

Implication de l'environnement tissulaire dans la cardiomyogenèse

par Marie-France Gardahaut, Gwenola Auda-Boucher, Josiane Fontaine-Pérus

CNRS UMR 6018, Faculté des Sciences et des Techniques, 2, rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex 03, France

Reçu le 18 décembre 2002

RÉSUMÉ

Les stades du développement au cours desquels s'effectuent la spécification et la détermination des cardiomyocytes murins ont été définis en utilisant conjointement des cultures d'explants tissulaires d'embryons pré- et post-gastrula et des transplantations de tissu cardiaque ou cardiogénique d'embryons de souris pratiquées chez l'embryon de poulet. La différenciation des cellules cultivées et transplantées en cardiomyocytes a été évaluée en testant l'expression des messagers de plusieurs gènes de facteurs de transcription cardiaque (Nkx 2.5, eHAND, dHAND, GATA 4), de l' α actine cardiaque et l'expression protéique de l'isoforme β de la chaîne lourde de myosine (MHC). Les analyses *in vitro* montrent que des cellules capables de s'engager dans la voie cardiaque sont présentes avant la gastrulation au niveau de l'épiblaste de 6,5 jpc. Par contre, transplantées chez l'embryon de

poulet, les cellules épiblastiques présentent une différenciation cardiaque incomplète. Notre étude indique que les structures dérivées du neur ectoderme de l'embryon de poulet hôte n'influencent pas le processus de cardiogenèse et ne sont pas impliquées dans le comportement de l'épiblaste transplanté. Les cellules du neur ectoderme n'ont aucune action sur la cardiogenèse murine en culture. Nous apportons la démonstration que l'émergence des cellules mésodermiques dans la voie cardiaque entre les stades MS (mi-ligne primitive) et LS (stade tardif de la ligne primitive) est stimulée par l'endoderme. Le mésoderme explanté au stade tardif de la ligne primitive (7,5 jpc) adopte un phénotype cardiaque en greffe chez l'embryon de poulet, ce qui permet de conclure que la spécification des précurseurs cardiaques apparaît irréversible à ce stade chez l'embryon de souris.

SUMMARY Implication cues influence cardiomyogenesis

The staging of murine cardiomyocyte specification and determination was investigated in cultures of tissue explants from pre- and postgastrulation embryos and after transplantation of cardiac or cardiogenic tissues from mouse embryos into chick embryos. The development of cultured and transplanted cells in cardiomyocytes was evaluated by testing the expression of several cardiac transcription factor genes (Nkx 2.5, eHAND, dHAND, GATA 4), α cardiac actin, and β myosin heavy chain protein. *In vitro* analyses showed that cells with the potential to form cardiac muscle were present prior to gastrulation in 6.5-day postconception (dpc) epiblasts. Although, as shown by *in vivo* experiments, neur ectodermal

derived structures did not influence cardiogenesis in epiblast transplants, these transplants did not exhibit full cardiogenic cell differentiation in the chicken environment. In *in vitro* culture, the neur ectoderm also had no effect on murine cardiomyogenesis. In contrast, the presence of endoderm in explants between mid- and late streak stages stimulated emerging mesodermal cells to adopt a myocardial pathway. Mesoderm from late streak explants (7.5 dpc) was capable of differentiating into a cardiac phenotype in the avian heterotopic environment, indicating that the specification of cardiac precursors became irreversible around the late streak stage in mouse embryo.

INTRODUCTION

Chez les Vertébrés, l'identification des mécanismes cellulaires contrôlant la cardiogenèse découle principalement d'études effectuées chez les amphibiens et les oiseaux. Chez certains amphibiens urodèles, le mésoderme précardiaque ne peut se différencier en muscle

cardiaque qu'au moment de la neurulation (pour revue Jacobson & Sater, 1988). Par contre, chez les amphibiens anoures, tels le Xénope et la Grenouille, la spécification des progéniteurs cardiaques apparaît plus précoce puisqu'elle s'effectue pendant la gastrulation (Sater & Jacobson, 1989; Evans *et al.*, 1995; Nascone & Mercola, 1995). Chez l'oiseau, les précurseurs cardiaques

situés dans la moitié antérieure de la ligne primitive s'internalisent et migrent, à partir du stade 3 de Hamburger et Hamilton (1951), pour former, au stade 5, les deux aires précardiaques dans le mésoderme latéral (Rawles, 1943; Gonzalez-Sanchez & Bader, 1990; Garcia-Martinez & Schoenwolf, 1993). À partir du stade 6, les deux aires précardiaques fusionnent et donnent un tube unique organisé transitoirement suivant l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Stalsberg & DeHaan, 1969). Dans cette espèce, les cellules du mésoderme précardiaque invaginées aux stades 4-5 donnent des cellules myocardiales lorsqu'elles sont cultivées à densité clonale, suggérant que la spécification du lignage cardiaque est réalisée une fois la gastrulation achevée (Gonzalez-Sanchez & Bader, 1990; Antin *et al.*, 1994; Montgomery *et al.*, 1994; Gannon & Bader, 1995). L'expression du facteur de transcription cardiaque Nkx 2.5 par les cellules mésodermiques précardiaques dès le stade 5 le confirme (Schultheiss *et al.*, 1995). Toutefois l'engagement irréversible, autrement dit, la détermination (Slack, 1991) des cellules myocardiales n'est effective chez l'oiseau qu'aux stades 7/8. Parvenus à ce stade les cardiomyoblastes, contrairement aux progéniteurs cardiaques nouvellement invaginés, ne présentent pas de modification de leur phénotype après un traitement par des facteurs exogènes comme l'acide rétinoïque (Yutzey *et al.*, 1995) ou le bromodésoxyuridine (Montgomery *et al.*, 1994).

