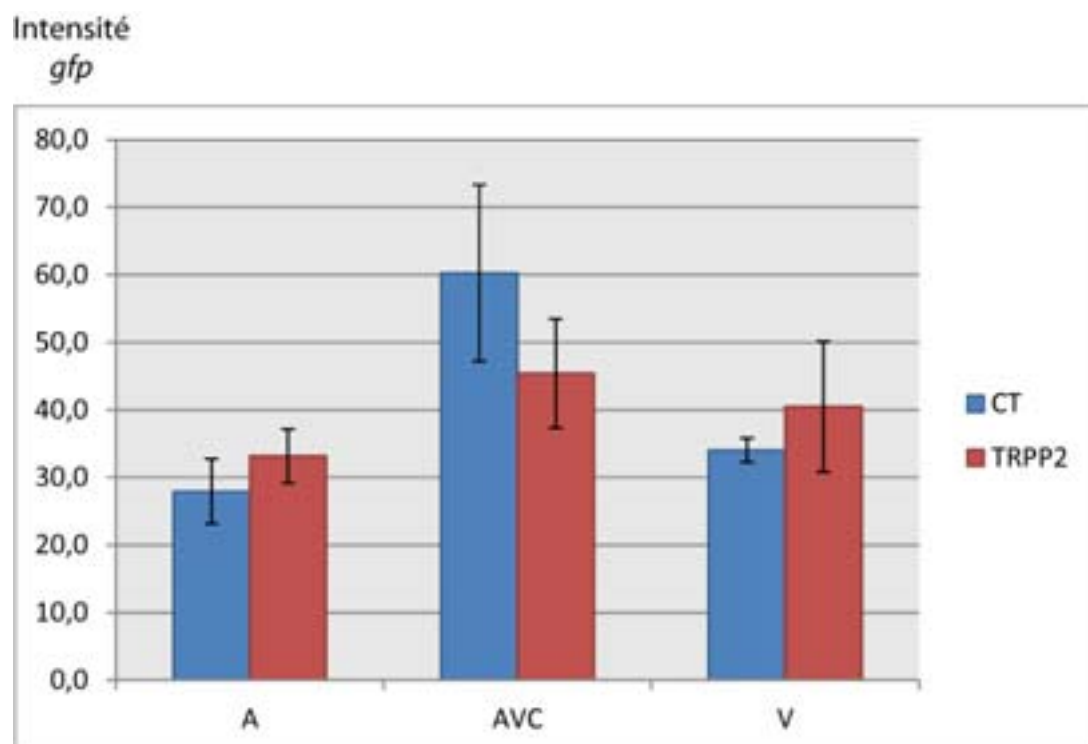


Figure 46: Observation du calcium intracellulaire après blocage du canal calcique TRPP2, à 48hpf. Présence d'un signal *gfp* dans l'AVC et le ventricule (v) des poissons contrôles (A) et diminution de ce signal dans l'AVC des poissons injectés avec *trpp2Mo*. n=3 pour chaque conditions.



Graphe 30: Mesure de l'intensité calcique après blocage du canal calcique TRPP2 à 48hpf. L'intensité du signal *gfp* est diminuée dans l'AVC des poissons injectés avec le morpholino *trpp2* en comparaison avec les poissons contrôles (CT). L'intensité *gfp* mesurée dans l'atrium et le ventricule est augmentée de façon non significative par rapport aux WT. n=3 pour chaque conditions.

De façon intéressante, les poissons injectés avec *trpv4*Mo ne présentent pas de signal calcique au niveau du cœur de poisson, même après augmentation de l'intensité du laser *gfp*. Aucune mesure d'intensité n'est donc faisable sur ces morphants.

Ne pouvant détecter un quelconque signal calcique dans les poissons injectés avec *trpv4*Mo, j'ai voulu observer l'implication de ce canal membranaire d'une autre manière. Pour cela j'ai utilisé un agoniste synthétique de TRPV4, le 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ PDD) (Watanabe, Davis et al. 2002), permettant, après liaison entre le TM3 et le TM4 de la structure de TRPV4 (Vriens, Watanabe et al. 2004), d'activer le canal calcique TRPV4. Pour ce faire, j'ai croisé les lignées *Tg(FliGalFF : UAS-kaede) \* Tg(UAS\_1020\_GCamp5.0)* que j'ai injecté au stade une cellule avec le morpholino *tnnt2*. La lignée Gcamp5.0 est similaire à la lignée Gcamp3.0 mais présente une sensibilité plus grande que cette dernière à la présence de calcium dans la cellule. A 48hpf, j'ai traité ces poissons en 4 $\alpha$ PDD à 4 $\mu$ M pendant vingt minutes à température ambiante (Cf. matériel et méthodes). J'ai ensuite imagé les cœurs des poissons injectés avec *tnnt2* au microscope confocal SP5. Les cœurs de ces poissons ne battant pas, je n'ai pas eu besoin de procéder à la technique de réalignement élaborée par Michael Liebling.

Les résultats obtenus valident notre première hypothèse : En effet, lors de la visualisation des cœurs en trois dimensions, nous apercevons un signal calcique qui semble plus prononcé dans les morphants traités par le 4 $\alpha$ PDD (Figure 47 B) que par rapport aux poissons contrôles (n'ayant pas subi de traitement ; Figure 47 A). La fluorescence *gfp* observée dans l'atrium du contrôle se justifie par une plus grande sensibilité de la lignée GCamp5.0 au calcium que la lignée GCamp3.0.



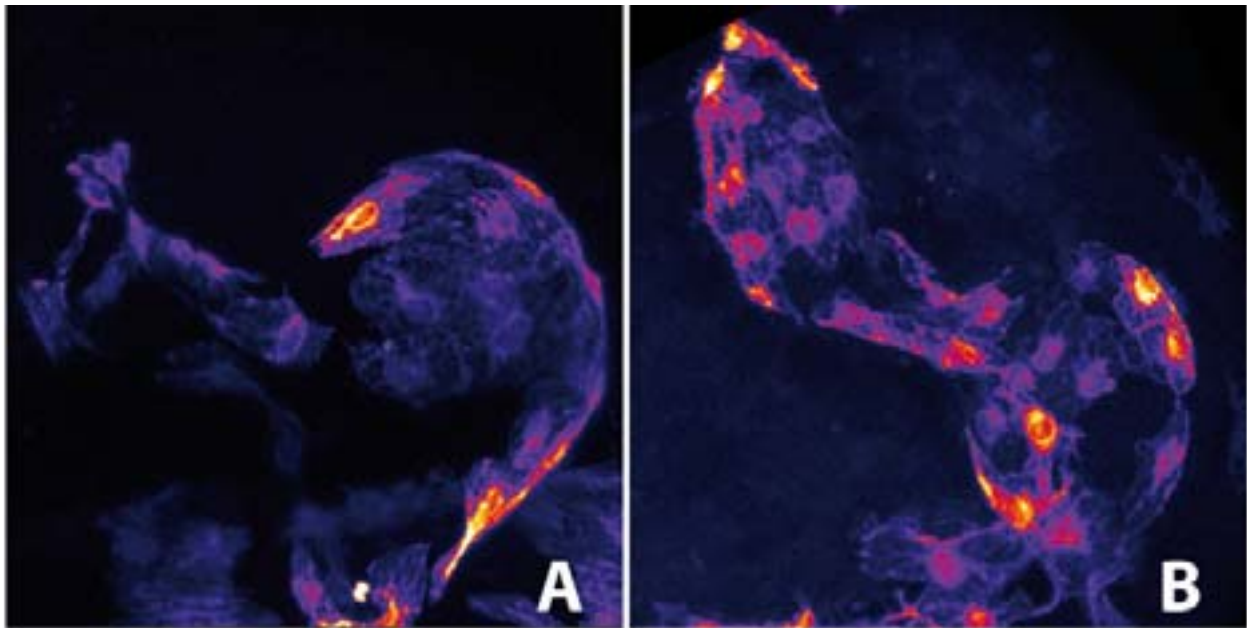
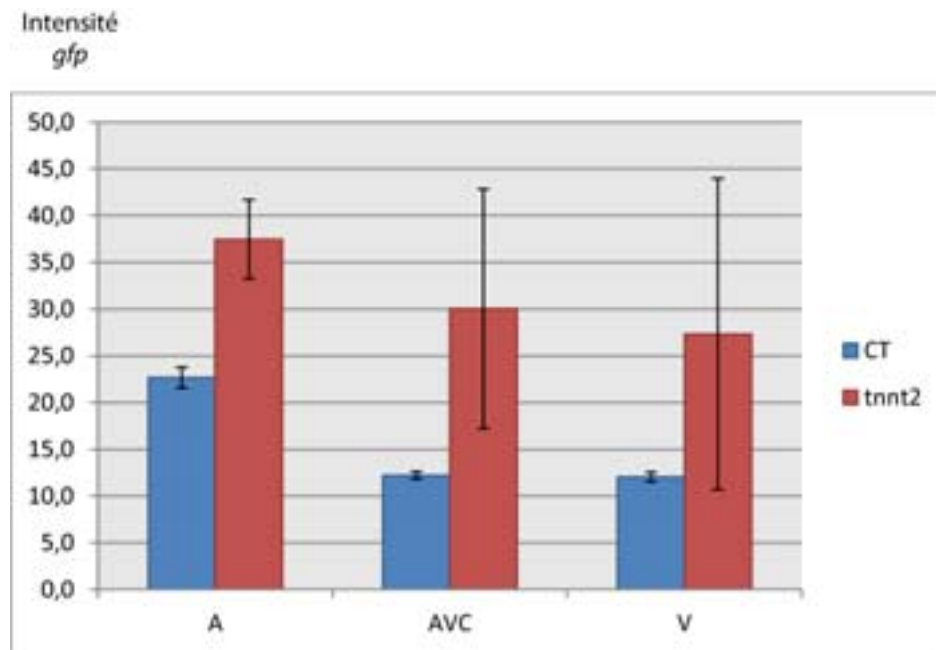


Figure 47: **Activation des canaux calciques TRPV4 après traitement au 4αPDD à 48hpf.** Les poissons contrôles présentent un léger signal calcique dans l'atrium (A) tandis que les poissons injectés avec le morpholino *tnnt2* et traités vingt minutes en 4αPDD à 4μM présentent une augmentation du signal calcique dans l'atrium, le ventricule et l'AVC (B). Cette augmentation d'intensité *gfp* reflète l'activation des canaux membranaires TRPV4.

La mesure de l'intensité calcique avec l'outil Image J permet de confirmer, malgré des variations entre poissons, l'augmentation du signal *gfp* reflétant l'augmentation du calcium intracellulaire (Graphe 31).



**Grphe 31: Mesure de l'intensité calcique après traitement en 4 $\alpha$ PDD à 48hpf.** Les poissons traités pendant vingt minutes avec l'agoniste 4 $\alpha$ PDD à 4 $\mu$ M présentent une large augmentation du signal calcique dans l'atrium, l'AVC et le ventricule (*tnnt2*) par rapport aux poissons contrôles. n=2 pour chaque conditions.

Ces données permettent néanmoins de mettre en évidence l'implication des canaux membranaires TRPV4 et TRPP2 dans l'entrée du calcium dans la cellule. La présence de calcium intracellulaire, même diminuée dans les morphants TRPP2 pourrait être expliquée par le fait que TRPV4, encore actif à la surface membranaire permet l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule. L'absence totale de signal calcique dans les morphants TRPV4 pourrait s'expliquer, en plus de l'inactivation de TRPV4, par le fait d'une inactivation indirecte du canal TRPP2 au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, il a déjà été montré que le calcium intracellulaire, pouvant provenir du canal TRPV4, entraîne l'activation des canaux TRPP2 du RE (Koulen, Cai et al. 2002).

## 5 Conclusion

Les manipulations exercées ci-dessus nous permettent de mettre en évidence, grâce à la lignée Gcamp3.0, la présence de calcium dans les cellules endocardiques du poisson zèbre. Ces expériences nous ont également permis d'observer un phénomène de vague calcique se propageant de l'AVC au ventricule via l'utilisation de la caméra rapide. Ces données ont été confirmées par l'utilisation du microscope confocal SP5 après reconstruction en trois dimensions des cœurs de poissons. Ainsi, la présence de deux pics calciques a pu être observée lors de la systole ventriculaire et en toute fin de cette systole, lorsque le ventricule entame son phénomène diastolique. Ces deux pics sembleraient correspondre au moment où le flux passe de l'atrium au ventricule (premier pic calcique visible) et au moment où le flux reversant s'effectue (second pic). Afin d'approfondir ces données, des calculs mathématiques et des outils permettant de relier le flux au signal calcique en temps réel sont en cours. Outre la présence de pics calciques dans le cœur de poisson, j'ai également pu démontrer la dépendance de ce signal au flux et aux contractions cardiaques, mais également la dépendance de la présence de calcium intracellulaire au canal calcique TRPP2, en utilisant un morpholino, et au canal calcique TRPV4, en utilisant un agoniste de ce dernier.

La mise en évidence de la relation entre le shear stress, les canaux calciques TRPP2 et TRPV4 avec l'entrée du calcium et leur impact sur l'expression génique de *klf2a* nous a amené à nous questionner sur les voies de signalisation moléculaires pouvant intégrer le

signal calcique afin de réguler l'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC et permettre la formation des valves cardiaques. Suite à des découvertes récentes de différents groupes au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la voie moléculaire faisant intervenir la protéine kinase C (PKC) ainsi que la protéine kinase D2 (PKd2) et les histones déacétylases (HDAC) (Vega, Harrison et al. 2004; Just, Berger et al. 2011).

# Chapitre 5

## Mécanotransduction endocardique

# Chapitre 5 : « Mécanotransduction endocardique »

## 1 Introduction

Précédemment décrites, les polycystines sont des protéines ayant un rôle dans la mécanosensation. Malgré cette évidence, peu d'informations sont à ces jours connues quant à ce rôle de senseur. Il a cependant été montré que les polycystines notamment PKD1 et PKD2 (TRPP2), étaient capables de cibler des histones déacétylases (HDACs), dont HDAC5, dans les cellules rénales épithéliales de souris (Xia, Li et al. 2010) permettant alors la régulation de l'expression génique.

Les HDACs sont des enzymes capables d'ôter le groupement acétylé des histones déacétylases, groupement indispensable au maintien de l'enroulement de l'acide désoxyribonucléique (ADN) autour de ces derniers. Par des phénomènes d'acétylations/déacétylations, les HDACs sont capables de réguler l'expression de l'ADN (Tsai, Valkov et al. 2000; Bertos, Wang et al. 2001). Ayant un rôle de répresseur sur la transcription génique, de nombreuses histones déacétylases sont connues chez les mammifères et peuvent être divisés en trois classes en fonction de leur structure, mais aussi en fonction du rôle exercé dans l'organisme. Contrairement aux autres membres, la classe II présente des particularités structurales intéressantes du fait de la présence d'une extension amino-terminale, de sites de liaison permettant à d'autres corépresseurs de se lier, en plus d'un site de liaison séquence-spécifique aux facteurs de transcription de l'ADN (Verdel and Khochbin 1999). Cette classe est divisée en deux sous-groupes contenant d'une part les

HDAC4, 5, 7 et 9 et d'autre part les HDAC6 et 10. Seuls deux de ces enzymes sont retrouvés dans le cœur des mammifères, HDAC5 et HDAC9 (McKinsey and Olson 2004). La présence d'HDAC5 dans les noyaux des cardiomyocytes a ainsi été découverte et permet de supprimer les gènes nécessaires à la croissance cellulaire chez les mammifères (Huynh and McKinsey 2006) et ceci après association avec le facteur de transcription MEF2C (myocyte enhancer factor 2C) (Vega, Harrison et al. 2004). Suite à d'autres études, HDAC5 et MEF2C ont été signalés comme jouant un rôle dans le contrôle de l'hypertrophie cardiaque, en réponse au shear stress et à l'activation des canaux calciques cellulaires (McKinsey, Zhang et al. 2000; Wu, Zhang et al. 2006). L'entrée de calcium dans la cellule suite à un stress active de nombreuses protéines kinases telles la calmoduline kinase II (CamKII), la protéine kinase C (PKC) et les protéines kinases D (McKinsey, Zhang et al. 2000). Il a ainsi été démontré que la protéine kinase C, après réception du signal indiquant un stress par les récepteurs aux protéines G, permettait la phosphorylation des diverses PKD au niveau de leur sérine 812 (Rey, Young et al. 2001). Suite à un stimulus, la phosphorylation de PKD par PKC permet, à terme, celle d'HDAC5.

La phosphorylation d'HDAC5 par PKD2 se révèle être la plus efficace en comparaison à la celle induite par PKD1 ou PKD3 (Huynh and McKinsey 2006) et s'effectue au niveau de la sérine 498. La phosphorylation de PKD2 par la protéine kinase C dépendante de la voie des PDGF (platelet-derived growth factor), facteurs de croissance permettant le contrôle de la croissance et de la division cellulaire ou par le composé chimique phorbol 12-myristate-13-acétate (PMA), entraîne une délocalisation nucléaire de PKD2 vers la membrane plasmique (Hanaoka, Qian et al. 2000; Guo, Gertsberg et al. 2011). Ce processus permet de contrôler la phosphorylation d'HDAC5 ainsi que son export nucléaire (Vega, Harrison et al. 2004). En effet, une fois phosphorylée, PKD2 est activée et peut à son tour phosphoryler HDAC5 au

niveau de sa sérine 498 permettant ainsi l'exportation de cette histone déacétylase du noyau vers le cytoplasme, via la protéine chaperonne 14-3-3. Cette délocalisation nucléaire neutralise l'effet répresseur d'HDAC5 sur les gènes cibles (Vega, Harrison et al. 2004), notamment sur MEF2C. De façon forte intéressante il a été démontré que MEF2C, qui est un membre des MADs box ou MCM1 agamous, deficiens, serum response factor, est capable de se lier au niveau de régions riches en A/T (Molkentin, Li et al. 1996) du promoteur de *KLF2* afin de stimuler son expression chez l'homme (Kumar, Lin et al. 2005). Cette découverte majeure pour mon sujet a également suscité de nombreuses questions vis-à-vis de la capacité de phosphorylation d'HDAC5 en présence de shear stress. Pour répondre à ces questions, Wang et ses collaborateurs ont soumis des cellules humaines HUVECS à diverses conditions de flux et ont montré, par des techniques d'immunoblots, que la présence d'un flux trop faible n'entraînait pas de phosphorylation de l'histone déacétylase contrairement à un flux laminaire élevé. Les auteurs ont également prouvé que la phosphorylation de façon shear-stress dépendante d'HDAC5 dépendait du calcium ainsi que de la calmoduline (Wang, Ha et al. 2010). La dissociation de MEF2C-HDAC5 suite à la phosphorylation de ce dernier entraîne alors l'expression de *KLF2*, qui est MEF2C-dépendant (Kumar, Lin et al. 2005; Atkins and Jain 2007), dans la cellule et ceci de façon shear stress dépendante.

Chez le poisson zèbre, des études similaires ont été menées en vue d'élucider les mécanismes moléculaires amenant à la formation des valves cardiaques. Ainsi, la mise en évidence de la relation PKD2-HDAC5-KLF a également pu être soulignée par l'utilisation de techniques d'hybridation *in situ* (Just, Berger et al. 2011).

La découverte des mécanismes de phosphorylation d'HDAC5 et de son implication dans l'expression génique ont permis de trouver de nombreuses molécules chimiques



permettant d'activer ou bloquer ces phénomènes. L'utilisation de souris ou de poissons zèbres présentant une mutation au niveau de la protéine TRPP2 (que nous appellerons PrKD2 pour la compréhension des résultats) a ainsi pu mettre en évidence la capacité de certaines molécules à restaurer le phénotype de courbure et la latéralité chez les embryons traités. Ainsi, la tricostatine A (Tsai, Valkov et al. 2000) et l'acide valproïque (VPA) (Gottlicher, Minucci et al. 2001), qui sont des inhibiteurs des HDACs, ainsi que le phorbol 12-myristate 13 acétate (PMA) (Castagna, Takai et al. 1982), qui est un activateur de PKC, permettent de réduire les kystes rénaux et le défaut de latéralité retrouvés lors de la mutation de TRPP2.

Basée sur ces découvertes, j'ai à mon tour voulu démontrer, selon le schéma proposé ci-dessous (Figure 48), que la relation entre le shear stress et sa détection par les canaux calciques amenait à l'expression du gène *klf2a* via l'implication des molécules PKC, PKD et HDAC5. Pour ce faire j'ai utilisé les composés chimiques précédemment cités afin d'observer les effets d'une activation ou inhibition de l'une d'entre elles sur l'expression du gène *klf2a* au niveau de l'AVC.

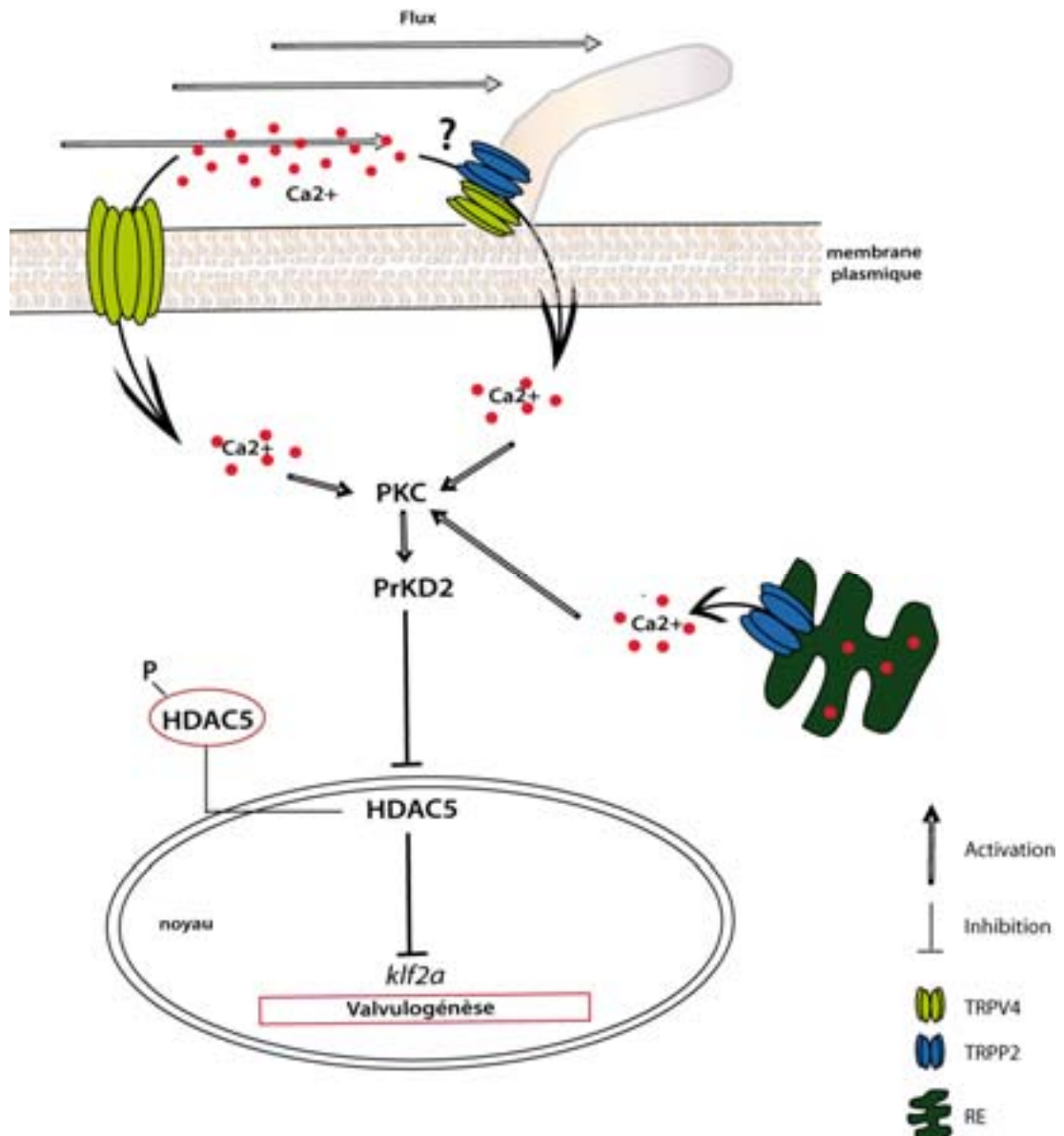


Figure 48 : Schéma proposé amenant à l'activation du gène *klf2a*. Le flux rétrograde présent au niveau des cellules endocardiques est détecté par le canal calcique TRPV4 localisé à la membrane plasmique, et dans une moindre mesure par la colocalisation des canaux calciques TRPV4 et TRPP2 à le long du cil primaire. Cette détection fluidique permet l'entrée massive d'ions calciques à l'intérieur de la cellule permettant : l'activation du canal calcique TRPP2 localisé dans l'ER et l'activation de la protéine kinase C. PKC activée va à son tour activer PrKD2 qui agit sur HDAC5 et permet sa phosphorylation. HDAC5 phosphorylé migre vers le cytoplasme, l'expression génique de *klf2a* est initiée.

## 2 La protéine kinase C intervient dans la régulation de l'expression de *klf2a*

Dans le but d'observer si PKC est impliqué dans la voie moléculaire permettant l'expression du gène *klf2a*, j'ai croisé la lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP; sih+)* entre elle et traité les poissons de 27hpf à 48hpf en PMA 75nM à 28,5°C. Le traitement en PMA permet d'activer la protéine kinase C et, en théorie, la phosphorylation massive de PKD et d'HDAC5, entraînant alors une expression génique de *klf2a*.

L'observation au microscope confocal SP2 à 48hpf nous permet d'ores et déjà d'apercevoir une augmentation de l'expression du promoteur *klf2a* dans la totalité du cœur, qu'il s'agisse de poissons contrôles (poissons exprimant *klf2a* dans le cœur et présentant une contraction et une circulation cardiaque normale) traités en PMA à 75nM (Figure 49 B) que dans les poissons présentant un phénotype *sih* (absence de contractions cardiaque et de flux sanguin) et également traités en PMA (Figure 49 B). L'augmentation du signal *gfp* dans les poissons présentant un phénotype *sih* et traités en PMA par rapport aux poissons présentant un phénotype *sih* mais n'ayant pas subi de traitement (Figure 49 C-D), nous oriente déjà vers une implication de PKC dans la voie moléculaire permettant l'expression génique de *klf2a* dans le cœur de poisson zèbre.

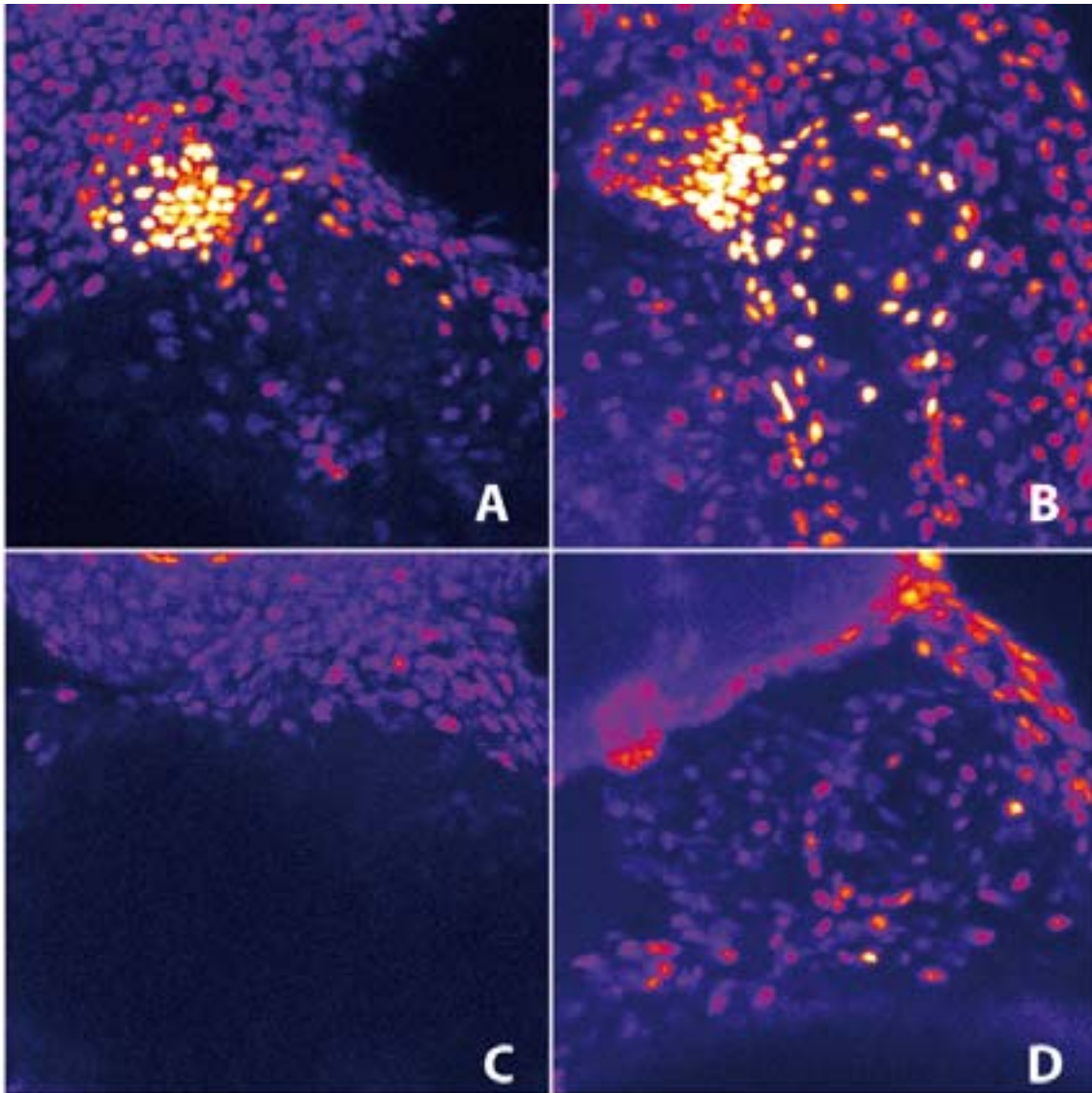
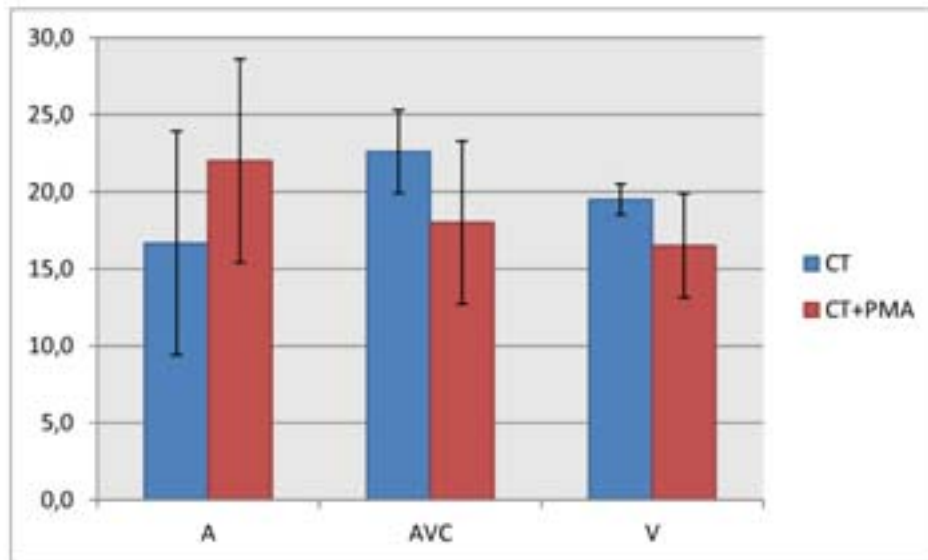


Figure 49 : Activation de PKC par PMA et effet sur l'expression génique de *klf2a* à 48hpf. Présence d'un signal *gfp* positif dans l'AVC et le ventricule des poissons contrôles non traités (A) et absence totale d'expression du promoteur *klf2a\_6kb :h2b-eGFP* dans les poissons ayant un phénotype *sih* et non traités en PMA 75nM (C). Augmentation importante du signal *gfp* dans les poissons contrôles traités avec PMA à 75nM (B) et dans les poissons *sih* traités (D)

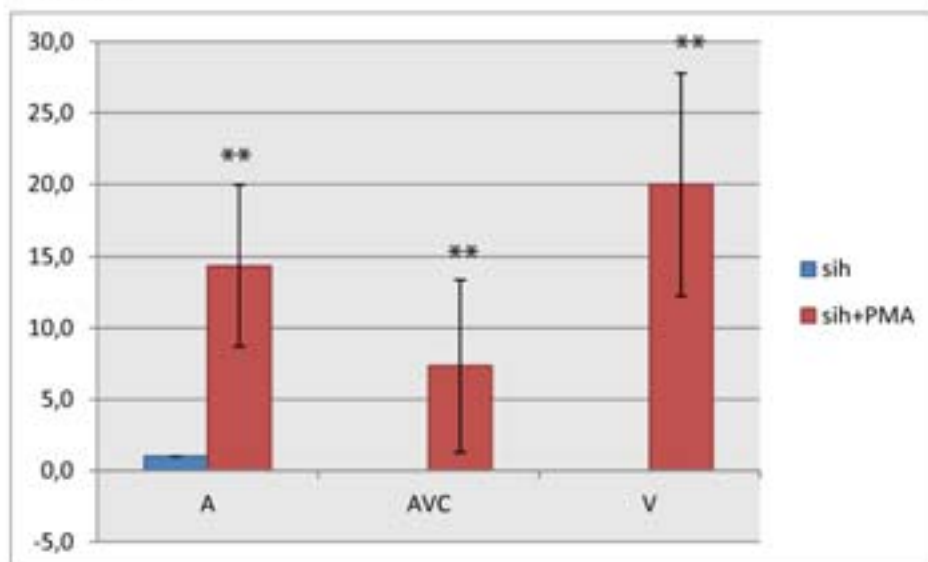
Le **comptage cellulaire** effectué au niveau des cœurs indique une légère augmentation (non significative) du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'atrium et une diminution d'environ quatre cellules (non significative) dans l'AVC et le ventricule chez les poissons contrôles traités avec 75nM de PMA, par rapport aux poissons contrôles non traités (Graphe 32 A-B). Le comptage cellulaire chez les poissons présentant un phénotype *sih* diverge de la méthode de comptage effectuée pour les contrôles. En effet, les poissons *Tg(klf2a\_6kb: h2b-egGFP; sih)* ne présentant aucune cellule *gfp* positive visible dans l'atrium, le ventricule et l'AVC des poissons analysés (Graphe 32 B ; Figure 49 C), j'ai décidé de compter le nombre de cellules observables dans les cœurs des poissons traités et j'ai considéré ces cellules comme ayant une expression *gfp* positive, indépendamment du seuillage effectué lors des comptages cellulaires précédemment montrés. Via cette méthode, les poissons *sih* traités avec la PMA présentent une hausse significative du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'atrium (14 cellules positives), l'AVC (7 cellules positives) et le ventricule (20 cellules positives) en comparaison aux poissons *sih* non traités (Graphe 32 B).

**A**

Nb cellules positives

**B**

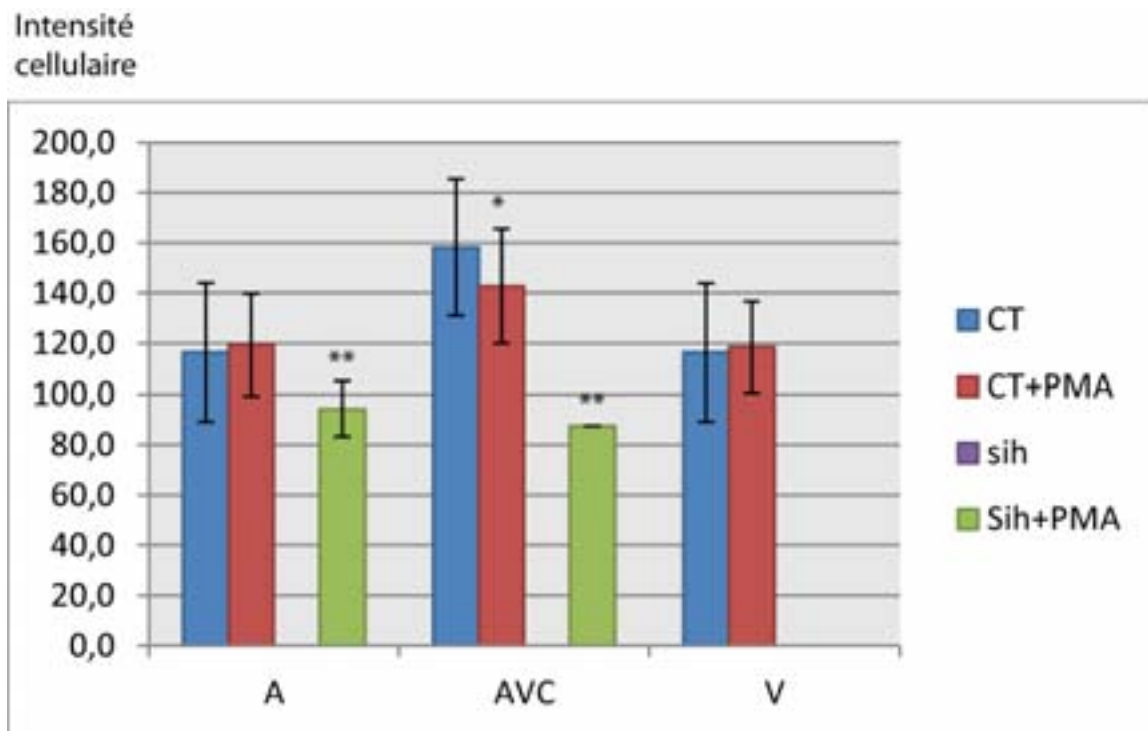
Nb cellules positives



Graph 32: **Comptage cellulaire après traitement des poissons en PMA à 75nM, à 48hpf.** (A) Le nombre de cellules exprimant la *gfp* est similaire dans l'atrium, le ventricule et l'AVC des poissons contrôles traités en PMA (CT+PMA) et non traités (CT). (B) Augmentation significative du nombre de cellules *gfp* positives dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons ayant un phénotype *sih* et traités en PMA (*sih*+PMA) par rapport aux poissons ayant un phénotype *sih* et n'ayant pas subi de traitement en PMA à 75nM (*sih*). \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

Afin d'apercevoir une augmentation, même faible, de l'expression du promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* dans les poissons *sih* traités en PMA, l'expérience menée a nécessité l'augmentation de l'intensité du laser utilisé en temps normal au microscope confocal SP2, résultant d'une saturation nucléaire des cellules retrouvées dans le cœur des poissons contrôles non traités (CT). Afin de confirmer les valeurs d'intensité *gfp* nucléaire obtenues pour les poissons contrôles traités en PMA, un second set d'expérience sans saturation des noyaux est en cours.

**L'intensité cellulaire** mesurée révèle une faible diminution de l'intensité des cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'AVC des poissons contrôles traités avec le PMA à 75nM mais une valeur similaire à celle des poissons contrôles n'ayant pas subi de traitement dans l'atrium et le ventricule. Les intensités *gfp* mesurées dans les poissons *sih* traités en PMA révèlent une augmentation spectaculaire des cellules exprimant la *gfp* au niveau de l'atrium (+ 94%) et du canal atrio-ventriculaire (+ 83%), par rapport aux poissons *sih* contrôles (non traités). Il est à noter que l'intensité de la *gfp* dans les cellules du ventricule n'a pu être mesurée par le logiciel utilisé. En effet, les valeurs d'intensité trop faibles ne peuvent être reconnues et mesurées ([Graphe 33](#)).



**Graphe 33: Mesure de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire après traitement en PMA, à 48hpf.** Observation d'une baisse significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'AVC des poissons contrôles traités en PMA (CT+PMA) par rapport aux poissons contrôles non traités (CT). Augmentation significative de l'intensité *gfp* dans les cellules de l'atrium et de l'AVC des poissons *sih* traités en PMA (sih+PMA) par rapport aux poissons *sih* contrôles (sih). \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

L'augmentation significative du nombre de cellules exprimant le gène *klf2a* dans les poissons *sih* traités ainsi que l'augmentation de son intensité cellulaire dans l'atrium et l'AVC mais aussi au niveau des images obtenues par le microscope SP2 pour les poissons contrôles traités en PMA, permettent d'émettre l'hypothèse que PKC est impliqué dans l'activation de l'expression génique de *klf2a*.

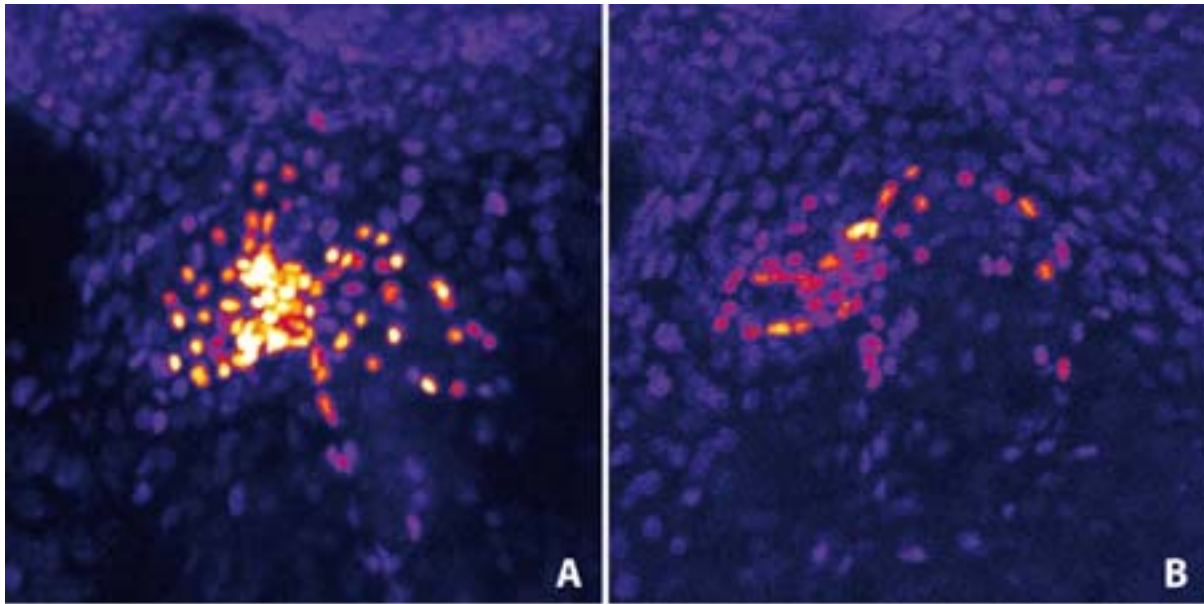


### 3 PrKD2, composant indispensable à l'expression cardiaque de *klf2a*

L'implication de PrKD2 dans la cascade moléculaire permettant l'expression du gène *klf2a* peut être observée en utilisant un traitement en CID permettant d'inhiber cette protéine kinase. En théorie, l'inhibition de PrKD2 amènerait à une absence de phosphorylation d'HDAC5 et maintiendrait l'effet répresseur de l'histone déacétylase 5 sur l'expression du gène *klf2a*.

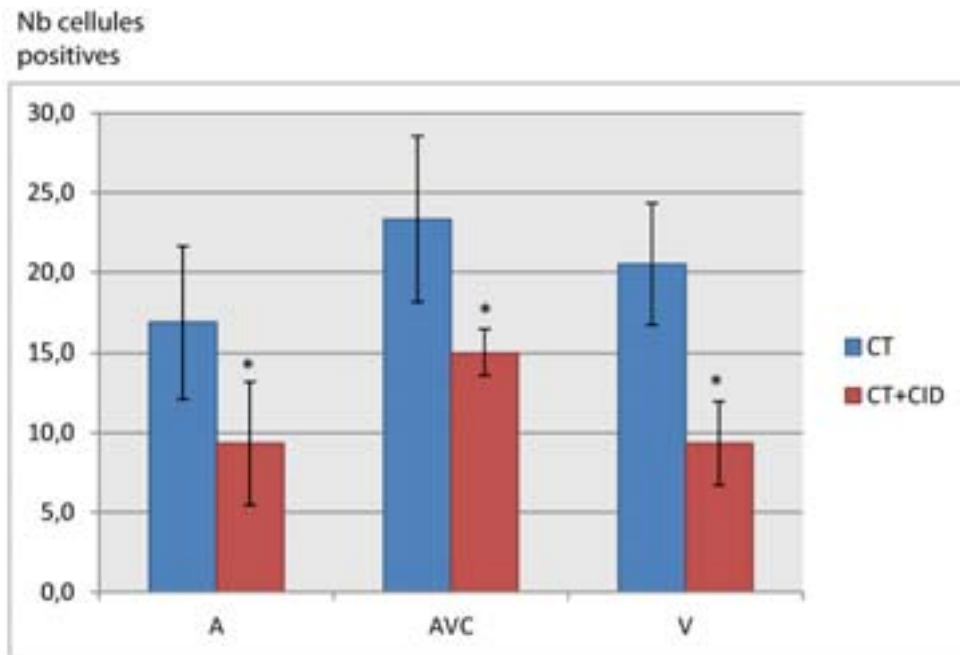
Afin de voir si PrKD2 est impliquée dans la voie de signalisation émise en hypothèse, j'ai croisé la lignée *Tg(klf2a\_6kb :h2b-eGFP ; sih+)* entre elle et effectué un traitement en CID à 180µM de 27hpf à 48hpf à 28,5°C.