Les mécanismes contrôlant la spécification et la détermination du lignage cardiogénique ont fait et font toujours l'objet de nombreuses études dont beaucoup démontrent l'importance des tissus adjacents au territoire cardiogénique dans le développement du cœur. C'est ainsi qu'il est observé chez le Xénope que l'endoderme situé au contact du mésoderme précardiaque influence la spécification des cellules précurseurs (Nascone & Mercola, 1995). Chez l'oiseau, l'endoderme antérieur est capable de convertir des cellules mésodermiques non cardiogéniques en cellules cardiaques, mais il est toutefois incapable de transformer des cellules épiblastiques en cellules cardiaques (Schultheiss *et al.*, 1995; Yatskievych *et al.*, 1997). Selon Alsan et Schultheiss (2002) c'est le Fgf 8 produit par les cellules de l'endoderme antérieur qui, chez l'oiseau, est à l'origine de ses propriétés inductrices cardiaques. Dans cette espèce, l'ectoderme s'est révélé avoir une influence directement opposée à celle de l'endoderme soit inhibitrice de la différenciation cardiogénique (Sugi & Lough, 1994; Antin *et al.*, 1994; Climent *et al.*, 1995). Un candidat à un tel signal inhibiteur est la protéine Wnt sécrétée pour les cellules dérivées du neurectoderme (Marvin *et al.*, 2001; Tzahor & Lassar, 2001).

Chez l'embryon de souris au stade de la ligne primitive (7-7,5 jours post-coïtum, jpc), les cellules progénitrices cardiaques sont associées au mésoderme splanchnique antérieur bordant les cavités coelomiques intra-embryonnaires. La fusion des deux régions cardiogéniques s'effectue à 7,5-8 jpc (De Ruiter *et al.*, 1992). Bien que les cellules du mésoderme cardiaque

prennent leur origine au niveau de l'épiblaste latéral postérieur (6,5 jpc) (Lawson & Pedersen, 1992; Parameswaran & Tam, 1995), les cellules de l'épiblaste antérieur possèdent également des potentialités cardiogéniques (Tam *et al.*, 1997). La description des événements cellulaires qui contrôlent le développement cardiaque de l'embryon de souris repose souvent sur ceux décrits chez l'oiseau. Il est vrai que les techniques d'embryologie expérimentale couramment utilisées pour l'embryon d'oiseau sont difficiles à mettre en œuvre chez le fœtus de souris.

Nos expériences ont eu pour but d'analyser le rôle joué par l'environnement tissulaire dans la différenciation des précurseurs cardiaques de la souris. Deux approches ont été utilisées : d'une part, la culture *in vitro* qui permet d'extirper les cellules de leur environnement tissulaire et, d'autre part, la greffe chez l'embryon d'oiseau qui offre la possibilité de soumettre les cellules implantées à des environnements tissulaires distincts liés aux sites d'implantation (Fontaine-Péru *et al.*, 1995, 1997). En culture *in vitro* comme en greffe *in ovo*, la formation du mésoderme a été contrôlée grâce à l'expression du gène Brachyury (Wilkinson *et al.*, 1990), l'activation du programme musculaire cardiaque caractérisée par l'expression de gènes spécifiques, tels que Nkx 2.5 (Harvey, 1996), GATA 4 (pour revue Durocher & Nemer, 1998), eHAND et dHAND (pour revue Srivasta, 1999) et la différenciation cardiaque par l'expression des messagers de l' α actine cardiaque (Sassoon *et al.*, 1988) ainsi que par l'expression protéique de l'isoforme β de la chaîne lourde de la myosine (β MHC) (De Groot *et al.*, 1989).

Nos résultats obtenus tant *in vitro* qu'*in vivo* indiquent que la spécification du lignage cardiaque a lieu vers 6,5 jpc chez l'embryon de souris et que l'engagement des cardiomyoblastes devient irréversible aux environs de 7,5 jpc (stade tardif de la ligne primitive, LS late streak stage). Si l'endoderme n'est pas requis pour la spécification du lignage cardiaque, sa présence entre le milieu et la fin du stade de la ligne primitive stimule les cellules du mésoderme à devenir cardiogène. Le neurectoderme est par contre sans effet sur la cardiogenèse chez la Souris (Auda-Boucher *et al.*, 2000).

ANIMAUX, MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expériences ont été réalisées chez des embryons de poulet JA 657 et des embryons de souris, issus de la lignée commerciale Swiss et de la lignée transgénique M desmine LacZ chez laquelle le gène rapporteur LacZ est sous la dépendance du promoteur du gène desmine endogène (lignée établie dans l'équipe du Pr D. Paulin).

Les embryons de souris sont prélevés entre 6,5 et 9 jpc, et les stades des embryons sont définis pendant la gastrulation selon les critères établis par Downs et Davies (1993). Le stade pré-ligne primitive (Pre-Streak, PS, 6,5 jpc) est caractérisé essentiellement par a) la pré-

sence d'une constriction de l'endoderme délimitant clairement les portions embryonnaires et extra-embryonnaires b) une cavité proamniotique continue entre les deux régions c) l'absence de mésoderme. Au stade de la ligne primitive, trois niveaux de développement peuvent être distingués 1) le stade précoce (Early Streak, ES, 6,5-7 jpc) défini par l'apparition d'une petite portion de mésoderme s'étendant sur la moitié de la région postérieure, 2) le stade intermédiaire (Mid-Streak, MS, 7-7,25 jpc) caractérisé par l'extension de la ligne primitive sur la presque totalité de la région postérieure et le développement bilatéral du mésoderme 3) le stade tardif (Late Streak, LS, 7,25-7,75 jpc) identifié par la condensation de la ligne primitive sous forme de nœud et l'apparition du repli amniotique postérieur. Les embryons de poulet hôte ont soit 1,5 jours d'incubation (entre 13 et 20 somites), soit 3 jours selon les séries de greffe.