A 48hpf, les poissons contrôles traités ne présentent aucun défaut de formation cardiaque ainsi qu'une circulation sanguine et un battement par minute semblables aux poissons non traités. Cependant, leur observation au microscope confocal SP2 présente une baisse importante du nombre de cellules *gfp* positives et de l'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC (Figure 50).

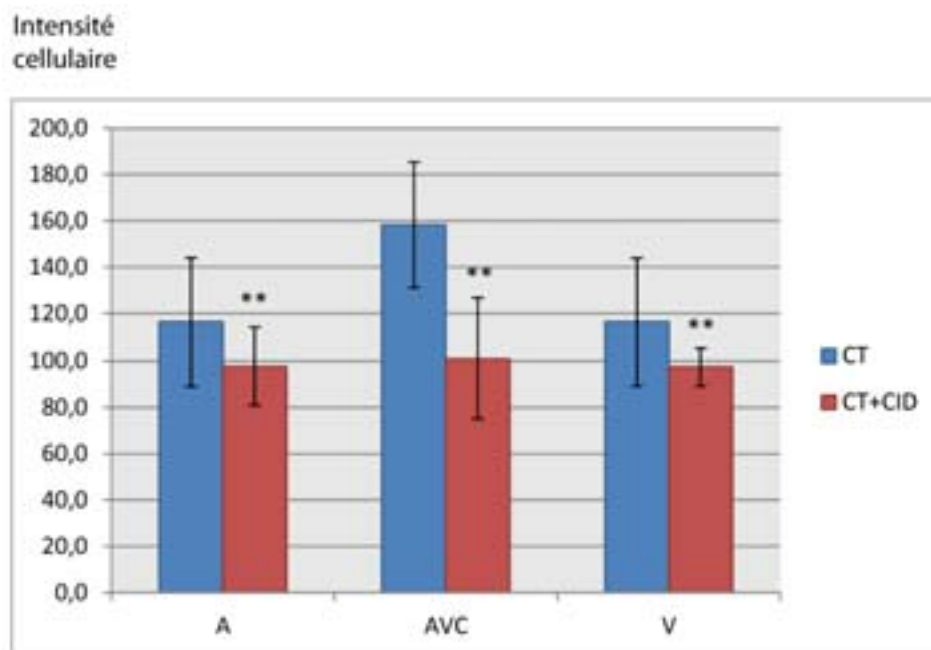


**Figure 50: Observation de l'expression du gène *klf2α* après traitement des poissons contrôles en CID, à 48hpf. Observation d'une baisse importante du signal *gfp* au niveau de l'AVC et du ventricule des poissons contrôles traités en CID à 180μM de 27hpf à 48hpf (B) par rapport aux poissons non traités (A).**

Les **comptages cellulaires** ainsi que les **mesures d'intensités** confirment les diminutions observées au microscope confocal. Une baisse significative du nombre de cellules exprimant la *gfp* est observée dans l'atrium (baisse de 45%), dans l'AVC (baisse de 35%) ainsi que dans le ventricule (baisse de 55%) par rapport aux poissons contrôles non traités (Graphe 34). Ces baisses du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2α\_6kb :h2b-eGFP* corrélient avec les baisses observées lors de la mesure d'intensité des cellules exprimant la *gfp*, dans l'atrium, le ventricule et l'AVC. L'AVC est la région présentant la diminution significative la plus importante. En effet, une baisse de près de 60% de l'intensité *gfp* cellulaire est observée par rapport aux poissons contrôles (Graphe 35).



Graphe 34: Comptage cellulaire après traitement des poissons contrôles en CID à 180 $\mu$ M. Le nombre de cellules exprimant la *gfp* est significativement diminué dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons contrôles traités en CID 180 $\mu$ M de 27hpf à 48hpf (CT+CID) par rapport aux poissons non traités (CT). \*P<0,05.



Graphe 35: Mesure de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire après traitement des poissons contrôles en CID à 180 $\mu$ M. L'intensité *gfp* des cellules est significativement diminuée dans l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons traités (CT+CID) par rapport aux poissons non traités (CT). \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

La mise en évidence d'une baisse du nombre de cellules exprimant *klf2a* ainsi que de l'expression de l'intensité de la *gfp* au niveau de l'atrium, l'AVC et le ventricule des poissons contrôles traités avec l'inhibiteur de PrKD2, CID, nous permettent de proposer l'idée que l'activation de PrKD2 est nécessaire pour l'activation de l'expression endocardique de *klf2a*.

#### 4 HDAC5 joue un rôle dans la voie moléculaire amenant à l'expression *klf2a*

Afin de déterminer l'implication d'HDAC5 dans la voie moléculaire amenant à l'expression du gène *klf2a* au niveau de l'AVC, j'ai utilisé deux méthodes différentes à partir du croisement de la lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP; sih+)*. J'ai dans un premier temps décidé d'injecter le morpholino HDAC5 (cf. matériel et méthodes) afin de bloquer directement la formation protéique d'HDAC5 puis, dans un second temps utilisé cette même lignée pour traiter les poissons contrôles et *sih* avec la tricostatine A (Tsai, Valkov et al. 2000) à 500nM, qui est un inhibiteur de l'histone déacétylase5. En théorie, l'inhibition ou le blocage protéique d'HDAC5 amène à une dé-répression génique et donc, en suivant notre hypothèse, à une augmentation de l'expression du gène *klf2a* au niveau de l'AVC afin de former des valves cardiaques fonctionnelles à 96hpf.

Les poissons injectés avec HDAC5Mo présentent un aspect général normal, un œdème cardiaque moyen ainsi qu'une circulation sanguine et des contractions cardiaques normales.

Les images obtenues au microscope confocal SP2 permettent d'observer une augmentation impressionnante de l'expression du gène *klf2a* dans l'AVC et le ventricule des

poissons injectés ou traités. En effet, les poissons injectés avec HDAC5Mo présentent une saturation au niveau des cellules de l'AVC et du ventricule (Figure 51 B) et les poissons contrôles traités en TSA, qui présentent un atrium très dilaté, possèdent une très forte augmentation de l'expression du reporter *klf2a\_6kb :h2b-eGFP* dans ce dernier (Figure 51 C). Les poissons présentant le phénotype *sih* et traités présentent, eux aussi et par rapport à leurs contrôles *sih* non traités (Figure 51 D), une expression largement supérieure du gène *klf2a* au niveau de l'atrium (Figure 51 E).

Les **comptages cellulaires** effectués au niveau des morphants HDAC5 présentent une augmentation significative de plus de 40% du nombre de cellules exprimant la *gfp* dans l'atrium ainsi qu'une légère baisse (trois cellules) dans l'AVC et une légère hausse dans le ventricule (+ 5 cellules) du nombre de cellules *gfp* positives par rapport aux contrôles (Graphe 36 ). Le dénombrement cellulaire, effectué au niveau de l'atrium des poissons contrôles traités avec TSA (l'AVC et le ventricule étant masqués par la dilatation de l'atrium et donc inaccessibles à l'imagerie confocale) présente un nombre identique de cellules (n=17) exprimant *klf2a* par rapport aux contrôles (CT) (Graphe 36 ), ce qui n'est pas le cas des poissons *sih* traités, qui présentent quant à eux une hausse significative du nombre de cellules dans l'atrium (7cellules), l'AVC (3 cellules) et le ventricule (6 cellules) par rapport aux poissons *sih* non traités (*sih*) (Graphe 36).

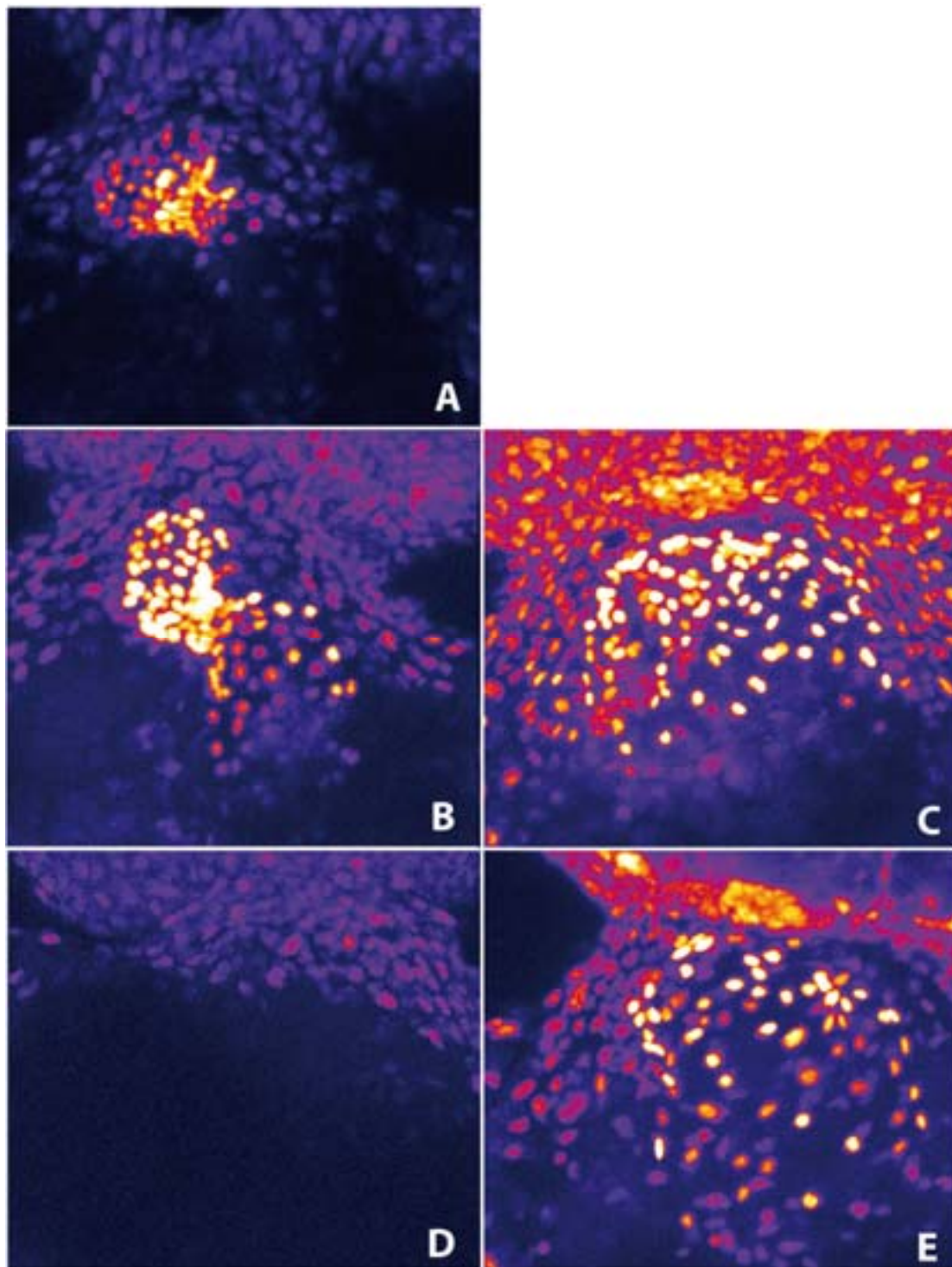
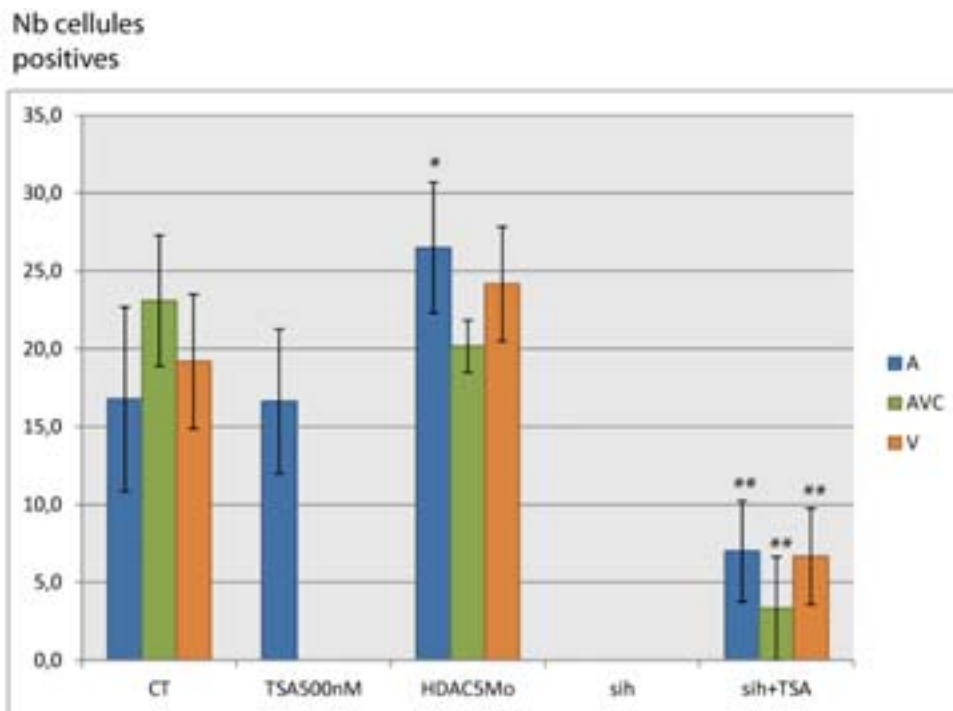


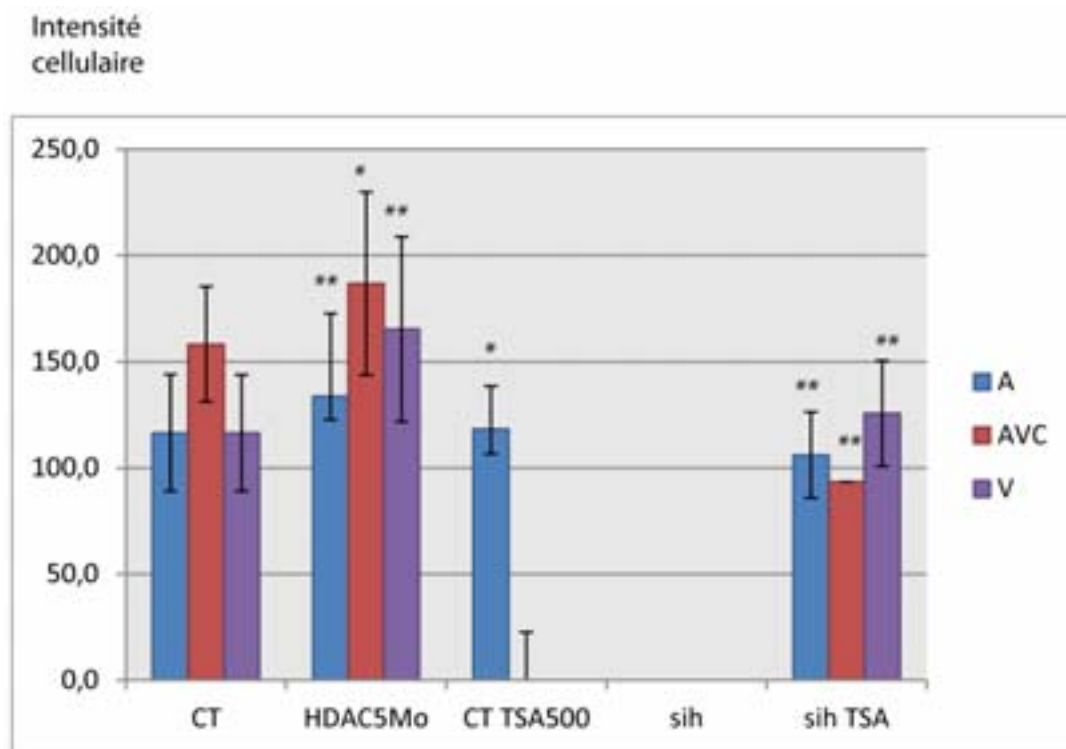
Figure 51: L'expression du promoteur *klf2a* est augmentée dans le cœur des poissons injectés avec HDAC5Mo et traités avec 500nM de TSA. Les morphants HDAC5 (B) ainsi que les poissons contrôles traités en TSA 500nM de 27hpf à 48hpf (C) présentent une large augmentation de l'expression *klf2a* dans le cœur en comparaison aux poissons contrôles (A). Les poissons *siH* traités en TSA présentent une augmentation importante du signal *gfp* dans l'atrium par rapport aux poissons *siH* non traités (D).



**Graphe 36: Comptage cellulaire après traitement des poissons contrôles en TSA 500nM ou après injection avec le morpholino HDAC5.** Le nombre de cellules exprimant la *gfp* est significativement augmenté dans l'atrium des poissons injectés avec HDAC5Mo (HDAC5Mo) mais similaire à ceux des poissons contrôles (CT) dans l'AVC et le ventricule. Les poissons traités en TSA à 500nM de 27hpf à 48hpf (TSA500nM) n'ont pas plus de cellules exprimant *klf2a* dans l'atrium que dans les poissons contrôles, à l'inverse des poissons *sih* traités (sih+TSA) par rapport aux poissons non traités.  
\*P<0,05 ; \*\*P<0,001.

Les **mesures d'intensités** confirment les observations faites avec les images obtenues au SP2. Les morphants HDAC5 présentent une hausse significative de l'intensité *gfp* cellulaire au niveau de l'AVC, du ventricule et de l'atrium, région présentant également une hausse significative de cette intensité chez les poissons contrôles traités en TSA (Graphe 37). Tout comme les poissons contrôles ayant subi le traitement, les poissons présentant un phénotype *sih* et traités en TSA à 500nM présentent une augmentation très importante de l'intensité *gfp* au niveau de l'atrium, du ventricule et de l'AVC (Graphe 37).





**Graphe 37: Mesure de l'intensité du transgène *klf2a* nucléaire après traitement des poissons contrôles en TSA 500nM ou après injection avec le morpholino HDAC5, à 48hpf. L'intensité *gfp* des cellules est significativement augmentée dans l'atrium des poissons injectés avec HDAC5Mo par rapport aux poissons contrôles (CT). Les poissons *sih* traités en TSA (*sih*+TSA) présentent une hausse significative de l'intensité *gfp* au niveau de l'atrium, de l'AVC et du ventricule par rapport aux poissons *sih* non traités (*sih*). \*P<0,05 ; \*\*P<0,001.**

Mis en commun ces résultats démontrent une implication d'HDAC5 dans la voie moléculaire menant à l'expression de *klf2a*.

## 5 Conclusion

L'augmentation de l'expression du gène *klf2a* et de l'intensité cellulaire au niveau des cellules de l'AVC après activation de la protéine kinase C et après l'inhibition de l'enzyme



HDAC5 par son morpholino ou par le traitement en TSA ainsi que la diminution de l'expression du promoteur *klf2a* et de son intensité dans les cellules du canal atrioventriculaire après traitement en CID nous permet, en comparaison avec les poissons contrôles, de confirmer l'appartenance à la même voie moléculaire de ces trois composants ainsi que leur importance au niveau de la régulation de l'expression de *klf2a* au niveau de l'AVC, afin d'aboutir à la formation de valves cardiaques à 48hpf.

La présence d'une augmentation, à 48hpf, du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* et de son intensité nucléaire dans les poissons présentant un phénotype *sih* et traités soit avec PMA, soit avec TSA, nous indique également la capacité des protéines PKC et HDAC5 à surpasser l'absence de flux au niveau des cellules endothéliales. Cette information est importante puisque, contrairement à celles faisant intervenir le flux dans diverses conditions, aucune étude n'a été menée pour montrer une quelconque capacité des protéines PKC et HDAC5 à activer l'expression génique de *klf2a* en absence total de flux.

Afin de mieux caractériser ces composants et leur rôle au sein de la voie moléculaire, mais aussi dans le but de valider ces résultats préliminaires, j'effectue actuellement de nombreuses expériences de western blot dans le but de visualiser la phosphorylation de PrKD2 en présence de flux.

# DISCUSSION

## Discussion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des forces hémodynamiques ainsi qu'aux voies de mécanotransduction pouvant intervenir dans le contrôle de l'expression génique de *klf2a*, un gène important pour la formation des valves cardiaques chez le poisson zèbre. La construction de lignées transgéniques *klf2a:h2b-eGFP* m'a permis de générer un outil permettant l'étude de l'expression endocardique du gène *klf2a* en fonction de diverses conditions de shear stress. Après avoir démontré que la lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)* récapitule en grande partie l'expression endogène de *klf2a*, j'ai pu étudier le rôle des forces hémodynamiques présentes dans l'endocarde sur l'activité de ce transgène. Bien que cette approche a permis d'explorer la voie de signalisation activant le transgène, elle se révèle limitée, mes travaux ne permettent pas de dissocier de façon certaine le rôle des contractions cardiaques et celui du flux sanguin dans l'initiation de l'expression de *klf2a*, les deux étant fortement interdépendants. Une manière de clarifier ce problème serait d'utiliser les mutants de la lignée *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP: sih+)*, ne présentant aucun flux ni activité contractile et de générer une tension connue et régulière sur le cœur, (par exemple à l'aide d'un système qui étirerait le cœur et qui simulerait les mouvements myocardiques contractiles pendant un temps donné, et de manière symétrique, empêchant alors la génération d'un flux sanguin). Cette expérience est difficile mais faisable car il est possible de mettre en culture le cœur de poisson après microdissection pendant plusieurs heures et de nombreux appareils produisant des étirements contrôlés sont développés dans les laboratoires d'ingénierie cellulaire et tissulaire (Huang et al 2010 ; Rana et al 2008). Cela nous permettrait d'observer, sous microscope confocal, l'éventuelle augmentation de l'expression génique de *klf2a*. Une

augmentation de la fluorescence *gfp* dans l'endocarde des poissons nous permettrait de conclure que les contractions cardiaques sont impliquées dans le mécanisme entraînant l'expression du gène *klf2a*.

### Rôle du gène *klf2a* lors de la valvulogénèse

Outre la capacité de l'expression génique de *klf2a* à être régulée par le flux reversant, la diminution du nombre total de cellules dans l'AVC après injection des morpholinos affectant la contraction et la viscosité (*gata2*) sanguine, nous interroge sur le rôle potentiel du gène *klf2a* lors de la valvulogénèse. En effet, nous avons pu observer tout au long de mes travaux, qu'une baisse du nombre total de cellules dans l'endocarde corrèle, dans la majorité des cas, avec une baisse du niveau d'expression du transgène *klf2a*. Des études menées sur ce point montrent que *klf2a*, activé par le flux dans les cellules endothéliales, est capable d'activer à son tour, et par l'intermédiaire du miRNA-126, l'expression de la voie de signalisation VEGF aboutissant alors à une activité angiogénique (Nicoli et al 2010). D'autres études, ont permis de mettre en évidence l'implication du shear stress comme activateur de la prolifération cellulaire dans des zones où un flux oscillant est présent (Chiu et al 1998 ; Davies et al, 1986 ; Levesque et al, 1990). Il est donc tentant de suggérer que la baisse du nombre de cellules totales dans l'endocarde des poissons présentant un flux réduit, est due à une baisse de la prolifération cellulaire, elle-même liée à la baisse de l'expression du gène *klf2a*. Cette hypothèse reste cependant à démontrer car il a été montré qu'un flux oscillant imposé sur des arcs aortiques de rats inhibe l'expression de *klf2* et augmente la prolifération cellulaire (Lee et al 2012). Ces résultats sont en contradictions avec les observations que j'ai pu faire avec les morphants *gata1* où le flux reversant (Vermot, Forouhar et al. 2009) et

l'expression de *klf2a* sont drastiquement augmentés. Des études sont actuellement menées au laboratoire par Emily Steed, post-doctorante, afin de déterminer l'éventuelle implication de *klf2a* dans cette prolifération, notamment lors de la valvulogénèse. Après injection d'un morpholino dirigé contre *klf2a* dans la lignée *Tg(fliNLS-mCherry) nacre+/-*, Emily a observé une baisse du nombre de cellules totales dans le ventricule uniquement, ainsi qu'une absence de bourrelets endocardiques à 72hpf accompagnée d'une expression Dm-grasp très prononcée dans l'AVC. Bien qu'encore au stade préliminaire, ces données laissent entrevoir un rôle du gène *klf2a* dans la prolifération cellulaire endocardique. Afin d'approfondir ces données, une surexpression du gène *klf2a* a également été menée via la création de la lignée transgénique *Tg(fli1a : klf2a-UAS : cmlc2-eGFP)*. Les poissons de cette lignée présentent un atrium extrêmement dilaté ainsi qu'un ventricule contracté au maximum, phénotype faisant penser à celui retrouvé chez les poissons traités en TSA. Récemment créée, cette lignée montre aussi une réduction de la migration des vaisseaux sanguins à 30hpf mais son action au niveau des valves cardiaques reste encore à définir.

Bien que le rôle de *klf2a* dans l'angiogenèse reste à définir, la baisse du nombre de cellules exprimant *klf2a* et la présence d'un nombre de cellules totales similaire aux poissons contrôles dans l'AVC des morphants *amhc* et *vmhc*, en plus de l'augmentation de ces deux paramètres dans les morphants *gata1* en comparaison aux poissons non injectés, nous permet tout de même de conclure sur certains points. En effet, ces données nous montrent d'une part, l'excès de mécanodétection fluïdique des poissons injectés avec *gata1* et suggèrent d'autre part, l'existence d'une relation entre la quantité de flux et le degré d'activation de l'expression génique de *klf2a*. Déterminer la quantité de flux minimal nécessaire à l'activation du gène *klf2a* serait alors un élément relativement intéressant pour notre étude, car il permettrait de savoir, par comparaison, s'il correspond à la quantité de

force nécessaire à la formation des valves. En effet il n'est pas exclu que d'autres gènes soient activés par des flux de forces différentes et pouvant être impliqués dans le développement valvulaire.

### **La tension cellulaire pourrait être impliquée dans la ciliogénèse endocardique**

Suite à la confirmation de la dépendance au flux reversant de la lignée transgénique *Tg(klf2a\_6kb: h2b-eGFP)*, je me suis intéressée aux divers mécanismes capables de détecter le flux à la surface des cellules endothéliales. La mise en évidence de la présence de cils dans l'endocarde du poisson zèbre, encore jamais étudiée à ce jour, a constitué le premier senseur fluide auquel je me suis intéressée après la caractérisation de la lignée transgénique *Tg(klf2a\_6kb :h2b-eGFP)*. Déjà connu pour leur rôle de mécanosenseurs dans des organes tels que le rein ou le pancréas des mammifères (Praetorius et Spring 2001), le rôle des cils dans l'endocarde des mammifères reste encore à définir, de même que pour le *Danio rerio*.

L'utilisation de lignées transgéniques créées au laboratoire et surexprimant la protéine ciliaire Arl13b-eGFP, m'a permis de montrer la présence de cellules ciliées dans l'endocarde des poissons contrôles à 30hpf et 48hpf, données confirmées par microscopie électronique. Afin d'observer si, comme dans le cœur de souris (Slough, Cooney et al 2008) ou de poulet (Van der Heiden, Groenendijk et al. 2006), les cils disparaissent ou réduisent leur taille en présence d'un shear stress élevé, j'ai injecté divers morpholinos dans le but d'augmenter ou décroître ce shear stress. La réduction du pourcentage de cellules ciliées chez les morphants *gata1*, en comparaison avec les poissons contrôles suggère qu'une augmentation du flux reversant inhibe la ciliogénèse endocardique des embryons à 48hpf. Par comparaison l'absence de flux chez les morphants *tnnt2* n'affecte pas le pourcentage de

cellules ciliées mais un changement dans la distribution des cils, notamment dans le canal atrioventriculaire. Ces particularités nous permettent de soulever la question de la nécessité de la présence du flux et de la contraction cardiaque pour le contrôle de la ciliogénèse ainsi que de son maintien. Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation du nombre de cellules ciliées dans l'endocarde des morphants *cmlc2* par rapport aux poissons contrôles à 48hpf. La majorité des cils retrouvés chez les morphants *cmlc2* se situent dans le ventricule et non dans l'atrium (ce qui est le cas pour les contrôles et les autres morphants). Cette localisation pourrait s'expliquer par le fait d'une tension trop importante au niveau des cellules de l'atrium (du fait de la dilatation atriale) ou encore d'un shear stress réduit dans le ventricule à ce moment du développement chez les morphant *cmlc2*, favorisant alors la formation ciliaire dans le ventricule. De manière intéressante, les morphants *cmlc2* présentent de nombreux cils orientés vers le myocarde et non vers le lumen. Cette orientation atypique, pourrait être due à un excès de tension exercé au niveau cellulaire ou à un problème dans la mise en place de la polarité des cellules endocardiques. En effet, des études ont montré que la polarité apico-basale de la cellule ainsi que le positionnement du cil dépendent de la tension cellulaire (Pitaval et al 2010). Il serait donc intéressant de savoir si la tension générée par le flux sur les cellules endocardiques est impliquée dans la ciliogénèse. Des expériences de culture cellulaire pourraient être entreprises pour adresser cette question. Par exemple, il pourrait être utile de quantifier la ciliogénèse au niveau des cellules endothéliales en culture en fonction d'un flux croissant.

## **Les cils endocardiques ne peuvent pas expliquer la réponse cellulaire observée en réponse au flux**

Malgré la présence de cils dans l'endocarde du poisson zèbre, peu de cellules ciliées sont retrouvées dans l'endocarde. En effet, seulement 30% des cellules endocardiques possèdent un cil à 48hpf. Ce faible taux suggère un rôle mineur de ces derniers dans la détection fluide endocardique mais ne nous permet pas d'exclure leur éventuelle fonction dans la cardiogénèse et la mécanodétection fluide. Afin d'observer l'importance des cils dans l'endocarde, j'effectue actuellement une expérience visant à bloquer la ciliogénèse via l'injection d'un morpholino dirigé contre une protéine de transport intraflagellaire : ift88. Les résultats à venir nous permettront d'observer l'impact de l'absence de cils endocardiques sur la formation cardiaque et plus précisément sur la valvulogénèse.

## **Les canaux calciques TRPV4 et TRPP2 semblent être les mécanodétecteurs endocardiques fluidiques majeurs.**

L'hypothèse du cil comme étant un mécanodétecteur fluide potentiel dans l'endocarde des poissons à 48hpf, je me suis intéressée à d'autres mécanismes moléculaires de la détection fluide. La description du canal calcique TRPV4, retrouvé à la base de cils primaires dans des cellules MDCK, formant un complexe sensible polymodal avec TRPP2 (Kottgen, Buchholz et al. 2008), en ont fait, en plus de la localisation endocardique spécifique de TRPV4 (Mangos, Liu et al, 2006), des bons candidats pour l'étude de la mécanodétection endocardique. Localisés en surface des cellules endocardiques (TRPV4) ou dans le cytoplasme (TRPP2) de ces dernières, j'ai pu démontrer l'importance de ces



canaux calciques dans la mise en place de l'expression génique de *klf2a* ainsi que dans la valvulogénèse, et ceci de façon shear-stress dépendante.

Dans le but de confirmer ou infirmer ces données, des lignées permettant la surexpression stable de TRPV4 et TRPP2 dans l'endocarde sont en cours de géotypage au laboratoire. Il sera intéressant dans le futur, d'étudier le mécanisme moléculaire permettant l'ouverture du canal calcique TRPV4 en réponse à la déformation de la membrane cellulaire.

Même si j'ai démontré l'implication de ces canaux dans le processus menant à la formation des valves cardiaques, je n'ai pu mettre en évidence une colocalisation ciliaire de ces deux protéines. Le faible nombre de cellules ciliées pouvant être à l'origine de cette absence, il serait envisageable d'effectuer un double immunomarquage fluorescent de ces canaux sur les lignées possédant la fusion Arl13b-RFP.

### **Le niveau de calcium intracellulaire révèle les différents compartiments endocardiques**

Ces canaux membranaires, étant connus pour permettre le passage des ions calciques, un autre point intéressant de cette thèse a été d'étudier la réponse calcique des cellules endothéliales en réponse au flux. J'ai pu apercevoir, chez des poissons contrôles, un signal calcique plus important dans le ventricule et l'AVC par rapport à l'atrium ainsi que la présence de deux pics d'intensité calcique lors de la phase de contraction du ventricule et en toute fin de cette systole, lorsque que la chambre ventriculaire commence à se relâcher. De façon intéressante, ces pics calciques semblent intervenir au moment où le flux sanguin passe de l'atrium au ventricule, mais également lors la phase de flux reversant. Pour valider cette observation, j'ai commencé à travailler avec Francesco Boselli dans le but de modéliser

le cœur et d'obtenir une carte précise de la distribution du shear-stress au cours de la contraction cardiaque. J'ai effectué une reconstruction en trois dimensions du flux sanguin présent dans le cœur d'un poisson à 48hpf en utilisant une lignée transgénique marquant les globules rouges. La dynamique du cœur reconstruit nous permet d'obtenir des conditions de vitesse observées *in vivo* qui sont nécessaires pour la simulation. Ce modèle sera utilisé pour estimer le shear stress au niveau des cellules endothéliales et permettra de relier directement ce dernier au calcium intracellulaire observé dans les poissons GCamp3.0. Cette procédure est toujours en cours pour les poissons ayant été injectés avec les morpholinos atteignant la contraction et la vitesse cardiaque et est effectuée par Francesco, qui utilise les données générées au cours de ma thèse.

### **Le calcium endocardique est un élément important dans la mécanotransduction**

Le rôle du calcium dans le contrôle de l'expression du gène *klf2a* reste à définir. De plus, nous ne pouvons pas certifier que le calcium intracellulaire visualisé dans l'endocarde des poissons dépende en totalité du flux et des contractions. En effet, la présence d'un faible signal calcique dans les morphants *tnnt2* suggère que le calcium intracellulaire, même faible, est aussi présent en l'absence de ces deux paramètres. En se basant sur la démonstration effectuée sur des cellules endothéliales vasculaires en culture par Ando et ses collaborateurs (Ando et al, 1994), il se pourrait que ce signal résiduel soit dû à un autre type de stress cellulaire, comme la tension basale entre les cellules endocardiques pouvant être observée dans les mutants *tnnt2*. De la même façon, l'augmentation du signal calcique intracellulaire observé chez les morphants *cmhc2*, pourrait être expliquée par un stress physique excessif

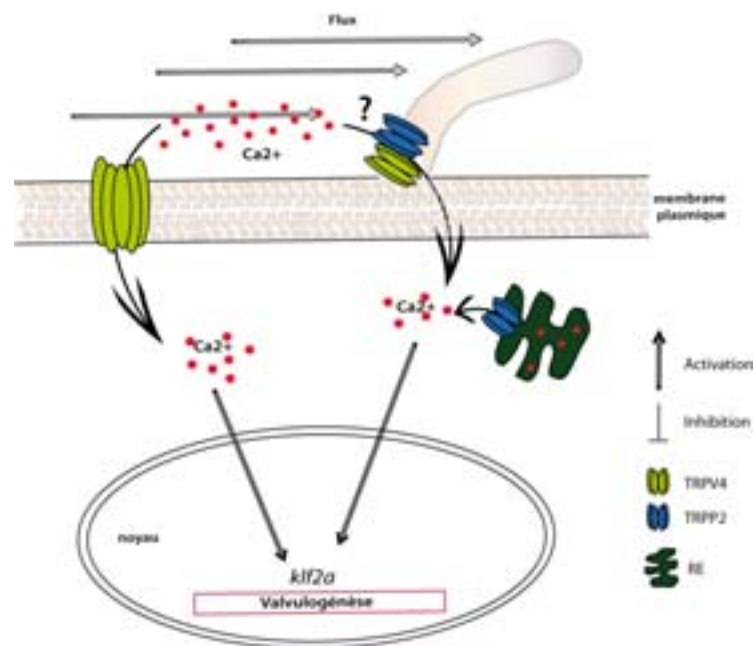
exercé au niveau des cellules de l'endocarde, mais également par un excès de mécanodétection lié à l'orientation des cils vers le myocarde. En effet, possédant une orientation anormale des cils vers le myocarde et non vers le lumen endocardique, ces derniers pourraient sentir le flux retrouvé entre les deux couches cardiaques cellulaires et induire une réponse calcique. La confirmation de cette hypothèse pourrait être faite en inhibant, encore une fois, la protéine de transport intra-flagellaire ift88.

### **L'entrée de calcium endocardique en réponse au flux est engendrée par TRPV4 et TRPP2.**

Suite à la visualisation d'un signal calcique dans l'endocarde, j'ai également pu confirmer la dépendance de ce dernier vis-à-vis des canaux membranaires TRPV4 et TRPP2. N'ayant pu observer une expression du transgène GCamp3.0 dans les poissons injectés avec *trpv4Mo*, l'utilisation d'un agoniste à ce canal est encore en cours d'étude mais permet tout de même de confirmer l'implication du canal membranaire TRPV4 dans l'entrée du calcium dans la cellule. Bien que prometteurs, ces résultats pourraient être amplifiés par l'utilisation d'un autre agoniste, le 4 $\alpha$ PDH, décrit comme étant dix fois plus efficace que le 4 $\alpha$ PDD, ou encore en traitant des poissons de ces lignées injectés avec *cm1c1*, présentant un minimum de flux et de contractions cardiaques.

Jusqu'à présent, les données obtenues nous ont permis de dire avec certitude que la lignée *Tg(klf2a\_6kb:h2b-eGFP)* est un bon outil d'étude pour suivre l'expression du gène *klf2a* lors de la valvulogénèse mais nous ont également montré la dépendance au flux de cette dernière, de même que le positionnement en amont du gène *klf2a* des canaux calciques TRPV4 et TRPP2. La régulation de l'activation des canaux membranaires TRPV4 et

TRPP2 ainsi que du taux de calcium intracellulaire par le flux nous permet ici d'émettre l'hypothèse selon laquelle le flux, détecté par les canaux membranaires et, potentiellement, les cils, entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, permettant à terme l'activation de l'expression du gène *klf2a* et la formation des valves cardiaques.



**Figure 52 : Détection fluidique et activation du gène *klf2a*. Le flux permet l'entrée de calcium intracellulaire via les canaux calciques TRPP2 et TRPV4. Le calcium active l'expression de *klf2a* permettant la valvulogénèse.**

### La signalisation intracellulaire liée à la voie de mécanotransduction semble impliquer PrKD2 et les HDACs.

Suite à l'implication du calcium et des canaux membranaires TRPP2 et TRPV4 dans l'expression génique de *klf2a*, j'ai étudié la voie moléculaire faisant intervenir les protéines kinases C et D ainsi que les histones déacétylases. La mise en évidence de la relation entre le

calcium, PKC-PKD et HDAC5 a, à ce jour bien été décrite chez les mammifères (McKinsey al 2000 ; Rey, Young et al 2001 ; Xia, Li et al 2010) et mise à jour chez le poisson zèbre, notamment au niveau de la valvulogénèse (Just, Berger et al 2011). Cependant aucune étude n'avait permis de mettre en évidence la relation entre cette voie moléculaire et l'expression génique de *klf2a* en absence de flux. Via des traitements chimiques j'ai pu mettre en évidence l'implication de cette voie moléculaire dans la mise en place de l'expression génique de *klf2a* au niveau de l'AVC. La mise en évidence de l'augmentation du nombre de cellules exprimant le promoteur *klf2a\_6kb:h2b-eGFP* ainsi que de son intensité nucléaire dans les cellules endocardiques des poissons ne présentant aucun flux ni contractions, mais traités avec PMA et TSA, a été un des évènements majeur de cette partie. En effet, ces augmentations, en plus de confirmer l'implication de PrKD2 et HDAC5 dans la mise en place de l'expression génique de *klf2a*, m'ont permis de montrer la capacité de ces deux composants à surpasser l'absence de flux et de contractions cardiaques, pourtant indispensable à la bonne expression de notre gène d'intérêt. Afin de compléter ces données, je suis actuellement en train d'effectuer des westerns blots dans le but de montrer une phosphorylation de PrKD2.

Connu pour activer PKC, une autre expérience pourrait aussi être menée pour mettre en évidence l'implication du calcium dans la voie moléculaire et dans l'activation du gène *klf2a*. En effet, la phosphorylation d'HDAC5 peut être induite par un ionophore du calcium, l'ionomycine, et ceci même en absence de flux (Ginnan et al 2012). Cette expérience permettrait de relier directement la phosphorylation d'HDAC5 par le calcium et permettrait d'impliquer ce dernier dans la valvulogénèse de façon plus précise en comparaison à la supposition que j'ai faite.

Afin de compléter cette voie de signalisation, il serait également intéressant de regarder, dans un premier temps si MEF2 intervient dans l'expression génique de *klf2a*, notamment au niveau de la valvulogénèse. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'inhibition de MEF2 par HDAC5 (Vega, Harrisson et al, 2004), par la voie de signalisation NFκB (Kumar, Lin et al 2005) mais aussi par la calmodulin Kinase II (Sunadome et al 2011). Pour ce faire nous pourrions donc jouer sur MEF2 lui-même (morpholino ou en inhibant ERK5) ou utiliser des composés chimiques activant NFκB et CamKII.

La mise en évidence récente de l'intervention de miRNA dans la formation cardiaque et la réponse au flux ainsi que dans l'initiation de l'EMT (Fish, Wythe et al. 2011; Lagendijk, Goumans et al. 2011; Kolpa, Peal et al. 2013)) permet de suggérer la possibilité d'un rôle des miRNA au niveau de l'initiation de l'expression génique de *klf2a* et du processus de valvulogénèse. Par exemple, il serait intéressant d'étudier la fonction de miR-92a, qui joue un rôle dans la régulation de l'expression de *KLF2* dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale de l'homme par miR-92a (Wu et al 2011 ; Fang et al, 2012) ou de miRNA 21, impliqué dans l'initiation de l'EMT (Kolpa, Peal et al. 2013).

Pour conclure, les études menées au cours de ma thèse permettent de proposer une vision plus large (et théorique) expliquant le contrôle de l'expression génique de *klf2a* lors de la valvulogénèse et dont quelques aspects sont récapitulés dans la figure présentée ci-dessous.

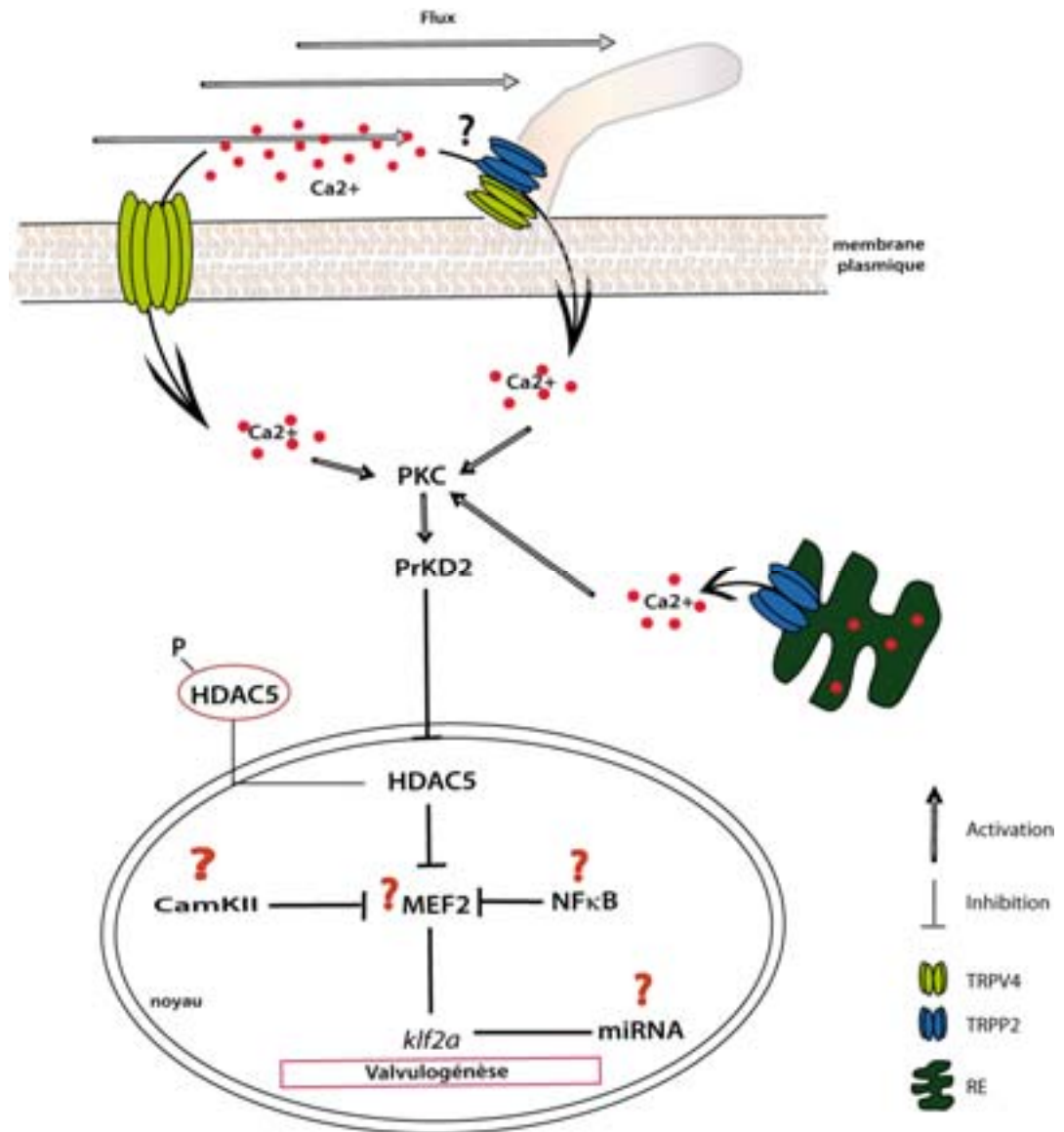


Figure 53 : Intervention de MEF2 et des miRNAs dans l'expression génique de *klf2a*

# REFERENCES



---

# RÉSUMÉ

---

- Beis, D., T. Bartman, et al. (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." Development **132**(18): 4193-4204.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-415.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." Blood **100**(5): 1689-1698.
- Hove, J. R., R. W. Koster, et al. (2003). "Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis." Nature **421**(6919): 172-177.
- Just, S., I. M. Berger, et al. (2011). "Protein kinase D2 controls cardiac valve formation in zebrafish by regulating histone deacetylase 5 activity." Circulation **124**(3): 324-334.
- Koga, A. and H. Hori (1999). "Homogeneity in the structure of the medaka fish transposable element Tol2." Genetical research **73**(1): 7-14.
- Kottgen, M., B. Buchholz, et al. (2008). "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex." The Journal of cell biology **182**(3): 437-447.
- Slough, J., L. Cooney, et al. (2008). "Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis." Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists **237**(9): 2304-2314.
- Van der Heiden, K., B. C. Groenendijk, et al. (2006). "Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas." Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists **235**(1): 19-28.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." PLoS biology **7**(11): e1000246.
- Tian, L., S. A. Hires, et al. (2009). "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators." Nature methods **6**(12): 875-881.
- Warp, E., G. Agarwal, et al. (2012). "Emergence of patterned activity in the developing zebrafish spinal cord." Current biology : CB **22**(2): 93-102.