Cultures (Fig. 1)

Les cultures ont été effectuées à partir d'embryons de souris isolés à 6,5 jpc, à partir des régions de l'embryon incluant les territoires cardiaques présomptifs à 7-7,5 jpc comprenant soit les 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), soit le mésoderme associé à l'endoderme ou à l'ectoderme, soit le mésoderme seul et à partir de tubes cardiaques de 8 jpc. Les cocultures ont été établies à partir d'embryons de 6,5 jpc et de fragments de tubes neuraux ou de tubes neuraux et notochorde prélevés chez des embryons de poulet âgés de 13 à 20 somites. Dans tous les cas, les explants sont placés dans des boîtes de Pétri collagénées contenant du DMEM additionné de 10 % de sérum de veau fœtal.

Greffes

D'une manière générale, les 5 derniers somites des embryons de poulet de 13 à 22 paires de somites sont enlevés unilatéralement et les greffons donneurs murins sont transférés dans l'espace laissé libre par l'ablation. Selon les séries, les greffons sont constitués de fragments de ventricule ou d'atrium de 9 jpc, de boucles cardiaques de 8,5 jpc, de tubes cardiaques de 8 jpc, des lames mésodermiques de 7,5 jpc et d'embryons de 6,5 jpc. Pour tester l'influence des organes axiaux (tube neural et notochorde) sur la différenciation des progéniteurs cardiaques, les embryons de 6,5 jpc ont été greffés chez des embryons de poulet hôte dont on a enlevé soit le tube neural et la notochorde soit le tube neural seul. Dans une autre série, les transplantations ont été effectuées dans le flanc ou dans le bourgeon de membre d'embryons de poulet receveurs de 3 jours.

Techniques histologiques et histochimiques

Les embryons opérés ont été fixés entre 1 et 4 jours après la greffe 1) dans une solution de Carnoy puis inclus dans la paraffine et les coupes colorées selon la méthode de Feulgen et Rossenbeck (1924) 2) dans une solution de paraformaldéhyde, congelés et les coupes colorées au bis-benzimide (Hoechst n° 33258). Les deux traitements permettent de repérer facilement les noyaux de souris parmi ceux de poulet en raison d'une répartition différente de l'ADN nucléaire dans ces deux espèces. Les cellules greffées provenant d'embryons de souris transgéniques desmine LacZ sont détectées chez le poulet hôte après la révélation histochimique de l'activité β galactosidase. L'isoforme β de la chaîne lourde de myosine de souris est détectée par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps monoclonal 1040S (clone F36, Biocytex).

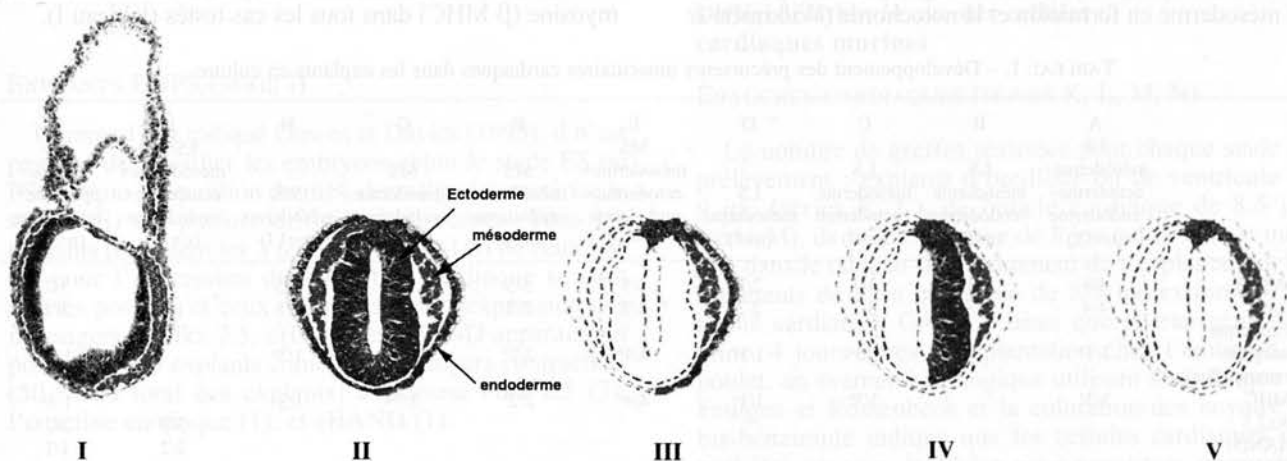


FIG. 1. — Représentation schématique des embryons de souris MS/LS. (I) Section sagittale. (II, III, IV, et V) Sections transversales, les lignes pointillées délimitent les régions qui ont été supprimées. (II) Trois feuillets germinatifs (séries A, E, Q), (III) mésoderme + endoderme + ligne primitive (séries B, F, R), (IV) mésoderme + ectoderme + ligne primitive (séries C, G), (V) mésoderme + ligne primitive (séries D, H, O).

Détection des transcrits

PRÉPARATION DES EMBRYONS ET DES CULTURES

Les embryons et cultures sont prélevés et traités selon la technique d'hybridation décrite par Henrique *et al.* (1995).