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

- Karlsson, J., J. von Hofsten, et al. (2001). "Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development." *Marine biotechnology* **3**(6): 522-527.
- Liebling, M., A. S. Forouhar, et al. (2005). "Four-dimensional cardiac imaging in living embryos via postacquisition synchronization of nongated slice sequences." *Journal of biomedical optics* **10**(5): 054001.
- Stellingwerf, R.F. "Period determination using phase dispersion minimization," *Astrophys. J.* **224**\_3\_, 953–960 \_1978\_.
- Warp, E., G. Agarwal, et al. (2012). "Emergence of patterned activity in the developing zebrafish spinal cord." *Current biology : CB* **22**(2): 93-102.

---

# INTRODUCTION

---

- Armstrong, E. J. and J. Bischoff (2004). "Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation." *Circulation research* 95(5): 459-470.
- Baker, K., N. G. Holtzman, et al. (2008). "Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(37): 13924-13929.
- Bakkers, J., C. Kramer, et al. (2004). "Has2 is required upstream of Rac1 to govern dorsal migration of lateral cells during zebrafish gastrulation." *Development* 131(3): 525-537.
- Bakkers, J., M. C. Verhoeven, et al. (2009). "Shaping the zebrafish heart: from left-right axis specification to epithelial tissue morphogenesis." *Developmental biology* 330(2): 213-220.
- Banjo, T., J. Grajcarek, et al. (2013). "Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21." *Nature communications* 4: 1978.
- Bartman, T., E. C. Walsh, et al. (2004). "Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish." *PLoS biology* 2(5): E129.
- Beis, D., T. Bartman, et al. (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* 132(18): 4193-4204.
- Berdougo, E., H. Coleman, et al. (2003). "Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish." *Development* 130(24): 6121-6129.
- Bruneau, B. G., G. Nemer, 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(6): 709-721.
- Bussmann, J., J. Bakkers, et al. (2007). "Early endocardial morphogenesis requires Scl/Tal1." *PLoS genetics* 3(8): e140.

- Camarata, T., J. Krcmery, et al. (2010). "Pdlim7 (LMP4) regulation of Tbx5 specifies zebrafish heart atrio-ventricular boundary and valve formation." *Developmental biology* 337(2): 233-245.
- Chang, C. P., J. R. Neilson, et al. (2004). "A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis." *Cell* 118(5): 649-663.
- Chen, J. N., F. J. van Eeden, et al. (1997). "Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish." *Development* 124(21): 4373-4382.
- Chi, N. C., R. M. Shaw, et al. (2008). "Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation." *Genes & development* 22(6): 734-739.
- Chiplunkar, A. R., T. K. Lung, et al. (2013). "Kruppel-like factor 2 is required for normal mouse cardiac development." *PloS one* 8(2): e54891.
- Christoffels, V. M., J. B. Burch, et al. (2004). "Architectural plan for the heart: early patterning and delineation of the chambers and the nodes." *Trends in cardiovascular medicine* 14(8): 301-307.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." *Nature* 454(7200): 56-61.
- Davis, L. S., A. F. Kavanaugh, et al. (1995). "Induction of persistent T cell hyporesponsiveness in vivo by monoclonal antibody to ICAM-1 in patients with rheumatoid arthritis." *Journal of immunology* 154(7): 3525-3537.
- de Pater, E., L. Clijsters, et al. (2009). "Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart." *Development* 136(10): 1633-1641.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." *Blood* 100(5): 1689-1698.
- Deverse, J. S., A. S. Sandhu, et al. (2013). "Shear stress modulates VCAM-1 expression in response to TNFalpha and dietary lipids via interferon regulatory factor-1 in cultured endothelium." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*.
- Fish, J. E., J. D. Wythe, et al. (2011). "A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish." *Development* 138(7): 1409-1419.
- Forouhar, A. S., M. Liebling, et al. (2006). "The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump." *Science* 312(5774): 751-753.

- Galloway, J. L., R. A. Wingert, et al. (2005). "Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos." *Developmental cell* 8(1): 109-116.
- Garavito-Aguilar, Z. V., H. E. Riley, et al. (2010). "Hand2 ensures an appropriate environment for cardiac fusion by limiting Fibronectin function." *Development* 137(19): 3215-3220.
- Garcia-Cardena, G., J. I. Comander, et al. (2001). "Mechanosensitive endothelial gene expression profiles: scripts for the role of hemodynamics in atherogenesis?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 947: 1-6.
- Garrett-Sinha, L. A., H. Eberspaecher, et al. (1996). "A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells." *The Journal of biological chemistry* 271(49): 31384-31390.
- Garrity, D. M., S. Childs, et al. (2002). "The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome." *Development* 129(19): 4635-4645.
- Harrison, V. J., T. Ziegler, et al. (1998). "Endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 gene regulation by shear stress and flow-induced pressure." *Journal of cardiovascular pharmacology* 31 Suppl 1: S38-41.
- Hoffman, J. I. (1995). "Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence." *Pediatric cardiology* 16(4): 155-165.
- Holtzman, N. G., J. J. Schoenebeck, et al. (2007). "Endocardium is necessary for cardiomyocyte movement during heart tube assembly." *Development* 134(12): 2379-2386.
- Huang, C. J., C. T. Tu, et al. (2003). "Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228(1): 30-40.
- Huang, S., J. Ma, et al. (2011). "Retinoic acid signaling sequentially controls visceral and heart laterality in zebrafish." *The Journal of biological chemistry* 286(32): 28533-28543.
- Icardo, J. M. (1989). "Changes in endocardial cell morphology during development of the endocardial cushions." *Anatomy and embryology* 179(5): 443-448.
- Icardo, J. M. (1989). "Endocardial cell arrangement: role of hemodynamics." *The Anatomical record* 225(2): 150-155.

- Iwamoto, R., S. Yamazaki, et al. (2003). "Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(6): 3221-3226.
- Iwasaki, H., S. Mizuno, et al. (2003). "GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages." *Immunity* 19(3): 451-462.
- Keegan, B. R., J. L. Feldman, et al. (2005). "Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool." *Science* 307(5707): 247-249.
- Kishimoto, Y., K. H. Lee, et al. (1997). "The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning." *Development* 124(22): 4457-4466.
- Kokubo, H., S. Tomita-Miyagawa, et al. (2007). "Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2." *Development* 134(4): 747-755.
- Kolpa, H. J., D. S. Peal, et al. (2013). "miR-21 represses Pcd4 during cardiac valvulogenesis." *Development* 140(10): 2172-2180.
- Legendijk, A. K., M. J. Goumans, et al. (2011). "MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production." *Circulation research* 109(6): 649-657.
- Lenhart, K. F., N. G. Holtzman, et al. (2013). "Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry." *PLoS genetics* 9(1): e1003109.
- Liu, Y., C. Collins, et al. (2013). "A novel pathway spatiotemporally activates Rac1 and redox signaling in response to fluid shear stress." *The Journal of cell biology* 201(6): 863-873.
- Long, S., N. Ahmad, et al. (2003). "The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry." *Development* 130(11): 2303-2316.
- Meilhac, S. M., M. Esner, et al. (2004). "Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis." *The Journal of cell biology* 164(1): 97-109.
- Milan, D. J., A. C. Giokas, et al. (2006). "Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue." *Development* 133(6): 1125-1132.

- Motoike, T., S. Loughna, et al. (2000). "Universal GFP reporter for the study of vascular development." *Genesis* 28(2): 75-81.
- Oates, A. C., S. J. Pratt, et al. (2001). "The zebrafish *klf* gene family." *Blood* 98(6): 1792-1801.
- Ouyang, L., X. Chen, et al. (1998). "Regulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain." *The Journal of biological chemistry* 273(36): 23019-23025.
- Panakova, D., A. A. Werdich, et al. (2010). "Wnt11 patterns a myocardial electrical gradient through regulation of the L-type Ca(2+) channel." *Nature* 466(7308): 874-878.
- Peralta, M., E. Steed, et al. (2013). "Heartbeat-Driven Pericardiac Fluid Forces Contribute to Epicardium Morphogenesis." *Current biology : CB*.
- Peterson, R. T., J. D. Mably, et al. (2001). "Convergence of distinct pathways to heart patterning revealed by the small molecule concentramide and the mutation heart-and-soul." *Current biology : CB* 11(19): 1481-1491.
- Pevny, L., C. S. Lin, et al. (1995). "Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1." *Development* 121(1): 163-172.
- Qian, L., J. Liu, et al. (2005). "Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis." *Current biology : CB* 15(24): 2271-2278.
- Reiter, J. F., J. Alexander, et al. (1999). "Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish." *Genes & development* 13(22): 2983-2995.
- Reiter, J. F., H. Verkade, et al. (2001). "Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of *gata5*." *Developmental biology* 234(2): 330-338.
- Rohr, S., N. Bit-Avragim, et al. (2006). "Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis." *Development* 133(1): 107-115.
- Rohr, S., C. Otten, et al. (2008). "Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish." *Circulation research* 102(2): e12-19.
- Ruppert, J. M., K. W. Kinzler, et al. (1988). "The GLI-Kruppel family of human genes." *Molecular and cellular biology* 8(8): 3104-3113.

- Rutenberg, J. B., A. Fischer, et al. (2006). "Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors." *Development* 133(21): 4381-4390.
- Scherz, P. J., J. Huisken, et al. (2008). "High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function." *Development* 135(6): 1179-1187.
- Scott, I. C., B. Masri, et al. (2007). "The g protein-coupled receptor *agtr1b* regulates early development of myocardial progenitors." *Developmental cell* 12(3): 403-413.
- Sharefkin, J. B., S. L. Diamond, et al. (1991). "Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells." *Journal of vascular surgery* 14(1): 1-9.
- Smith, K. A., S. Chocron, et al. (2008). "Rotation and asymmetric development of the zebrafish heart requires directed migration of cardiac progenitor cells." *Developmental cell* 14(2): 287-297.
- Smith, K. A., A. K. Lagendijk, et al. (2011). "Transmembrane protein 2 (*Tmem2*) is required to regionally restrict atrioventricular canal boundary and endocardial cushion development." *Development* 138(19): 4193-4198.
- Soufan, A. T., G. van den Berg, et al. (2006). "Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation." *Circulation research* 99(5): 545-552.
- Stainier, D. Y. and M. C. Fishman (1992). "Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity." *Developmental biology* 153(1): 91-101.
- Stainier, D. Y., R. K. Lee, et al. (1993). "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." *Development* 119(1): 31-40.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes & development* 18(1): 99-115.
- Topper, J. N. and M. A. Gimbrone, Jr. (1999). "Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype." *Molecular medicine today* 5(1): 40-46.
- Totong, R., T. Schell, et al. (2011). "The novel transmembrane protein *Tmem2* is essential for coordination of myocardial and endocardial morphogenesis." *Development* 138(19): 4199-4205.



- Trinh, L. A. and D. Y. Stainier (2004). "Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish." *Developmental cell* 6(3): 371-382.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." *PLoS biology* 7(11): e1000246.
- Walsh, E. C. and D. Y. Stainier (2001). "UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish." *Science* 293(5535): 1670-1673.
- Warga, R. M. and C. B. Kimmel (1990). "Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish." *Development* 108(4): 569-580.
- Westin, J. and M. Lardelli (1997). "Three novel Notch genes in zebrafish: implications for vertebrate Notch gene evolution and function." *Development genes and evolution* 207(1): 51-63.
- Xavier-Neto, J., C. M. Neville, et al. (1999). "A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart." *Development* 126(12): 2677-2687.
- Xu, R. X., S. J. Horvath, et al. (1991). "ADR1a, a zinc finger peptide, exists in two folded conformations." *Biochemistry* 30(14): 3365-3371.
- Yamada, M., J. P. Revelli, et al. (2000). "Expression of chick *Tbx-2*, *Tbx-3*, and *Tbx-5* genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of *Tbx2*." *Developmental biology* 228(1): 95-105.
- Yan, Y. T., K. Gritsman, et al. (1999). "Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation." *Genes & development* 13(19): 2527-2537.
- Yelon, D. and D. Y. Stainier (1999). "Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation." *Seminars in cell & developmental biology* 10(1): 93-98.
- Yelon, D., B. Ticho, et al. (2000). "The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development." *Development* 127(12): 2573-2582.
- Yet, S. F., M. M. McA'Nulty, et al. (1998). "Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains." *The Journal of biological chemistry* 273(2): 1026-1031.
- Yutzey, K. E., J. T. Rhee, et al. (1994). "Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart." *Development* 120(4): 871-883.
- Zeng, X. X., T. P. Wilm, et al. (2007). "Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation." *Developmental cell* 12(3): 391-402.

Zhang, W. and J. J. Bieker (1998). "Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(17): 9855-9860.

---

# Chapitre 1

---

- Cummins, T. R. (2007). "Setting up for the block: the mechanism underlying lidocaine's use-dependent inhibition of sodium channels." *The Journal of physiology* 582(Pt 1): 11.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." *Blood* 100(5): 1689-1698.
- Kawakami, K., A. Shima, et al. (2000). "Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(21): 11403-11408.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes & development* 18(1): 99-115.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." *PLoS biology* 7(11): e1000246.

---

## Chapitre 2

---

- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." *Blood* **100**(5): 1689-1698.
- Essner, J. J., K. J. Vogan, et al. (2002). "Conserved function for embryonic nodal cilia." *Nature* **418**(6893): 37-38.
- Freund, J. B., J. G. Goetz, et al. (2012). "Fluid flows and forces in development: functions, features and biophysical principles." *Development* **139**(7): 1229-1245.
- Garcia-Cardena, G., J. I. Comander, et al. (2001). "Mechanosensitive endothelial gene expression profiles: scripts for the role of hemodynamics in atherogenesis?" *Annals of the New York Academy of Sciences* **947**: 1-6.
- Hori, Y., T. Kobayashi, et al. (2008). "Domain architecture of the atypical Arf-family GTPase Arl13b involved in cilia formation." *Biochemical and biophysical research communications* **373**(1): 119-124.
- Icardo, J. M. (1989). "Endocardial cell arrangement: role of hemodynamics." *The Anatomical record* **225**(2): 150-155.
- Iomini, C., K. Tejada, et al. (2004). "Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress." *The Journal of cell biology* **164**(6): 811-817.
- Lunt, S. C., T. Haynes, et al. (2009). "Zebrafish *ift57*, *ift88*, and *ift172* intraflagellar transport mutants disrupt cilia but do not affect hedgehog signaling." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**(7): 1744-1759.
- Nonaka, S., H. Shiratori, et al. (2002). "Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow." *Nature* **418**(6893): 96-99.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, et al. (1998). "Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein." *Cell* **95**(6): 829-837.

- Praetorius, H. A. and K. R. Spring (2001). "Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium." *The Journal of membrane biology* **184**(1): 71-79.
- Sharefkin, J. B., S. L. Diamond, et al. (1991). "Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells." *Journal of vascular surgery* **14**(1): 1-9.
- Slough, J., L. Cooney, et al. (2008). "Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**(9): 2304-2314.
- Topper, J. N. and M. A. Gimbrone, Jr. (1999). "Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype." *Molecular medicine today* **5**(1): 40-46.
- Van der Heiden, K., B. C. Groenendijk, et al. (2006). "Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**(1): 19-28.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." *PLoS biology* **7**(11): e1000246.
- Yoshida, S., H. Shiratori, et al. (2012). "Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2." *Science* **338**(6104): 226-231.

---

## Chapitre 3

---

- Amato, V., E. Vina, et al. (2012). "TRPV4 in the sensory organs of adult zebrafish." *Microscopy research and technique* **75**(1): 89-96.
- Barr, M. M., J. DeModena, et al. (2001). "The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway." *Current biology : CB* **11**(17): 1341-1346.
- Barr, M. M. and P. W. Sternberg (1999). "A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*." *Nature* **401**(6751): 386-389.
- Beis, D., T. Bartman, et al. (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* **132**(18): 4193-4204.
- Berrout, J., M. Jin, et al. (2012). "Function of transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) as a mechanical transducer in flow-sensitive segments of renal collecting duct system." *The Journal of biological chemistry* **287**(12): 8782-8791.
- Boulter, C., S. Mulroy, et al. (2001). "Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the *Pkd1* gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(21): 12174-12179.
- Cai, Y., G. Anyatonwu, et al. (2004). "Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812." *The Journal of biological chemistry* **279**(19): 19987-19995.
- Cai, Y., Y. Maeda, et al. (1999). "Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product." *The Journal of biological chemistry* **274**(40): 28557-28565.
- Chang, C. P., J. R. Neilson, et al. (2004). "A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis." *Cell* **118**(5): 649-663.
- Chung, M. K., H. Lee, et al. (2004). "TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes." *The Journal of biological chemistry* **279**(20): 21569-21575.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* **426**(6966): 517-524.

- Colbert, H. A., T. L. Smith, et al. (1997). "OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**(21): 8259-8269.
- Delmas, P. (2004). "Assembly and gating of TRPC channels in signalling microdomains." *Novartis Foundation symposium* **258**: 75-89; discussion 89-102, 263-106.
- Delmas, P. (2005). "Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **451**(1): 264-276.
- Delmas, P., H. Nomura, et al. (2002). "Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2." *The Journal of biological chemistry* **277**(13): 11276-11283.
- Delmas, P., F. Padilla, et al. (2004). "Polycystins, calcium signaling, and human diseases." *Biochemical and biophysical research communications* **322**(4): 1374-1383.
- Denker, S. P. and D. L. Barber (2002). "Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton." *Current opinion in cell biology* **14**(2): 214-220.
- Foggensteiner, L., A. P. Bevan, et al. (2000). "Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **11**(5): 814-827.
- Gabow, P. A. (1993). "Autosomal dominant polycystic kidney disease." *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **22**(4): 511-512.
- Galloway, J. L., R. A. Wingert, et al. (2005). "Loss of *gata1* but not *gata2* converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos." *Developmental cell* **8**(1): 109-116.
- Gao, X., L. Wu, et al. (2003). "Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways." *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 27129-27137.
- Gaudet, R. (2008). "TRP channels entering the structural era." *The Journal of physiology* **586**(Pt 15): 3565-3575.

- Giamarchi, A., S. Feng, et al. (2010). "A polycystin-2 (TRPP2) dimerization domain essential for the function of heteromeric polycystin complexes." *The EMBO journal* **29**(7): 1176-1191.
- Gradilone, S. A., A. I. Masyuk, et al. (2007). "Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(48): 19138-19143.
- Grantham, J. J. (1993). "Polycystic kidney disease: hereditary and acquired." *Advances in internal medicine* **38**: 409-420.
- Griffin, M. D., V. E. Torres, et al. (1997). "Vascular expression of polycystin." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **8**(4): 616-626.
- Hanaoka, K., F. Qian, et al. (2000). "Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents." *Nature* **408**(6815): 990-994.
- Hartmannsgruber, V., W. T. Heyken, et al. (2007). "Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression." *PloS one* **2**(9): e827.
- Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(11): 7461-7466.
- Karcher, C., A. Fischer, et al. (2005). "Lack of a laterality phenotype in Pkd1 knock-out embryos correlates with absence of polycystin-1 in nodal cilia." *Differentiation; research in biological diversity* **73**(8): 425-432.
- Kohler, R., W. T. Heyken, et al. (2006). "Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(7): 1495-1502.
- Kottgen, M., T. Benzing, et al. (2005). "Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation." *The EMBO journal* **24**(4): 705-716.
- Kottgen, M., B. Buchholz, et al. (2008). "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex." *The Journal of cell biology* **182**(3): 437-447.
- Koulen, P., Y. Cai, et al. (2002). "Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel." *Nature cell biology* **4**(3): 191-197.
- Liedtke, W., D. M. Tobin, et al. (2003). "Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*." *Proceedings*



- of the National Academy of Sciences of the United States of America **100 Suppl 2**: 14531-14536.
- Mangos, S., P. Y. Lam, et al. (2010). "The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation." *Disease models & mechanisms* **3**(5-6): 354-365.
- Mangos, S., Y. Liu, et al. (2007). "Dynamic expression of the osmosensory channel *trpv4* in multiple developing organs in zebrafish." *Gene expression patterns : GEP* **7**(4): 480-484.
- McGrath, J., S. Somlo, et al. (2003). "Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse." *Cell* **114**(1): 61-73.
- Mendoza, S. A., J. Fang, et al. (2010). "TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**(2): H466-476.
- Mizuno, A., N. Matsumoto, et al. (2003). "Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4." *American journal of physiology. Cell physiology* **285**(1): C96-101.
- Mochizuki, T., G. Wu, et al. (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein." *Science* **272**(5266): 1339-1342.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**(272): re3.
- Nauli, S. M., F. J. Alenghat, et al. (2003). "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells." *Nature genetics* **33**(2): 129-137.
- Nilius, B., J. Prenen, et al. (2001). "Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **443**(2): 227-233.
- Nilius, B. and T. Voets (2004). "Diversity of TRP channel activation." *Novartis Foundation symposium* **258**: 140-149; discussion 149-159, 263-146.
- Nilius, B. and T. Voets (2005). "TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **451**(1): 1-10.
- Nilius, B., J. Vriens, et al. (2004). "TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity." *American journal of physiology. Cell physiology* **286**(2): C195-205.
- Nilius, B., H. Watanabe, et al. (2003). "The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **446**(3): 298-303.

- Obara, T., S. Mangos, et al. (2006). "Polycystin-2 immunolocalization and function in zebrafish." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**(10): 2706-2718.
- Ong, A. C. (2000). "Polycystin expression in the kidney and other tissues: complexity, consensus and controversy." *Experimental nephrology* **8**(4-5): 208-214.
- Paavola, J., S. Schliffke, et al. (2013). "Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy." *Journal of molecular and cellular cardiology* **58**: 199-208.
- Pennekamp, P., C. Karcher, et al. (2002). "The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice." *Current biology : CB* **12**(11): 938-943.
- Plant, T. D. and R. Strotmann (2007). *TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* W. B. Liedtke and S. Heller. Boca Raton (FL).
- Praetorius, H. A. and K. R. Spring (2001). "Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium." *The Journal of membrane biology* **184**(1): 71-79.
- Qian, F., F. J. Germino, et al. (1997). "PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain." *Nature genetics* **16**(2): 179-183.
- Rossetti, S. and P. C. Harris (2007). "Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**(5): 1374-1380.
- Rundle, D. R., G. Gorbsky, et al. (2004). "PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles." *The Journal of biological chemistry* **279**(28): 29728-29739.
- Strotmann, R., C. Harteneck, et al. (2000). "OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity." *Nature cell biology* **2**(10): 695-702.
- Teilmann, S. C., A. G. Byskov, et al. (2005). "Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs." *Molecular reproduction and development* **71**(4): 444-452.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes & development* **18**(1): 99-115.

- Tsiokas, L., E. Kim, et al. (1997). "Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(13): 6965-6970.
- Vennekens, R., G. Owsianik, et al. (2008). "Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview." *Current pharmaceutical design* **14**(1): 18-31.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." *PLoS biology* **7**(11): e1000246.
- Voets, T., K. Talavera, et al. (2005). "Sensing with TRP channels." *Nature chemical biology* **1**(2): 85-92.
- Volk, T., A. P. Schworer, et al. (2003). "A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes." *Cardiovascular research* **58**(1): 76-88.
- Vriens, J., G. Owsianik, et al. (2007). "Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4." *The Journal of biological chemistry* **282**(17): 12796-12803.
- Watanabe, H., J. B. Davis, et al. (2002). "Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives." *The Journal of biological chemistry* **277**(16): 13569-13577.
- Watanabe, H., J. Vriens, et al. (2003). "Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca<sup>2+</sup>." *Cell calcium* **33**(5-6): 489-495.
- Wegierski, T., D. Steffl, et al. (2009). "TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum." *The EMBO journal* **28**(5): 490-499.
- Wilson, P. D. (2004). "Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis." *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**(10): 1868-1873.
- Wissenbach, U., M. Bodding, et al. (2000). "Trp12, a novel Trp related protein from kidney." *FEBS letters* **485**(2-3): 127-134.
- Wu, G., T. Hayashi, et al. (1998). "Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25." *Genomics* **54**(3): 564-568.
- Wu, L., X. Gao, et al. (2007). "Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells." *American journal of physiology. Renal physiology* **293**(5): F1699-1713.
- Xavier-Neto, J., C. M. Neville, et al. (1999). "A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart." *Development* **126**(12): 2677-2687.

Yoder, B. K., X. Hou, et al. (2002). "The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**(10): 2508-2516.

---

## Chapitre 4

---

- Anyatonwu, G. I. and B. E. Ehrlich (2004). "Calcium signaling and polycystin-2." *Biochemical and biophysical research communications* **322**(4): 1364-1373.
- Berridge, M. J. (1998). "Neuronal calcium signaling." *Neuron* **21**(1): 13-26.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**(1): 11-21.
- Bialecki, R. A., T. J. Kulik, et al. (1992). "Stretching increases calcium influx and efflux in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells." *The American journal of physiology* **263**(5 Pt 1): L602-606.
- Cai, Y., G. Anyatonwu, et al. (2004). "Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812." *The Journal of biological chemistry* **279**(19): 19987-19995.
- Clapham, D. E. (1995). "Intracellular calcium. Replenishing the stores." *Nature* **375**(6533): 634-635.
- Ehrlich, B. E. (1995). "Functional properties of intracellular calcium-release channels." *Current opinion in neurobiology* **5**(3): 304-309.
- Gao, X., L. Wu, et al. (2003). "Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways." *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 27129-27137.
- Hanaoka, K., F. Qian, et al. (2000). "Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents." *Nature* **408**(6815): 990-994.
- Helmlinger, G., B. C. Berk, et al. (1996). "Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells." *Journal of vascular research* **33**(5): 360-369.
- Kasri, N. N., A. M. Holmes, et al. (2004). "Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding proteins." *The EMBO journal* **23**(2): 312-321.
- Kottgen, M., B. Buchholz, et al. (2008). "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex." *The Journal of cell biology* **182**(3): 437-447.

- Koulen, P., Y. Cai, et al. (2002). "Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel." *Nature cell biology* **4**(3): 191-197.
- Moller, J. V., J. P. Andersen, et al. (1982). "The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase." *Molecular and cellular biochemistry* **42**(2): 83-107.
- Nauli, S. M., F. J. Alenghat, et al. (2003). "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells." *Nature genetics* **33**(2): 129-137.
- Praetorius, H. A., J. Frokiaer, et al. (2003). "Bending the primary cilium opens Ca<sup>2+</sup>-sensitive intermediate-conductance K<sup>+</sup> channels in MDCK cells." *The Journal of membrane biology* **191**(3): 193-200.
- Praetorius, H. A. and K. R. Spring (2001). "Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium." *The Journal of membrane biology* **184**(1): 71-79.
- Strotmann, R., G. Schultz, et al. (2003). "Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site." *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 26541-26549.
- Vriens, J., H. Watanabe, et al. (2004). "Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(1): 396-401.
- Watanabe, H., J. B. Davis, et al. (2002). "Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives." *The Journal of biological chemistry* **277**(16): 13569-13577.
- Watanabe, H., J. Vriens, et al. (2003). "Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels." *Nature* **424**(6947): 434-438.
- Yoshida, S., H. Shiratori, et al. (2012). "Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2." *Science* **338**(6104): 226-231.

---

## Chapitre 5

---

- Anyatonwu, G. I. and B. E. Ehrlich (2004). "Calcium signaling and polycystin-2." *Biochemical and biophysical research communications* **322**(4): 1364-1373.
- Armstrong, E. J. and J. Bischoff (2004). "Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation." *Circulation research* **95**(5): 459-470.
- Banjo, T., J. Grajcarek, et al. (2013). "Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21." *Nature communications* **4**: 1978.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.
- Castagna, M., Y. Takai, et al. (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." *The Journal of biological chemistry* **257**(13): 7847-7851.
- Chen, J. N., F. J. van Eeden, et al. (1997). "Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish." *Development* **124**(21): 4373-4382.
- Denker, S. P. and D. L. Barber (2002). "Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton." *Current opinion in cell biology* **14**(2): 214-220.
- Deverse, J. S., A. S. Sandhu, et al. (2013). "Shear stress modulates VCAM-1 expression in response to TNFalpha and dietary lipids via interferon regulatory factor-1 in cultured endothelium." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*.
- Ehrlich, B. E. (1995). "Functional properties of intracellular calcium-release channels." *Current opinion in neurobiology* **5**(3): 304-309.
- Forouhar, A. S., M. Liebling, et al. (2006). "The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump." *Science* **312**(5774): 751-753.
- Garrity, D. M., S. Childs, et al. (2002). "The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome." *Development* **129**(19): 4635-4645.
- Gaudet, R. (2008). "TRP channels entering the structural era." *The Journal of physiology* **586**(Pt 15): 3565-3575.

- Helmlinger, G., B. C. Berk, et al. (1996). "Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells." *Journal of vascular research* **33**(5): 360-369.
- Hoffman, J. I. (1995). "Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence." *Pediatric cardiology* **16**(4): 155-165.
- McKinsey, T. A. and E. N. Olson (2004). "Dual roles of histone deacetylases in the control of cardiac growth." *Novartis Foundation symposium* **259**: 132-141; discussion 141-135, 163-139.
- Nilius, B. and T. Voets (2005). "TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **451**(1): 1-10.
- Ong, A. C. (2000). "Polycystin expression in the kidney and other tissues: complexity, consensus and controversy." *Experimental nephrology* **8**(4-5): 208-214.
- Paavola, J., S. Schliffke, et al. (2013). "Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy." *Journal of molecular and cellular cardiology* **58**: 199-208.
- Pennekamp, P., C. Karcher, et al. (2002). "The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice." *Current biology : CB* **12**(11): 938-943.
- Plant, T. D. and R. Strotmann (2007). *TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* W. B. Liedtke and S. Heller. Boca Raton (FL).
- Qian, L., J. Liu, et al. (2005). "Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis." *Current biology : CB* **15**(24): 2271-2278.
- Rohr, S., C. Otten, et al. (2008). "Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish." *Circulation research* **102**(2): e12-19.
- Sehnert, A. J., A. Huq, et al. (2002). "Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility." *Nature genetics* **31**(1): 106-110.
- Stainier, D. Y. and M. C. Fishman (1992). "Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity." *Developmental biology* **153**(1): 91-101.
- Stainier, D. Y., R. K. Lee, et al. (1993). "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." *Development* **119**(1): 31-40.
- Tian, L., S. A. Hires, et al. (2009). "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators." *Nature methods* **6**(12): 875-881.



- Topper, J. N. and M. A. Gimbrone, Jr. (1999). "Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype." *Molecular medicine today* **5**(1): 40-46.
- Voets, T., K. Talavera, et al. (2005). "Sensing with TRP channels." *Nature chemical biology* **1**(2): 85-92.
- Warga, R. M. and C. B. Kimmel (1990). "Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish." *Development* **108**(4): 569-580.

---

# Discussion

---

- Ando, J., A. Ohtsuka, et al. (1994). "Intracellular calcium response to directly applied mechanical shearing force in cultured vascular endothelial cells." *Biorheology* **31**(1): 57-68.
- Chiu, J. J., D. L. Wang, et al. (1998). "Effects of disturbed flow on endothelial cells." *Journal of biomechanical engineering* **120**(1): 2-8.
- Davies, P. F., A. Remuzzi, et al. (1986). "Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(7): 2114-2117.
- Fang, Y. and P. F. Davies (2012). "Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(4): 979-987.
- Fish, J. E., J. D. Wythe, et al. (2011). "A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish." *Development* **138**(7): 1409-1419.
- Ginnan, R., L. Y. Sun, et al. (2012). "MEF2 is regulated by CaMKIIdelta2 and a HDAC4-HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells." *The Biochemical journal* **444**(1): 105-114.
- Huang, L., P. S. Mathieu, et al. (2010). "A stretching device for high-resolution live-cell imaging." *Annals of biomedical engineering* **38**(5): 1728-1740.
- Just, S., I. M. Berger, et al. (2011). "Protein kinase D2 controls cardiac valve formation in zebrafish by regulating histone deacetylase 5 activity." *Circulation* **124**(3): 324-334.
- Kolpa, H. J., D. S. Peal, et al. (2013). "miR-21 represses Pcd4 during cardiac valvulogenesis." *Development* **140**(10): 2172-2180.
- Kolpa, H. J., D. S. Peal, et al. (2013). "miR-21 represses Pcd4 during cardiac valvulogenesis." *Development* **140**(10): 2172-2180.
- Kottgen, M., B. Buchholz, et al. (2008). "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex." *The Journal of cell biology* **182**(3): 437-447.

- Kumar, A., Z. Lin, et al. (2005). "Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases." *Molecular and cellular biology* **25**(14): 5893-5903.
- Legendijk, A. K., M. J. Goumans, et al. (2011). "MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production." *Circulation research* **109**(6): 649-657.
- Lee, D. Y., C. I. Lee, et al. (2012). "Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(6): 1967-1972.
- Levesque, M. J., R. M. Nerem, et al. (1990). "Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow." *Biomaterials* **11**(9): 702-707.
- Mangos, S., Y. Liu, et al. (2007). "Dynamic expression of the osmosensory channel trpv4 in multiple developing organs in zebrafish." *Gene expression patterns : GEP* **7**(4): 480-484.
- McKinsey, T. A. and E. N. Olson (2004). "Dual roles of histone deacetylases in the control of cardiac growth." *Novartis Foundation symposium* **259**: 132-141; discussion 141-135, 163-139.
- Nicoli, S., C. Standley, et al. (2010). "MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis." *Nature* **464**(7292): 1196-1200.
- Pitaval, A., Q. Tseng, et al. (2010). "Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells." *The Journal of cell biology* **191**(2): 303-312.
- Praetorius, H. A. and K. R. Spring (2001). "Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium." *The Journal of membrane biology* **184**(1): 71-79.
- Rana, O. R., C. Zobel, et al. (2008). "A simple device to apply equibiaxial strain to cells cultured on flexible membranes." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**(1): H532-540.
- Rey, O., S. H. Young, et al. (2001). "Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C." *The Journal of biological chemistry* **276**(35): 32616-32626.

- Slough, J., L. Cooney, et al. (2008). "Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**(9): 2304-2314.
- Sunadome, K., T. Yamamoto, et al. (2011). "ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors." *Developmental cell* **20**(2): 192-205.
- Tsuchida, A., S. Ohno, et al. (2011). "miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer." *Cancer science* **102**(12): 2264-2271.
- Van der Heiden, K., B. C. Groenendijk, et al. (2006). "Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**(1): 19-28.
- Vega, R. B., B. C. Harrison, et al. (2004). "Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5." *Molecular and cellular biology* **24**(19): 8374-8385.
- Vermot, J., A. S. Forouhar, et al. (2009). "Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart." *PLoS biology* **7**(11): e1000246.
- Wu, W., H. Xiao, et al. (2011). "Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a." *Circulation* **124**(5): 633-641.
- Xia, S., X. Li, et al. (2010). "Polycystin-dependent fluid flow sensing targets histone deacetylase 5 to prevent the development of renal cysts." *Development* **137**(7): 1075-1084.

# **ANNEXES**

---

# ANNEXE 1

---

**Vidéo n° 1** : Présence de flux reversant dans des cœurs de poissons à 48hpf.

**Vidéo n° 2** : Efficacité de contraction des poissons contrôles à 48hpf. Les poissons présentent une contraction normale de l'atrium et du ventricule. Le cœur est correctement retourné et la circulation sanguine bien présente, à 48hpf.

**Vidéo n° 3** : Efficacité de contraction des poissons traités en lidocaïne, à 48hpf. Le cœur est bien retourné mais présente une contraction réduite de l'atrium et du ventricule ainsi que du nombre de battements par minute qui diminue de moitié par rapport aux poissons contrôles, à 48hpf. Le flux sanguin et le flux reversant sont également réduit dans ces poissons en comparaison à la circulation sanguine des poissons *WT*.

**Vidéo n° 4** : Efficacité de contraction des morphants *amhc*. Les cœurs des morphants n'est pas correctement retourné et présente une baisse de la contraction de l'atrium par rapport aux poissons contrôles à 48hpf. La circulation sanguine est très réduite ainsi que le flux reversant.

**Vidéo n° 5** : Efficacité de contraction des morphants *vmhc*. . Les cœurs des morphants est bien correctement retourné et présente une baisse de la contraction du ventricule par rapport aux poissons contrôles à 48hpf. La circulation sanguine est similaire à celle des poissons contrôles.

**Vidéo n° 6** : Efficacité de contraction des morphants *cmlc1*. Les morphants présentent un cœur non retourné ainsi qu'une absence quasi-totale de la circulation sanguine et un flux reversant réduit à 48hpf. La contraction de l'atrium et du ventricule est fortement diminuée par rapport aux poissons contrôles à 48hpf.

**Vidéo n° 7** : Efficacité de contraction des morphants *cmlc2*. Les morphants possèdent un cœur mal retourné ainsi qu'une faible circulation sanguine et un flux reversant réduit par rapport aux poissons *WT* à 48hpf. La contraction cardiaque est réduite dans le ventricule uniquement, en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 8** : Efficacité de contraction des morphants *gata1*. Les poissons injectés avec *gata1Mo* présentent un cœur bien retourné ainsi qu'une contraction cardiaque similaire à celle des poissons contrôles, à 48hpf. Le nombre de cellules sanguines est fortement réduit mais le flux reversant est augmenté dans le cœur des poissons, en comparaison aux poissons contrôles à 48hpf.

**Vidéo n° 9** : Efficacité de contraction des morphants *gata2*. Les poissons injectés avec *gata2Mo* présentent un cœur bien retourné ainsi qu'une contraction cardiaque similaire à celle des poissons contrôles, à 48hpf. Le nombre de cellules sanguines est fortement réduit et le flux reversant diminué dans le cœur des poissons, en comparaison aux poissons contrôles à 48hpf.

**Vidéo n° 10** : Présence de cils dans les vaisseaux sanguins à 30hpf. Présence de cils bien visibles (rouge) dans les vaisseaux sanguins des lignées *Tg(UAS\_arl13b-RFP :cmlc2-eGFP) \* Tg(flk1 :Gal4- UAS :eGFP)*, à 30hpf.

**Vidéo n° 11** : L'endocarde du poisson zèbre est cilié à 30hpf. De nombreuses cellules endocardiques sont ciliées (cils en rouge) à 30hpf.

**Vidéo n° 12** : L'endocarde du poisson zèbre est cilié à 48hpf

**Vidéo n° 13** : Zoom sur une zone ciliée de l'atrium à 48hpf

**Vidéo n° 14** : Efficacité de contraction des morphants *TRPV4*. Les morphants possèdent un cœur incorrectement retourné mais une circulation sanguine similaire aux poissons *WT* à 48hpf. La contraction cardiaque est réduite dans l'atrium uniquement, en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 15** : Efficacité de contraction des morphants *trpp2*. Les morphants possèdent un retournement cardiaque incomplet mais une circulation sanguine similaire aux poissons *WT* à 48hpf. La contraction cardiaque est légèrement augmentée dans l'atrium, en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 16** : Efficacité de contraction des doubles morphants *TRPP2-TRPV4*. Les doubles morphants présentent un cœur mal retourné ainsi qu'un petit œdème péricardique. La circulation sanguine est normale et l'efficacité de contraction mesurée pour l'atrium et le ventricule est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf.

**Vidéo n° 17** : Efficacité de contraction des doubles morphants *gata1-TRPP2*. Les doubles morphants présentent un cœur mal retourné ainsi qu'un œdème péricardique. L'efficacité de contraction mesurée pour l'atrium et le ventricule est similaire à celle des poissons contrôles à 48hpf.



**Vidéo n° 18** : Visualisation du calcium intracellulaire à la caméra rapide. Présence d'un signal calcique dans l'endocarde. Deux pics calciques sont visibles lors de diastole ventriculaire et en toute fin de cette dernière, à 48hpf.

**Vidéo n° 19** : Description du signal calcique intracellulaire chez un poisson *WT* à 48hpf. Un signal calcique est visible dans l'endocarde. Deux pics calciques sont visibles lors de diastole ventriculaire et en toute fin de cette dernière.

**Vidéo n° 20** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *tnnt2*, à 48hpf. Baisse du signal calcique dans l'AVC des morphants en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 21** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *cmhc1*, à 48hpf. Le calcium diminue dans l'AVC des poissons injectés en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 22** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *vmhc*, à 48hpf. Baisse du signal calcique dans l'AVC des morphants en comparaison aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 23** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *cmhc2*, à 48hpf. Les morphants présentent une hausse importante du signal calcique dans l'atrium, l'AVC et le ventricule par rapport aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 24** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *gata1*, à 48hpf. Les morphants présentent une petite hausse du signal calcique dans l'AVC en comparaison aux poissons non injectés.

**Vidéo n° 25** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *gata2*, à 48hpf. Les morphants présentent une petite baisse du signal calcique dans l'AVC par rapport aux poissons contrôles.

**Vidéo n° 26** : Visualisation du calcium intracellulaire chez les morphants *TRPP2*, à 48hpf. Les morphants présentent une baisse du signal calcique dans l'AVC par rapport aux poissons contrôles.

## ANNEXE 2

---

Lors de ma thèse, j'ai été amenée à collaborer avec le laboratoire de Jocelin Laporte (IGBMC). Bien que mon implication dans le papier soit minime, le travail fourni a entraîné la publication d'un article scientifique.

Intéressés par la physiopathologie des maladies neuromusculaires rares et sévère, cette équipe est axée sur l'étude de trois familles de protéines ; les myotubularines, les amphiphysines et les dynamines. C'est sur l'étude d'une mutation concernant cette dernière que mon aide a été sollicitée.

En effet, ayant mis à jour la première mutation homozygote de Dynamine 2, entraînant des symptômes neurologiques proche de ceux retrouvés dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth, les études menées chez la souris et chez le poisson zèbre ont permis de mettre à jour le rôle de cette protéine dans le développement fœtal et l'angiogenèse embryonnaire.

Dans ce papier, j'ai contribué, avec la participation d'Halina Mojziso, ancienne post-doctorante au laboratoire, à l'élaboration et l'injection des morpholinos ciblant la Dynamine2 chez le poisson zèbre.