PRÉPARATION DES SONDES

Les ADNc de souris : α actine cardiaque (Sassoon *et al.*, 1988), GATA 4 (Grépin *et al.*, 1994), eHAND et dHAND (Srivasta *et al.*, 1995), Nkx 2.5 (Lintz *et al.*, 1993) et Brachyury (Kispert *et al.*, 1995) ont été linéarisés, respectivement avec EcoRI, BamHI, NotI, EcoRI et XbaI. L'ARN polymérase T3 a été utilisée pour transcrire les ARNc anti-sens α actine, GATA 4 et brachyury et l'ARN polymérase T7 pour les anti-sens Nkx 2.5, eHAND et dHAND. Toutes les ribosondes ont été produites par transcription *in vitro* en présence d'UTP digoxigénine (Boehringer Mannheim).

RÉSULTATS

Le gène homéoboîte Nkx 2.5, l'un des marqueurs précoces du lignage cardiaque des Vertébrés est exprimé par les cellules précardiaques au stade de la ligne primitive (Lintz *et al.*, 1993). Les deux facteurs de transcription, dHAND et eHAND, sont aussi exprimés selon un patron symétrique au niveau des aires précardiaques puis leur expression se restreint aux territoires des futurs ventricules droit et gauche (Srivasta *et al.*, 1995; 1997). Les messagers du facteur de transcription cardiaque GATA 4 détectés chez la souris à 7,5 jpc sont accumulés tout au long du développement fœtal (Fig. 2a) jusqu'à l'âge adulte (Heikinheimo *et al.*, 1994). Ceux de l' α actine cardiaque sont exprimés à partir de 8 jpc dans le tube cardiaque (Sassoon, 1993). Brachyury, gène requis pour la formation du mésoderme au cours de la gastrulation, est exprimé à 6,5 jpc au niveau de l'épiblaste proche de la ligne primitive puis dans le mésoderme en formation et la notochorde (Wilkinson *et*

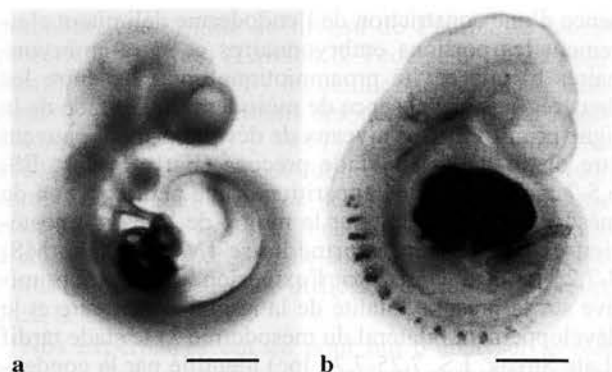


FIG. 2. – (a) Hybridation *in toto* d'embryon de 9 jpc avec la ribsonde anti-sens GATA 4. L'expression est restreinte au cœur et à l'intestin primitif. Barre d'échelle, 500 μ m. (b) Vue latérale d'un embryon transgénique desmine LacZ à 9,5 jpc traité pour la révélation de la β galactosidase. A ce stade, les somites les plus rostraux apparaissent X-gal positifs et le cœur est très fortement marqué. Barre d'échelle, 500 μ m.

al., 1990; Sassoon, 1993). Chez l'embryon de souris donneur desmine LacZ, l'activité du transgène est révélée à partir de 7,5 jpc dans l'ébauche cardiaque (Fig. 2b).

Différenciation *in vitro* des cellules progénitrices cardiaques murines

EXPLANTS LS (SÉRIES A-D)

Les cultures d'explants au stade LS (voir matériel et méthodes et fig. 1) ont été réalisées à partir soit des 3 feuilletts embryonnaires (série A), soit du mésoderme seul (série D) ou accompagné de l'endoderme (série B) ou de l'ectoderme (série C). Dans toutes les séries, les explants présentent des contractions spontanées après 48 heures, expriment les gènes GATA 4, de même que le transgène desmine et synthétisent l'isoforme β de la chaîne lourde de myosine (β MHC) dans tous les cas testés (tableau I).

TABLEAU I. – Développement des précurseurs musculaires cardiaques dans les explants en culture.

	A LS mésoderme+ ectoderme+ endoderme (n=11)	B LS mésoderme +endoderme (n=5)	C LS mésoderme +ectoderme (n=9)	D LS mésoderme (n=5)	E MS mésoderme+ ectoderme+ endoderme (n=12)	F MS mésoderme +endoderme (n=9)	G MS mésoderme +ectoderme (n=16)	H MS mésoderme (n=13)	I ES/PS mésoderme+ ectoderme+ endoderme (n=10)	J 6,5 jpc épiblaste+ hypoblaste (n=22)
GATA4	4/4	3/3	3/3	2/2	5/5	5/5	2/6	2/5		3/7
actine	4/4	2/3	3/3	2/2	3/3	2/2	2/5	2/5	1/4	3/7
α cardiaque										
transgène- desmine (β gal)	3/3 ^a		3/3 ^a	1/1 ^a	4/4 ^a	2/2 ^a	1/5 ^a	1/3 ^a		1/3 ^a
β MHC	3/3 ^a		3/3 ^a	1/1 ^a	4/4 ^a	2/2 ^a	1/5 ^a	1/3 ^a		1/3 ^a
Nkx2.5									3/3	2/2
eHAND									2/2	1/1
dHAND									1/1	2/2
Battements	11/11	5/5	9/9	5/5	12/12	9/9	5/16	5/13	5/10	8/22
Spontanés										

Pour chaque marqueur cardiaque, le ratio représente le nombre d'explants exprimant les ARNm rapporté au nombre total d'explants examinés. n = nombre total de cultures pour chaque stade. ^a L'activité β gal et la coloration de la β MHC ont été détectées sur les mêmes explants.