## **Dynamin 2 homozygous mutation in human**

### **Authors**

Olga S. Koutsopoulos<sup>1,3,4,5</sup>, Christine Kretz<sup>1,3,4,5</sup>, Claudia M. Weller<sup>6</sup>, Halina Mojziso<sup>2,3,4,5</sup>, Johann Böhm<sup>1,3,4,5</sup>, Catherine Koch<sup>1,3,4,5</sup>, Anne Toussaint<sup>1,3,4,5</sup>, Emilie Heckel<sup>2,3,4,5</sup>, Daphne Stemkens<sup>6</sup>, Frédéric Plewniak<sup>3,4,5</sup>, Christelle Thibault<sup>3,4,5</sup>, Muriel Koch<sup>3,4,5</sup>, Syed Qasim Mehdi<sup>7</sup>, Emilia K. Bijlsma<sup>6</sup>, Jean-Louis Mandel<sup>1,3,4,5,8,9</sup>, Julien Vermot<sup>2,3,4,5</sup>, Jocelyn Laporte<sup>1,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, France

<sup>2</sup>Department of Development and Stem Cells, IGBMC, Illkirch, France

<sup>3</sup>Inserm, U964, Illkirch, France

<sup>4</sup>CNRS, UMR7104, Illkirch, France

<sup>5</sup>Université de Strasbourg, Illkirch, France

<sup>6</sup>Department of Clinical Genetics, Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden, The Netherlands

<sup>7</sup>Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (KIBGE), University of Karachi, Karachi, Pakistan

<sup>8</sup>Collège de France, chaire de Génétique Humaine, Illkirch, France

<sup>9</sup>Laboratoire Diagnostic Génétique, Faculté de Médecine, CHRU, Strasbourg, France

correspondence should be addressed to J.L. ([jocelyn@igbmc.fr](mailto:jocelyn@igbmc.fr))

**Dynamins are large GTPases initially identified as microtubule binding proteins<sup>1</sup>, and implicated in endocytosis and cytoskeletal dynamics. Heterozygous mutations in dynamin 2 have been linked to autosomal dominant Charcot-Marie Tooth (CMT) peripheral neuropathy and centronuclear myopathy (CNM), two discrete progressive neuromuscular disorders, highlighting the importance of dynamin 2 for**

**normal neuronal and muscle maintenance<sup>2,3</sup>. We report the characterization of three consanguineous patients suffering from a severe perinatal syndrome associating decreased fetal movements, joint contractures and hypotonia at birth with skeletal abnormalities including thin bones, retinal hemorrhages, brain hematomas and respiratory insufficiency. Genetic analysis identified a non-conservative point mutation in the middle domain of dynamin 2 (F379V). This is the first case of a homozygous mutation in dynamin leading to a human disease. Patient fibroblasts displayed reduced transferrin uptake suggesting that the F379V mutation impacts on dynamin's role in endocytosis. Expression analysis during mouse embryogenesis and use of morpholino against dynamin 2 in zebrafish support a general role for dynamin 2 during fetal development and in angiogenesis.**

We report the characterization of a consanguineous Pakistani family (second cousins) with three affected children (Fig. 1a). The three patients suffered from severe hypotonia and respiratory insufficiency from birth and exhibited contractures of several joints (Table 1 and Fig. 2). No reflexes were observed upon neurological examination. Fetal movements were decreased, and their birth weight was lower than normal. In addition, they all showed retinal hemorrhages, while MRI analysis revealed symmetric subdural hematomas for AFB3 and blood in the subarachnoid cavity for AFB4. Two of the patients had pulmonary hypertension and a patent ductus arteriosus; whether these features are primary or secondary to respiratory insufficiency could not be determined. They all displayed skeletal abnormalities with thin ribs and bones (Fig. 2). Death occurred at 5 or 19 days of age for AFB3 and AFB4 respectively, due to progressive deterioration while AFB2 died at 4 months of age due to an upper respiratory tract infection that triggered rapid deterioration. The AFB2 muscle biopsy showed small rounded fibers with central nuclei, suggestive of a centronuclear myopathy component while the AFB4 biopsy showed atrophic fibers without obvious centralization of nuclei (Fig. 2). AFB4 showed slow conductance at EMG (Table 1) although it was not suggestive of a demyelinating peripheral neuropathy<sup>4</sup>. All affected children had a normal karyotype. Positional cloning by homozygosity mapping employing a 250K Affymetrix array revealed a 4Mb region of homozygosity common for the three affected children on

chromosome band 19p13 (Fig. 1b and Supplementary Table 1). In this region, the *DNM2* gene, encoding dynamin 2, was selected as a candidate due to the CNM-like component found in patient AFB2. Direct sequencing revealed the presence of a single point mutation (c.1135T>G) in exon 9 at the homozygous state in all the affected children (Fig. 1c). The parents and the unaffected children were all heterozygous for the mutation. High resolution melting curve analysis or direct sequencing of 300 DNA samples, including 100 Pakistani controls, did not show this variation (data not shown). This mutation substitutes a conserved phenylalanine residue with valine at position 379 (F379V), within the middle domain of dynamin 2 (Fig. 1d,e). Distinct *DNM2* heterozygous mutations were previously linked to autosomal dominant Charcot-Marie Tooth peripheral neuropathy and autosomal dominant centronuclear myopathy<sup>2,3</sup>. CMT neuropathies are clinically and genetically heterogeneous disorders of the peripheral nervous system, characterized by progressive weakness and atrophy with age of onset varying from childhood to adulthood<sup>4,5</sup>. Centronuclear myopathies caused by *DNM2* mutations are rare myopathies characterized by muscle hypotrophy and the abnormal centralization of nuclei in muscle fibers; adult onset is typical, although a few patients linked to specific mutations in the PH domain have been reported with neonatal involvement and progressive improvement<sup>2,6</sup>. These diseases have not been previously associated with prenatal involvement, nor with skeletal abnormalities, brain hematomas or retinal hemorrhages. We thus investigated if the heterozygous carriers showed signs of CNM or CMT. Unaffected heterozygous siblings had normal motor development and muscle strength and no contractures (Supplementary Table 2). However, heterozygous parents had impaired reflexes and the mother's muscle biopsy displayed fiber size variation and centralized nuclei (Supplementary Fig. 1a). Altogether, this suggests that the presence of the F379V mutation in the heterozygous state leads to mild, adult onset autosomal dominant CNM as seen in the mother. Immunostaining of the mother's muscle biopsy with dynamin 2-specific antibodies revealed a striated pattern comparable to an age-matched control (Supplementary Figure 1b), suggesting that the F379V mutation does not affect dynamin 2 localization in muscle, at least in the heterozygous state. To address whether the F379V mutation impacts on protein stability at the homozygous state, dynamin 2 protein level from AFB2 (F379V) fibroblasts was compared to control fibroblasts and was found similar (Supplementary Fig. 2a).

Dynamin 2 is a mechanoenzyme that can tubulate and sever membranes<sup>7,8</sup>. Dynamin's function has been linked to endocytosis<sup>9,10</sup>, Golgi maintenance<sup>11</sup>, centrosome positioning<sup>12</sup> and cytoskeletal dynamics<sup>1,13-15</sup>. The F379V mutation is located within dynamin's middle domain, which is thought to be involved in dynamin oligomerization and centrosome cohesion<sup>12,16</sup>. Recently, a *de novo* lethal mutation was identified within the middle domain of the dynamin-related protein 1 (DLP1), stressing the importance of this domain for dynamin-like proteins<sup>17,18</sup>.

There was no difference in centrosome cohesion between control and F379V patient fibroblasts as revealed by  $\gamma$  tubulin staining (Supplementary Fig. 2b and Supplementary Table 3), in contrast to the centrosome cohesion defects previously reported in autosomal dominant CNM patient fibroblasts<sup>2</sup>. Golgi morphology was also comparable between F379V and control fibroblasts, as monitored with golgin 97 and GM130 staining (Supplementary Fig. 2c). Addition of nocodazole fragmented the Golgi network of both control and patient fibroblasts in a similar fashion (Supplementary Fig 2c, right panel). As anticipated, overexpression of WT or the F379V dynamin 2 constructs did not impact on Golgi or centrosome morphology (Supplementary Figure 3).

The ascribed role of dynamin 2 in cytoskeletal dynamics was tested in cultured cells. Exogenous dynamin 2 co-localized with microtubules (MTs) following detergent pre-solubilization that preserves the MT cytoskeleton (Fig. 3a;<sup>15</sup>). Interestingly, F379V dynamin 2 failed to localize to MTs (Fig. 3a). As dynamin 2 mutations leading to autosomal dominant CMT have been proposed to increase this interaction and to promote MTs acetylation and stabilization<sup>15</sup> we addressed a potential effect of the F379V mutation on MT dynamics. MT labeling appeared normal in both F379V patient and control fibroblasts and addition of 5  $\mu$ M nocodazole resulted in MT depolymerization, with MT nucleation and elongation occurring similarly following the removal of the drug (Fig. 3b). There was no significant difference in the levels of acetylated tubulin, a sub-population of stable MTs, between control and F379V patient fibroblasts (Fig. 3c). While dynamin 2 has been reported to impact on actin dynamics<sup>13</sup>, no effect was evident on actin stress fiber formation after phalloidin

staining of patient and control fibroblasts (data not shown). Our findings indicate that the F379V mutation weakens dynamin's association with interphase MTs but does not readily affect MT dynamics.

Dynamin 2 is a major player in clathrin-mediated endocytosis<sup>8-10</sup>. To assess a potential impact on endocytosis, control and patient fibroblasts pre-incubated with fluorescent transferrin were compared by FACS analysis. Transferrin uptake was significantly reduced by 20% in the F379V cells in comparison to control cells (Fig. 4a). Simultaneous fixation and permeabilization to remove cytosolic components<sup>19</sup> revealed partial co-localisation between dynamin 2 and clathrin light chain in both control and F379V patient fibroblasts (Fig. 4b). In addition, the staining profiles of dynamin 2, EEA1 and clathrin light chain between control and patient fibroblasts were similar. Taken together with the decreased amount of transferrin internalization, these findings suggest that the F379V mutation maintains its normal localization to clathrin-coated pits but impacts on dynamin's role in endocytosis.

Patients with the homozygous *DNM2* F379V mutation displayed severe defects affecting different tissues, starting before birth, and leading to early postnatal death. Moreover, dynamin 2 was reported to be ubiquitously expressed in contrast to dynamins 1 and 3<sup>20</sup>, and disruption of the *DNM2* gene in mice is embryonic lethal<sup>21</sup>. To gain more insight into the potential role of dynamin 2 during embryonic development, we first performed *in situ* hybridization in mouse embryos. Dynamin 2 was expressed in most tissues including the peripheral nervous system at embryonic days 14.5 and 16.5, although no expression was evident in skeletal muscle (Fig. 5a; for tissue profiles see Supplementary Table 4). In addition, injection of zebrafish one cell stage embryos with morpholino (MO) targeting dynamin 2 resulted in lethality in 10% and bent-tail in 20% (Supplementary Fig. 4). Analysis of morphants with a normal general morphology revealed several defects affecting different tissues. Second Harmonic signal generated by the periodic organization of myosin in sarcomeric thick filaments revealed disruption of sarcomere orientation and misalignment of muscle fibers in the MO-injected embryos compared to controls (Fig. 5b, top panels). *Dnm2* MO injection in transgenic Tg(Flik1:eGFP)y1 zebrafish expressing the GFP specifically in the endothelium highlighted defects in the vascular system of embryos: the inter-segmental vessels displayed aberrant sprouting and excess of branching



not seen in control embryos (Fig. 5b, middle panels). Taken together, these observations are consistent with a pleiotropic role for dynamin 2 during fetal development. The angiogenesis defects seen in zebrafish morphants may be relevant to the brain hematomas and retinal hemorrhages seen in patients; however we could not exclude that these signs in patients are secondary to severe respiratory distress.

In conclusion, we report the characterization of the first homozygous dynamin 2 mutation in human, leading to an extremely severe perinatal syndrome associating joints contractures with skeletal abnormalities, hemorrhages, hypotonia and respiratory insufficiency. These observations suggest that homozygous mutations in *DNM2* could be associated with birth defects. This work also highlights the importance of dynamin 2 function in different tissues during fetal development of higher eukaryotes and humans.

## **METHODS**

**Genetic analysis.** All affected children had a normal karyotype. DNA analysis excluded mutations in the *DMPK*, *SMN*, *MTM1* and *BIN1* genes. For linkage analysis, DNA samples from AFB13, AFB12, AFB2, AFB3, AFB4 were analyzed employing the Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K SNP array (Affymetrix). Samples were prepared following manufacturer's instructions. Genotypes were specified by the GeneChip Genotyping Analysis Software (GTYPE v4.1, Affymetrix).

**Transferrin uptake.** Serum-deprived fibroblasts were incubated with AlexaFluor 633 conjugated transferrin (Invitrogen) for 15 min. Cells were washed twice for 3 min in 0.2 M acetic acid, 0.5 M NaCl followed by washing in 0.25 M Tris (pH 10) for 2 min and were subsequently fixed in 1% (v/v) formaldehyde. To block dynamin action, cells were treated with dynasore (Sigma Aldrich) as described by Macia et al.<sup>22</sup>. The samples were analyzed on the FACSCalibur (BD Biosciences) employing the Cell Quest Pro program (BD

Biosciences). Subsequent analysis was performed employing the Flowjo software (Tree Star Inc., Oregon, USA). The student's *t* test was used for statistical analysis. P values of <0.01 were considered significant.

**Cell fixation.** For  $\gamma$  tubulin staining, cells were fixed in cold methanol:acetone for 20 min at -20°C. For dynamin localization to MTs, cells were incubated with Triton X-100 prior to fixation<sup>15</sup>. For removal of cytosolic dynamin, the cells were fixed in 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 % (v/v) paraformaldehyde for 2 min<sup>19</sup>.

**Generation of anti-dynamin 2 antibodies.** The rabbit polyclonal R2641 antibody used in immunofluorescence assays was raised against the dynamin 2 peptide RPTIIRPAEPSLLD. Rabbit polyclonal R2680 antibody employed in western blot analysis was raised against the dynamin 2 EKDQAENEDGAQENTF peptide. Peptide-coupled SulfoLink columns were employed for antibody purification (Pierce).

***In situ* hybridization.** *In situ* hybridization assays employing the DNM2 mRNA probe (obtained from Euroexpress) were performed as previously described<sup>23</sup>.

Cloning of constructs, cell culture, immunofluorescence assays, morpholino injection in zebrafish and imaging and data processing are detailed in supplementary methods with any associated references.

## 6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Joelle Morvan, Nicolas Vitale, Dominique Massotte, Valérie Biancalana and Michel Koenig for reagents and discussion, Marc Koch, Olivia Wendling and the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) for assistance. Some control cell lines were established by the Généthon DNA and Cell Bank (Evry, France). This study was supported by grants from the Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Strasbourg (UdS), Collège de France, the Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation Recherche Médicale (FRM DEQ20071210538), Agence Nationale de la Recherche and the E-rare program.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiments were performed by OK, CKr, HM, JB, CKo, AT, EH, CT, MK, JV and data analyzed by OK, CK, HM, JB, JV and JL. Patient materials and clinical data were provided by CMW, DS and EKB. FP contributed the homoSNP linkage program and SQM contributed control DNA samples. The study was designed by OK and JL, coordinated by JLM and JL, and the paper was written by OK and JL. All authors have read and approved the final manuscript.

## 7 REFERENCES

1. Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421-32 (1989).
2. Bitoun, M. et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* **37**, 1207-9 (2005).
3. Zuchner, S. et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* **37**, 289-94 (2005).
4. Pareyson, D. & Marchesi, C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* **8**, 654-67 (2009).
5. Claeys, K.G. et al. Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* **132**, 1741-52 (2009).
6. Bitoun, M. et al. Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol* **62**, 666-70 (2007).
7. Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L. & Dyda, F. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* **465**, 435-40 (2010).
8. Praefcke, G.J. & McMahon, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 133-47 (2004).
9. Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**, 915-34 (1994).

10. van der Blik, A.M. & Meyerowitz, E.M. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411-4 (1991).
11. Jones, S.M., Howell, K.E., Henley, J.R., Cao, H. & McNiven, M.A. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* **279**, 573-577 (1998).
12. Thompson, H.M., Cao, H., Chen, J., Euteneuer, U. & McNiven, M.A. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol* **6**, 335-42 (2004).
13. Gu, C. et al. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *Embo J* **29**, 3593-606 (2010).
14. Mooren, O.L., Kotova, T.I., Moore, A.J. & Schafer, D.A. Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *J Biol Chem* **284**, 23995-4005 (2009).
15. Tanabe, K. & Takei, K. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J Cell Biol* **185**, 939-48 (2009).
16. Ramachandran, R. et al. The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *Embo J* **26**, 559-66 (2007).
17. Chang, C.R. et al. A lethal de novo mutation in the middle domain of the dynamin-related GTPase Drp1 impairs higher order assembly and mitochondrial division. *J Biol Chem* **285**, 32494-503 (2010).
18. Waterham, H.R. et al. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* **356**, 1736-41 (2007).
19. Chappie, J.S. et al. An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* **20**, 3561-71 (2009).
20. Cao, H., Garcia, F. & McNiven, M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595-609 (1998).
21. Ferguson, S.M. et al. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* **17**, 811-22 (2009).
22. Macia, E. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**, 839-50 (2006).
23. Schaeren-Wiemers, N. & Gerfin-Moser, A. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* **100**, 431-40 (1993).

**Table 1 Clinical features of patients**

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** Identification of a homozygous *DNM2* mutation. **(a)** Pedigree of the consanguineous Pakistani family investigated. **(b)** Homozygosity by descent in the five children employing a 250 K Affymetrix array. Homozygous regions are depicted in dark blue over the whole chromosome 19. A single common region of homozygosity for the three affected children (indicated by a red box) was found on chromosome band 19p13, from 8483868 to 12350726 (hg18 release) and contained 141 genes including the *DNM2* gene. It is worth noting that this region was missed in an initial screen employing a 10K chip probably due to lack of SNP coverage. **(c)** Direct sequencing analysis of DNA samples from all family members. A single base substitution (c.1135T>G; Genbank NM\_001005360) in exon 9 of *DNM2* was identified (indicated by \*) and found homozygous in all affected and heterozygous in non affected. **(d)** Schematic representation of dynamin 2 protein domains with the F379V point mutation; MID: Middle Domain, PH: Pleckstrin Homology, GED: GTase Effector Domain, PRD: Proline-Rich Domain. **(e)** Protein alignment of dynamin family members showing conservation of amino acid F379 in higher eukaryotes; hs: *Homo sapiens*, mm: *Mus musculus*, dr: *Danio rerio*, dm: *Drosophila melanogaster*, ce: *Caenorhabditis elegans*, sc: *Saccharomyces cerevisiae*, sp: *Schizosaccharomyces pombe*.

**Figure 2** Clinical and histological characterization of patients. **(a)** Muscle biopsy analysis of affected patients AFB2 and AFB4. Hematoxylin-eosin staining of quadriceps biopsies depicting the presence of hypotrophic fibers in both patients and centralized nuclei in AFB2. Only the AFB2 biopsy is typical for centronuclear myopathy. **(b)** Contractures. **(c)** X-ray thin ribs/bones. **(d)** MRI brain hemorrhages.

**Figure 3** Microtubule dynamics are unaffected in F379V (AFB2) fibroblasts. **(a)** Ectopic WT dynamin 2 co-localized with MTs while dynamin 2 (F379V) did not associate with MTs. Wild type and F379V dynamin 2 constructs were overexpressed in COS-1 cells and their association with MTs was assessed by solubilisation in

1% (v/v) Triton X-100 in Brinkley buffer. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . **(b)** Assessment of MT dynamics in F379V fibroblasts. Control and F379V fibroblasts were left untreated (no treatment) or were treated with nocodazole for 2 h to depolymerize MTs (+ nocodazole). MTs were allowed to recover following removal of drug for 5 min at 37°C (5 min recovery). The cells were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde followed by solubilization and processing with anti- $\beta$  tubulin antibodies and the nuclear stain Hoechst. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . **(c)**, The F379V mutation does not impact on the profile of acetylated tubulin. Fibroblasts were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and processed with anti-acetylated tubulin specific antibodies following permeabilization with Triton X-100. Hoechst stained the nucleus in blue. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . (left panels). Levels of acetylated tubulin are similar between control and patient fibroblasts. Lysates from three control lines were compared to F379V patient fibroblasts by western blot using indicated antibodies (right panel).

**Figure 4** The F379V dynamin 2 mutation decreases clathrin-mediated endocytosis. **(a)** F379V fibroblasts exhibit reduced transferrin uptake. The rate of transferrin uptake was assessed for three controls and the F379V patient fibroblasts by FACS analysis following a 15 min pulse with AlexaFluor 633 conjugated transferrin. To block uptake, control cells were pre-treated with dynasore or were left on ice during transferrin incubation. The student's *t* test was used for statistical analysis of three independent experiments with  $P < 0.01$ . **(b)** Endogenous dynamin 2 partially co-localizes with clathrin light chain (CLC). Control and patient fibroblasts were fixed in 0.5% (v/v) Triton X-100, 2% (v/v) PFA. Merges with the nuclear stain Hoechst are shown. Right panels depict a mask of the co-localization of anti-dynamin 2 and anti-CLC.

**Figure 5** Dynamin 2 expression and roles during embryonic development. **(a)** Dynamin 2 mRNA can be detected in several tissues during murine embryonic development. *In situ* hybridization experiments were performed with a dynamin 2 mRNA probe on sagittal sections of 14.5 and 16.5 days embryos. Scale bar represents 2 mm. No dynamin 2 mRNA was evident in muscle at this stage. Details of the tissues detected at 14.5 and 16.5 days can be found in Supplementary Table 4. **(b)** Morphology of muscle fibers, vessels and

nerves in the tail of control (left panels) and dynamin 2 MO injected (right panels) zebrafish embryos. Second Harmonic signal is generated by the myosin fibers that are organized in the periodic structure of sarcomeric thick filaments (top panels). Note the misalignment in the MO-injected embryos. GFP images of the endothelial cells in the vascular system from transgenic Tg(Flik1:eGFP)<sup>y1</sup> zebrafish (middle panels). In dynamin 2 MO injected embryos the inter-segmental vessels display deficient sprouting and excess of branching. Peripheral nerves labeled with anti-acetylated tubulin appear similar between control and dynamin 2 MO (bottom panels).