EXPLANTS MS (SÉRIES E-H)

À ce stade, les deux aires mésodermiques sont présentes et s'étendent latéralement de part et d'autre de la ligne médiane recouvrant l'ectoderme primitif sous-jacent (Down & Davies, 1993). Tous les explants constitués des 3 feuillets embryonnaires (série E) contiennent un ou plusieurs foyers de cellules contractiles exprimant les transcrits de GATA 4 (5/5) et de l' α actine cardiaque (3/3) (Figs. 3a et 3b). L'activation du transgène (4/4) et de la β MHC (4/4) a également lieu. Des résultats similaires ont été obtenus avec des cultures d'explants MS dépourvus d'ectoderme (mésoderme+endoderme) (série F) (tableau I). Par contre, des explants MS cultivés sans endoderme (série G) n'acquièrent pas toujours un phénotype cardiaque (tableau I). 38 % des explants de mésoderme seul (série H) (5/13) et 31 % (5/16) de mésoderme associé à l'ectoderme (série G) renferment des cellules contractiles. Dans ces explants contractiles le transgène desmine est activé ainsi que les gènes GATA 4, α actine cardiaque et β MHC.

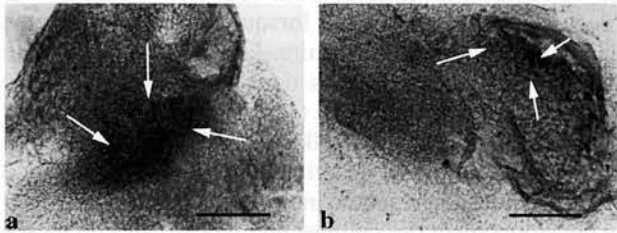


FIG. 3. – Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de GATA 4 (flèches) (a) et de l' α actine cardiaque (flèches) (b) à l'aide de sondes marquées à la digoxigénine. Explants de souris au stade MS constitués des 3 feuillets germinatifs (mésoderme + endoderme + ectoderme) cultivés pendant 48 h exprimant les marqueurs cardiaques. Barre d'échelle, 250 μ m.

EXPLANTS ES/PS (SÉRIE I)

Comme l'ont indiqué Downs et Davies (1993), il n'est pas aisé de classer les embryons selon le stade ES ou PS puisque l'apparition du mésoderme (qui caractérise le stade ES) est parfois difficile à discerner. Tous les explants possèdent les 3 feuillets. 25 % (1/4) de ceux testés pour l'expression de l' α actine cardiaque se sont révélés positifs, et ceux examinés pour l'expression des messagers de Nkx 2.5, eHAND et dHAND apparaissent positifs. Les 5 explants contenant des foyers contractiles (50 % du total des explants) expriment Nkx 2.5 (3), l' α actine cardiaque (1), et eHAND (1).

EXPLANTS 6,5 JPC (SÉRIE J)

Le matériel prélevé à ce stade est constitué des feuillets épiblastique et hypoblastique. Après 2 jours de culture, 36 % (8/22) des explants présentent des batte-

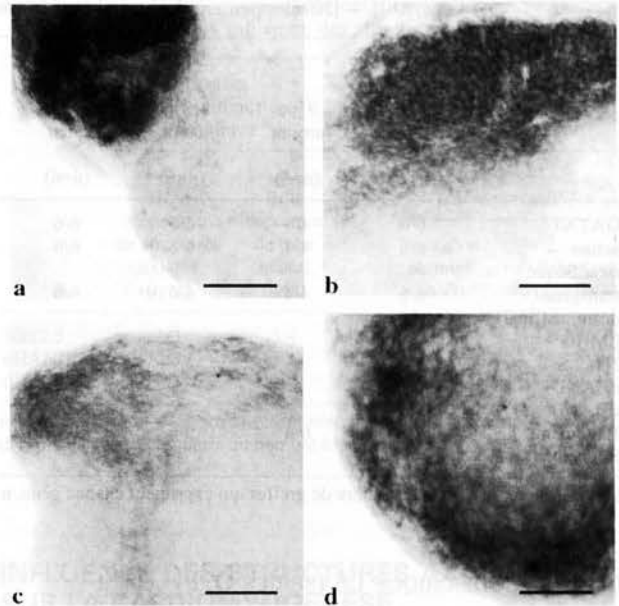


FIG. 4. – Cellules musculaires cardiaques différenciées à partir d'épiblaste/hypoblaste de souris de 6,5 jpc cultivés pendant 48 h. Hybridation *in situ* avec la sonde GATA 4 (a), Nkx 2.5 (b), eHAND (c), dHAND (d). Barre d'échelle, 125 μ m

ments. GATA 4 (Fig. 4a), l' α actine cardiaque, le transgène desmine et l'isoforme β de la MHC sont détectés dans environ 30 % des explants examinés. Les marqueurs plus précoces sont observés dans tous les explants analysés (2/2 pour Nkx 2.5, 1/1 pour eHAND et 2/2 pour dHAND) (Figs. 4b, 4c et 4d).

Différenciation *in ovo* des cellules cardiaques murines

ÉBAUCHES CARDIAQUES (SÉRIES K, L, M, N)

Le nombre de greffes réalisées pour chaque stade de prélèvement : explants d'oreillette ou de ventricule de 9 jpc (séries K, L), de boucle cardiaque de 8,5 jpc (série M), de tube cardiaque de 8 jpc (série N), est indiqué dans le tableau II. Au moment de l'explantation, les fragments de tissu cardiaque de 8-9 jpc expriment l' α actine cardiaque, GATA 4 ainsi que le transgène desmine. 4 jours après transplantation chez l'embryon de poulet, un examen histologique utilisant la technique de Feulgen et Rossenbeck et la coloration des noyaux au bis-benzimide indique que les cellules cardiaques ont proliféré au sein de l'hôte pour constituer une masse compacte au site de greffe et dans laquelle 95 % des cellules activent le transgène desmine. Dans tous les cas les greffons expriment aussi GATA 4 et l' α actine cardiaque (tableau II).