**Table 1 Clinical features of patients**

Patient	AFB2	AFB3	AFB4
Sex	male	female	male
Polyhydramnios	yes	yes	yes
Fetal movements	reduced	reduced	reduced
Delivery	37+5 weeks caesarian section due to bad CTG <sup>1</sup>	39 weeks caesarian section due to decelerations on CTG <sup>2</sup>	37+2 weeks caesarian section due to bradycardia
Birth weight	2400 gr	2425 gr	1800 gr
Appar score	1/4/4	1/5/5	1/1/1
Respiratory insufficiency	congenital	congenital	congenital
Hypotonia at birth	yes <sup>3</sup>	yes <sup>3</sup>	yes <sup>3</sup>
Joint contractures	knee, fingers, toes, ankles	wrist, fingers, toes	elbows, hips, knees
Skeleton	thin ribs; thin bones	thin ribs and long bones	thin and fragile ribs
Neurological signs	no or low arm reflexes; little spontaneous movements	no reflexes; no spontaneous movements	no reflexes; no spontaneous movements
EMG	myopathic or lower motor neuron disease	inconclusive	extremely slow conductance and massive spontaneous muscle activity
MRI	normal	symmetric subdural hematomas; abnormal signal intensity in cortex and U-fibers, basal ganglia, stem brain, and central and parietal white matter	blood in subarachnoid cavity; cerebellar lesions
EEG	normal	nd <sup>3</sup>	severe diffuse cerebral dysfunction with burst suppression
Echocardiography	nd <sup>3</sup>	no structural anomalies; pulmonary hypertension patent ductus arteriosus	no structural anomalies; pulmonary hypertension; patent ductus arteriosus
Ophthalmologic examination	small hemorrhages near vessels	pre-retinal and intra-retinal hemorrhages	several retinal hemorrhages in left eye
Platelet count	119 x 10 <sup>9</sup> /L	83 x 10 <sup>9</sup> /L	83 x 10 <sup>9</sup> /L
CPK value	at day 1 of life: 545 U/L at day 5: 66 U/L	525 U/L	at day 1: 5130 U/L

<sup>1</sup>cardiotocography; <sup>2</sup>generalized severe hypotonia with facial weakness; <sup>3</sup>not determined

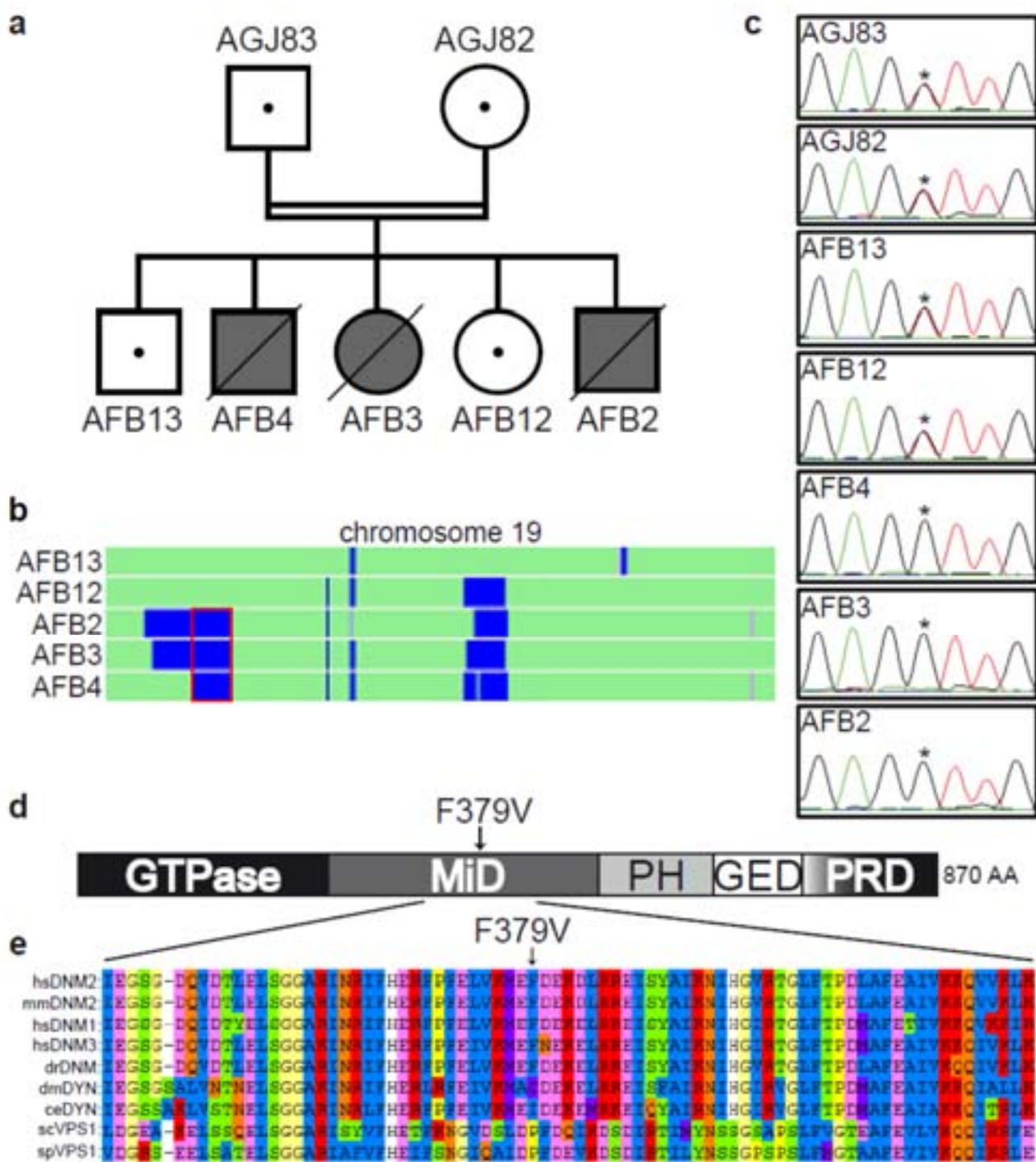


Figure 1

a

AFB2

AFB4

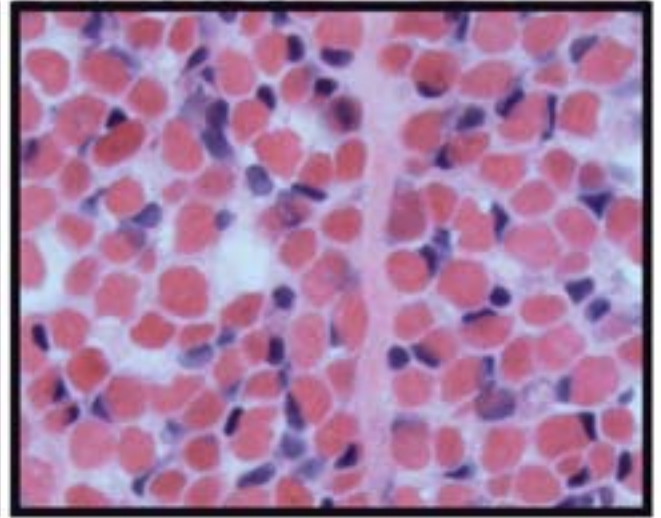
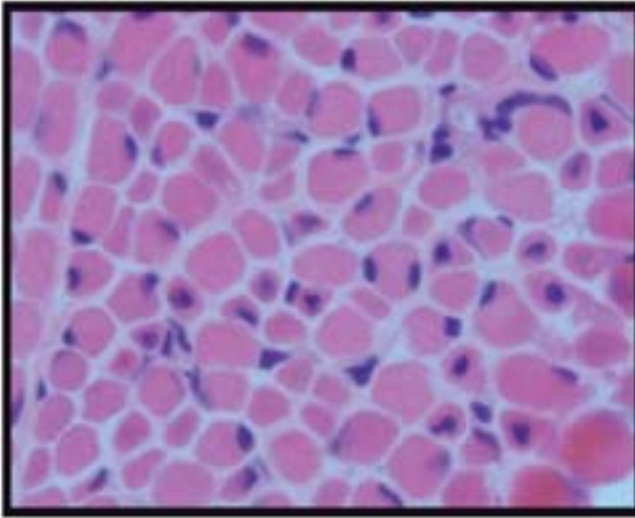


Figure 2

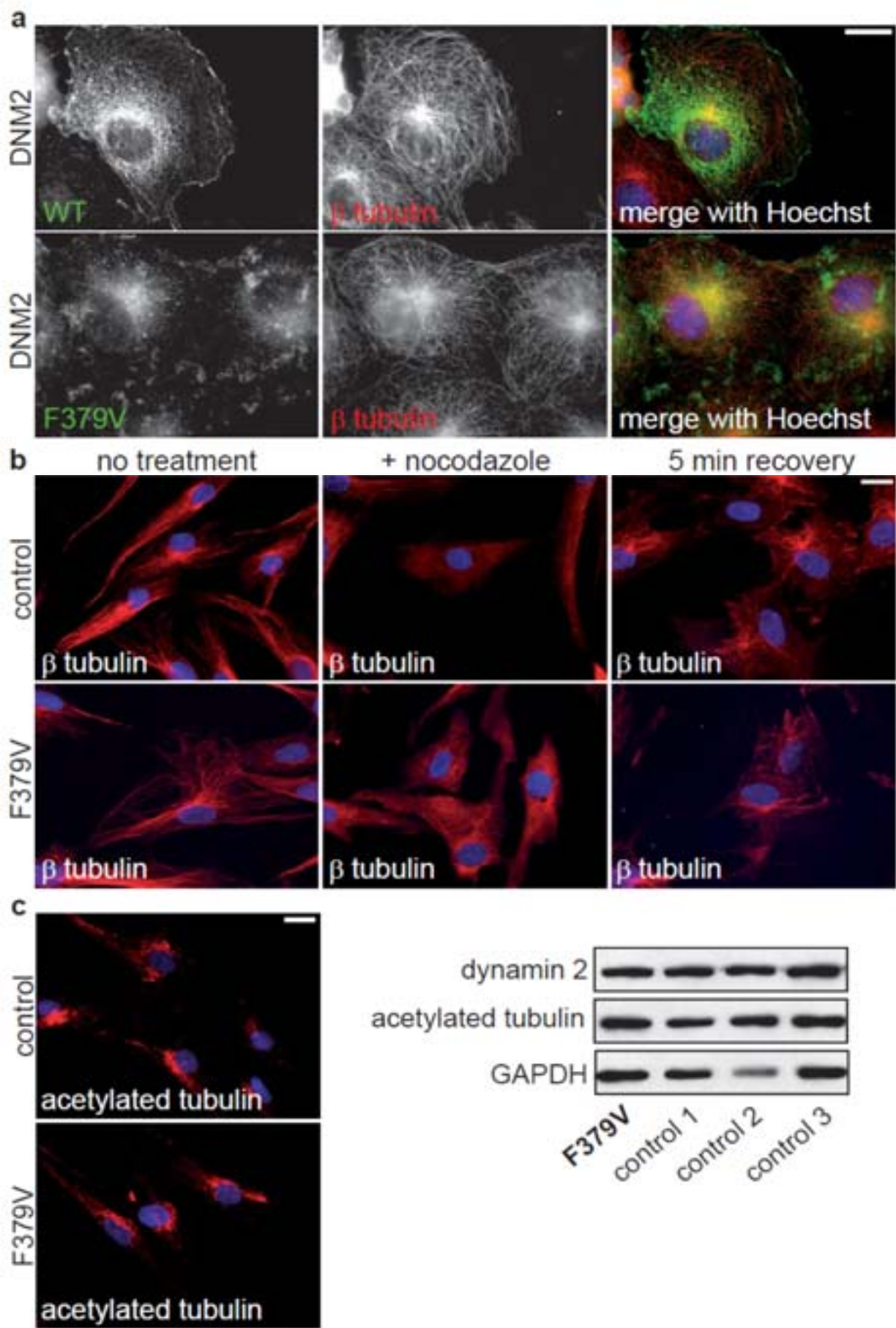


Figure 3



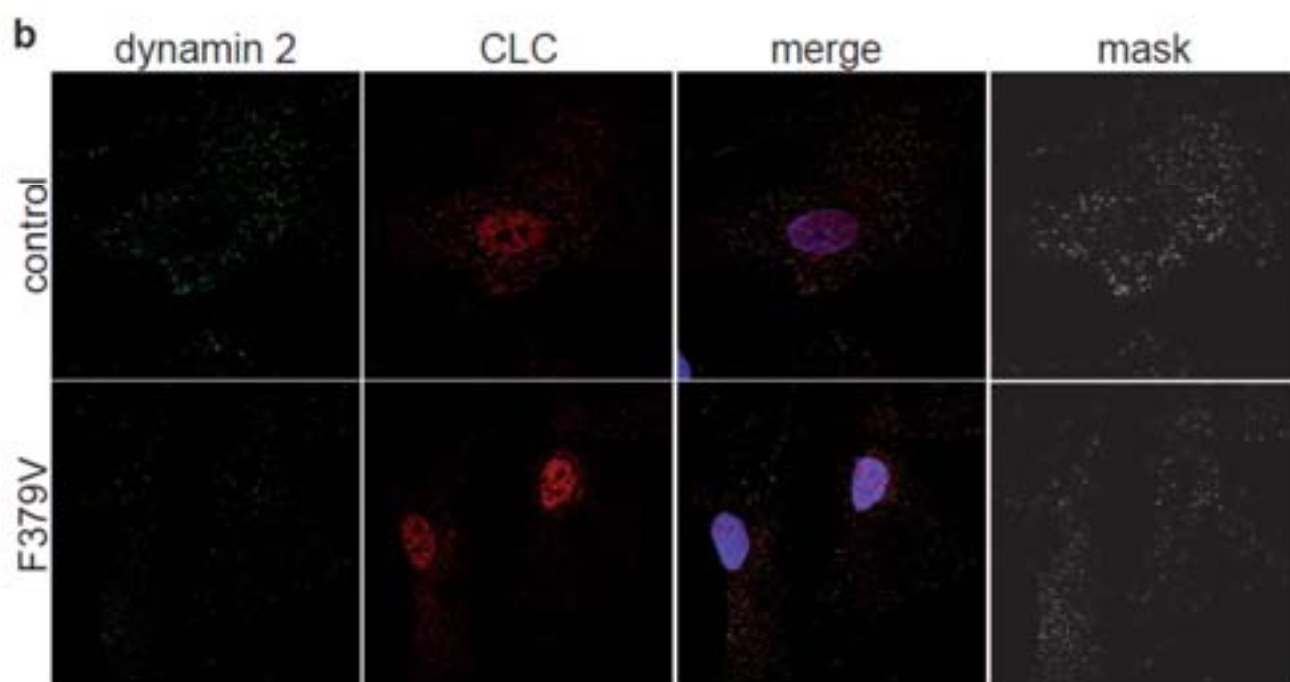
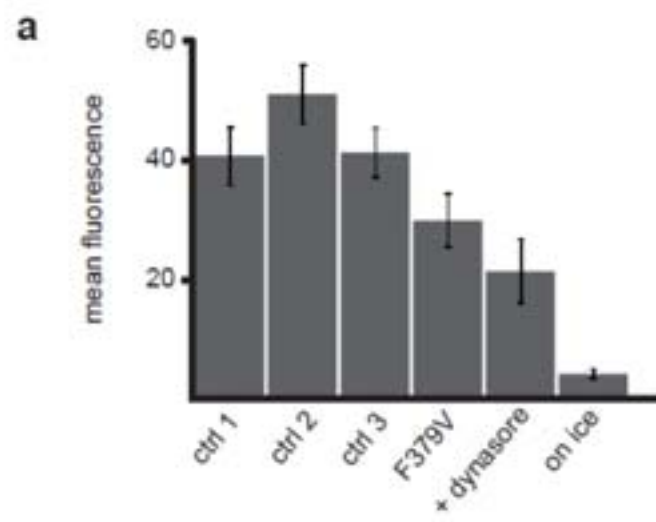


Figure 4

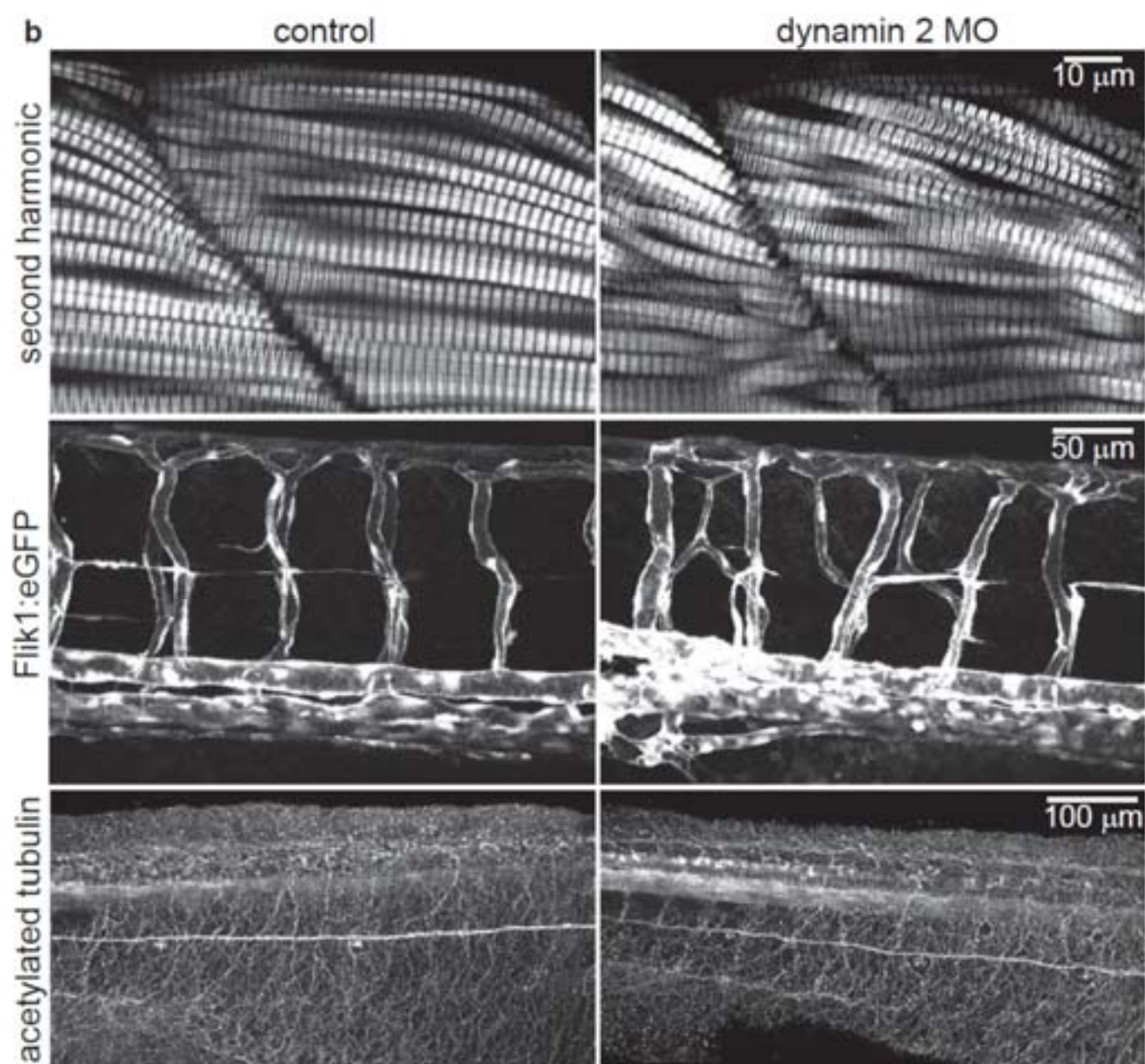
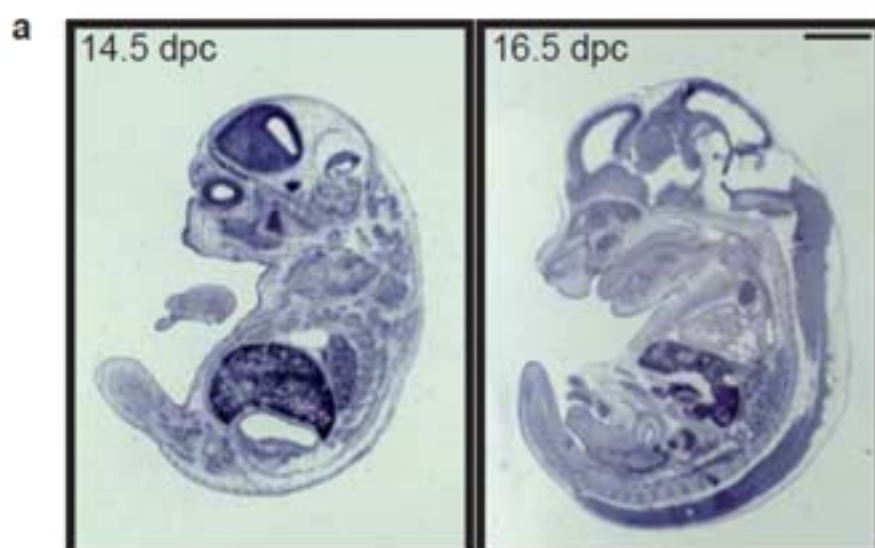


Figure 5

# Mécanodétection des forces hémodynamiques lors du développement endocardique chez l'espèce *Danio rerio*.

## Résumé

Les forces mécaniques dirigeant la valvulogénèse sont mal connues. Chez le poisson zèbre, le flux induit l'expression du facteur de transcription *klf2a* de façon endothéliale spécifique afin d'initier ce processus. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires activés par le flux et aboutissant à la formation des valves cardiaques. En altérant et modifiant le pattern fluidique, nous avons observé le rôle des forces engendrées par le flux pour le contrôle de l'expression de *klf2a* ainsi que du nombre de cellules endocardiques. Nous avons ensuite regardé les divers mécanosenseurs pouvant intervenir lors de ce processus. Ainsi nous avons mis à jour la présence de cils dans l'endocarde et fait la relation entre les canaux membranaires TRPP2 et TRPV4, la présence de calcium intracellulaire dans les cellules endocardiques et la voie moléculaire PKC-PKD2-HDAC5, composants nécessaires à l'expression du gène *klf2a* en réponse au flux. Ces données nous permettent de suggérer le rôle de TRPP2, TRPV4 et la voie moléculaire récemment découverte, PKC-PKD2-HDAC5 dans la formation valvulaire dépendante de *klf2a*.

Mots clefs: Valve, *klf2a*, cil, TRPV4, TRPP2, HDAC5.

## Abstract

Mechanical forces that dictate valve formation are not well understood. In zebrafish, blood flow induces expression of the transcription factor *klf2a* in a specific subset of endocardial cells that will go on to form functional valves. We aimed to identify the molecular mechanisms activating this flow-induced valve formation. By altering and modifying blood flow patterns, we observed that flow-mediated forces are necessary to control early *klf2a* expression and endocardial cell numbers. We then looked at different mechanosensors operating at early stages of valve development. Using in vivo labelling, we identified primary cilia in the endocardium and showed that the membrane channels TRPP2 and TRPV4 increase intracellular calcium which activates a PKC-PKD2-HDAC5 pathway necessary for *klf2a* expression in response to flow. Together these data suggest a role for TRPV4, TRPP2 and the recently described PKC-PKD2-HDAC5 signalling pathway in *klf2a*-mediated valvulogenesis.

Key words: Valve, *klf2a*, Cilia, TRPV4, TRPP2, calcium, HDAC5.