TABLEAU II. – Développement des précurseurs musculaires cardiaques de souris après transplantation *in ovo*.

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
	9 jpc ventricule	9 jpc atrium	8,5 jpc cœur	8 jpc cœur	LS lame méso- dermique + lp	LS lame méso- dermique	MS Embryon (ect+ mes+endo+lp)	Embryon (ect+ mes+endo+lp)	ES/PS Embryon	6,5 jpc embryon
	(n=6)	(n=4)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=12)	(n=6)	(n=5)	(n=8)
GATA4	6/6	4/4	6/6	6/6	6/6	6/6	3/12	0/6	0/5	0/8
actine α cardiaque	6/6	4/4	6/6	6/6	6/6	6/6	3/12	0/6	0/5	0/8
transgène- desmine (β gal)	6/6	4/4	6/6	6/6	6/6	6/6	3/12	0/6	0/5	0/8 ^a
β MHC										
Nkx2.5							5/9	3/6	3/5	5/8
eHAND							5/9	4/6	4/5	5/8
dHAND							5/9	4/6	4/5	5/8
Battements Spontanés	0/6	0/4	0/6	0/6	0/6	0/6	5/12			2/6

Les valeurs représentent le nombre de greffes qui expriment chaque gène. n = nombre de greffes effectuées dans chaque série. lp = ligne primitive.

LAME MÉSODERMIQUE LS (SÉRIES O, P)

Les régions proximales antérieures de l'embryon au stade LS (qui contiennent le mésoderme cardiogénique résultant de la migration antéro-latérale des progéniteurs situés au niveau de la ligne primitive) ont été disséquées et débarrassées de l'endoderme et de l'ectoderme. La lame mésodermique a été transplantée avec (série O) ou sans (série P) la ligne primitive. L'activation du transgène desmine ainsi que les transcrits de GATA 4 et de l' α actine cardiaque sont observés dans tous les greffons qu'ils soient ou non associés à la ligne primitive (tableau II, Figs 5a, 5b et 5c).

EMBRYONS MS (SÉRIES Q, R)

Parmi les 12 embryons chimériques greffés avec des explants MS contenant les 3 feuillets germinatifs et la ligne primitive (série Q), seuls 3 d'entre eux présentent une activité X-gal et expriment les transcrits de GATA 4

et de l' α actine cardiaque. Les 9 embryons restants peuvent dans certains cas exprimer les gènes Nkx 2.5 (5/9), eHAND (5/9) et dHAND (5/9) (tableau II). En résumé 66 % (8/12) des greffons sont capables d'engager un processus de cardiogenèse lorsqu'ils sont transplantés dans un environnement aviaire. Les messagers du gène Brachyury sont observables dans 5 greffons parmi les 12 testés et seul l'un d'eux (1/5) présente les transcrits des marqueurs précoces (Nkx 2.5, eHAND, dHAND). Au regard des travaux de Climent *et al.* (1995) et afin de tester l'influence présumée inhibitrice de l'ectoderme sur le développement des cellules prémyocardiales du mésoderme, des explants MS dépourvus d'ectoderme ont été greffés (série R). Comme indiqué dans le tableau II, aucune des cellules dérivées du donneur ne montre d'activité X Gal, GATA 4 ou α actine cardiaque. Par contre dans les explants GATA 4 négatifs, Nkx 2.5, eHAND et dHAND sont présents dans des proportions similaires à celles de la série Q (50-60 % des cas).

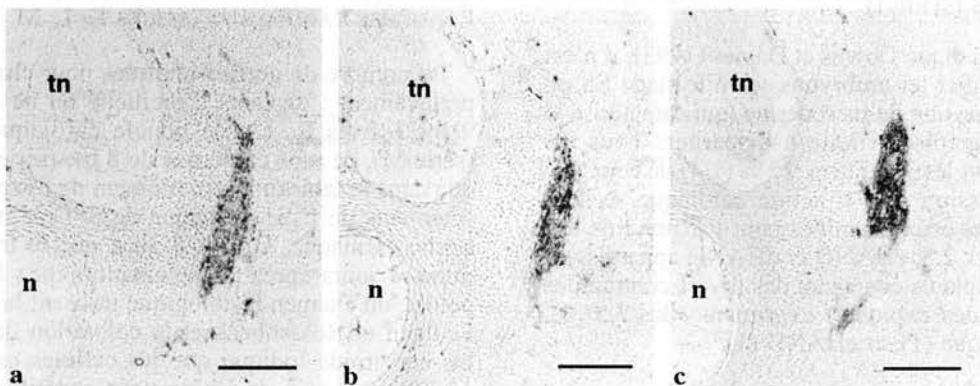


FIG. 5. – Différenciation *in ovo* de cellules musculaires cardiaques. Coupes transversales sériees d'un embryon de poulet hôte de 6 jours ayant subi au stade de 14 somites, au niveau des 5 derniers somites, la greffe de mésoderme latéral provenant d'un embryon de souris de stade LS. Les cellules greffées identifiées par la coloration X-gal présentent une activation du transgène desmine LacZ (a) et expriment les transcrits des gènes GATA 4 (b) et l' α actine cardiaque (c). Barre d'échelle, 125 μ m.

EMBRYONS ES/PS (SÉRIE S)

Comme l'indique l'expression génique de Nkx 2.5 (3/5), de eHAND et dHAND (4/5), les cellules nouvellement ou non encore invaginées montrent un début de différenciation cardiaque après transplantations chez l'embryon hôte. L'expression de GATA 4, de l' α actine cardiaque, du transgène desmine sont absents chez tous les greffons examinés (tableau II).

EMBRYONS DE 6,5 JPC (SÉRIE T)

Les explants comportent l'épiblaste et l'hypoblaste. Comme dans la série précédente les greffons n'expriment pas GATA 4, l' α actine cardiaque et le transgène desmine. Nkx 2.5 et eHAND sont révélés dans 62 % des greffons (5/8) (Fig. 6a,b,c). Brachyury est exprimé dans 33 % des cas examinés (tableau II).

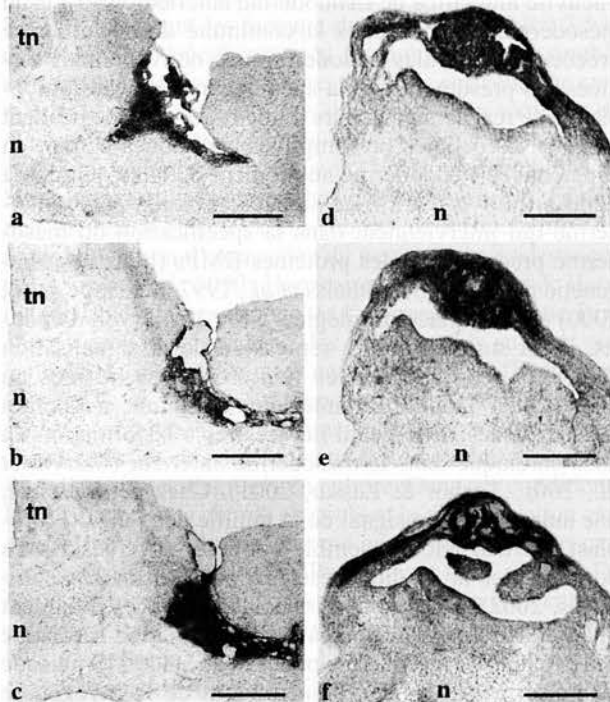


FIG. 6. – Coupes transversales sériees d'un embryon de poulet hôte de 6 jours ayant subi au stade de 14 somites, au niveau des 5 derniers somites, la greffe d'un explant d'embryon de souris de 6,5 jpc. Les cellules transplantées expriment les gènes Nkx 2.5 (a), eHAND (b) et dHAND (c). Barre d'échelle 250 μ m. La cardiogénèse dans un environnement dépourvu de tube neural (d, e, f). Coupes transversales sériees d'un embryon de poulet hôte de 6 jours ayant subi l'ablation des structures axiales et la greffe dans l'espace laissé libre par l'ablation d'un explant d'embryon de souris de 6,5 jpc. Les coupes hybridées avec les sondes Nkx 2.5 (d), eHAND (e), dHAND (f) montrent l'expression des facteurs de transcription cardiaques. n : notochorde, tn : tube neural. Barre d'échelle, 250 μ m.

TABEAU III. – Développement des cellules cardiogéniques transplantées hors influence des structures axiales.

	Greffes dans l'environnement somitique		Greffes dans le flanc ou le bourgeon de membre postérieur	
	U Hôte dépourvu de structures axiales (n=3)	V Hôte dépourvu de tube neural (n=4)	W Hôte normal	
			bourgeon membre (n=3)	flanc (n=3)
Nkx2.5	2/3	3/4	2/3	2/3
eHAND	2/3	3/4	2/3	2/3
dHAND	2/3	3/4	2/3	2/3

n = nombre total de greffes effectuées. Le ratio représente le nombre d'explants positifs rapporté au nombre total de cas examinés.

INFLUENCE DES STRUCTURES AXIALES SUR LA CARDIOMYOGÉNÈSE

Aux stades ES/PS et 6,5 jpc, les cellules progénitrices ne paraissent pas toujours aptes à s'engager dans un processus de cardiomyogénèse lorsqu'elles sont transplantées chez l'embryon de poulet hôte (séries S, T), bien que les marqueurs précoces tels Nkx 2.5, eHAND et dHAND soient exprimés dans 100 % des cas lorsque ces mêmes tissus sont placés en culture. Afin d'évaluer dans quelle mesure les structures axiales de l'hôte peuvent influencer la cardiogénèse des cellules greffées *in ovo*, des embryons de souris de 6,5 jpc ont été transplantés chez des embryons de poulet privés de tube neural et de notochorde (série U) ou seulement de tube neural (série V). (tableau III). 4 jours après transplantation dans l'environnement hôte dépourvu de structures axiales, l'examen des sections du greffon hybridées avec les ribosondes spécifiques de Nkx 2.5, eHAND et dHAND témoigne de l'expression de ces gènes (U, 2/3). Dans l'environnement aneural (V), 75 % (3/4) des transplants ES/PS contiennent des cellules Nkx 2.5, eHAND et dHAND positives (Figs 6d, e, f). La transplantation de progéniteurs cardiaques dans le bourgeon de membre postérieur ou le flanc résulte en l'expression de ces mêmes marqueurs dans les cellules dérivées du donneur (66 % des cas dans les deux séries). Ces données (séries U,V,W) sont identiques à celles de la série T. Lorsque des explants de 6,5 jpc sont cocultivés avec des fragments de tube neural et de notochorde ou de tube neural, les résultats sont comparables (tableau IV) à ceux obtenus lorsque ces explants sont cultivés seuls. En présence des structures axiales ou du tube neural, la spécification cardiaque a lieu dans tous les explants, comme le révèle l'apparition de battements spontanés et l'expression de Nkx 2.5, eHAND et dHAND pour chaque explant examiné. L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* suggère que des signaux émis par les tissus axiaux ne paraissent pas modifier l'activation du programme de différenciation cardiaque.

TABLEAU IV. – Influence des structures axiales sur le développement *in vitro* des explants de 6,5 jpc.

	Battements spontanés	Nkx 2.5	eHAND	dHAND
Explants de 6,5 jpc + TN et notochorde de poulet (n = 5)	5/5	3/3	1/1	1/1
Explants de 6,5 jpc + TN de poulet (n = 3)	3/3	1/1	1/1	1/1

TN, tube neural; n = nombre total de cocultures. La ration représente le nombre d'explants positifs rapporté au nombre total de cas examinés.

DISCUSSION

Notre objectif a été de préciser les étapes du développement auxquelles s'effectue l'engagement des cellules myocardiques murines. Au regard de la définition de Slack (1991), deux niveaux d'engagement doivent être distingués. Le premier caractérise les cellules dites spécifiques c'est-à-dire capables de se différencier de façon indépendante dans un environnement neutre comme celui offert par la culture. Le deuxième est franchi lorsque les cellules deviennent réfractaires aux signaux de l'environnement, leur engagement apparaît irréversible, elles sont dites déterminées.

Les données d'Arai *et al.* (1997), obtenues suite à l'analyse par RT-PCR de l'expression de gènes cardiaques spécifiques, indiquaient que les cellules mésodermiques murines cultivées *in vitro* sont capables de s'engager dans la voie cardiaque dès 7,25 jpc. Notre étude démontre qu'elles le sont dès 6,5 jpc. A ce stade, 30-40 % des explants expriment en culture le facteur de transcription GATA 4, l' α actine cardiaque, le transgène desmine et la protéine β MHC et deviennent contractiles. Un peu plus tard (stade MS), les capacités de différenciation des progéniteurs cardiaques s'accroissent comme le montre l'augmentation concomitante du pourcentage d'explants contractiles qui en culture sont caractérisés par le gène GATA 4, l' α actine cardiaque, le transgène desmine et la β MHC.

Lorsque les cellules de 6,5 jpc sont transplantées *in ovo*, les phases terminales de l'engagement dans le lignage cardiaque ne sont jamais observées. Nos résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux de Tam *et al.* (1997) montrant que l'engagement des cellules mésodermiques dans la voie cardiaque n'est pas définitif à ce stade, puisqu'elles sont capables de fournir des dérivés mésodermiques autres que cardiaques après transplantation. C'est *in vivo* comme en culture *in vitro* un peu plus tard (stade MS) que les précurseurs cardiogéniques commencent à être déterminés dans le lignage cardiaque. Enfin, au stade LS ils présentent une cardiomyogenèse robuste, comme en témoigne en greffe la détection du facteur de transcription GATA 4, de l' α actine cardiaque, du transgène desmine. Lorsque le mésoderme au stade LS est cultivé seul, l'expression des gènes cardiaques est toujours associée à la présence d'une activité contractile. Considérés dans leur ensemble nos

résultats indiquent donc que le lignage cardiaque est spécifié dès 6,5 jpc et déterminé dès le stade LS, c'est-à-dire après l'achèvement de la gastrulation.

Chez l'embryon de poulet, selon Climent *et al.* (1995) le mésoderme précardiaque de l'oiseau s'avère incapable de se différencier lorsqu'il est cultivé en présence du feuillet ectodermique. Nous observons au contraire que la phase précoce de différenciation du mésoderme murin précardiaque caractérisé par l'expression de Nkx 2.5 et e/dHAND n'est pas inhibée par la présence du feuillet ectodermique. Le rôle joué par l'endoderme dans la différenciation cardiaque est aussi l'objet d'un désaccord. Selon Antin *et al.* (1994) puis Gannon et Bader (1995), l'endoderme ne semble pas, chez les oiseaux, nécessaire à l'expression de gènes cardiaques spécifiques. En revanche, il apparaît indispensable à la myofibrillogenèse et à l'initiation des contractions spontanées (Gannon et Bader, 1995; Yutzey *et al.*, 1995). Par contre, Schultheiss *et al.* (1995) démontrent que des cellules non cardiomyogéniques au niveau de la partie postérieure de la ligne primitive peuvent se différencier en cardiomyocytes lorsqu'elles sont cultivées en présence d'endoderme antérieur prélevé au stade post-gastrula. Selon ces auteurs, l'activité inductrice de l'endoderme antérieur vis-à-vis du mésoderme s'inscrit dans la continuité d'une influence précoce des cellules endodermiques nouvellement formées. Ils présument que la spécification des cardiomyoblastes se réaliserait au cours d'une brève période pendant laquelle les cellules présomptives cardiaques entrent en contact avec l'endoderme au moment où elles quittent la ligne primitive. Parmi les signaux produits par l'endoderme qui interviennent dans la spécification du mésoderme précardiaque, les protéines BMPs (bone morphogenetic proteins) (Schultheiss *et al.*, 1997; Schlange *et al.*, 2000) ont une place privilégiée. Chez l'embryon de poulet, il est suggéré que la répression de la signalisation Wnt, par des antagonistes tels *crescent* exprimés au niveau de l'endoderme antérieur, combinée à l'action inductrice des BMPs sont nécessaires à la formation du tissu cardiaque dans le mésoderme antérieur (Marvin *et al.*, 2001; Tzahor & Lassar, 2001). Chez cette espèce, une autre molécule signal de la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factor) semble coopérer avec les BMPs pour réguler la cardiogenèse précoce (Alsan & Schultheiss, 2002). Chez la souris, nos expériences indiquent que l'endoderme contribue à la différenciation cardiaque des explants de mésoderme prélevés au stade MS puisque la transcription des gènes spécifiques de la myogenèse cardiaque a été mise en évidence dans tous les cas associant à ce stade le mésoderme à l'endoderme. Dans ces conditions, 100 % des explants examinés présentent des contractions spontanées indiquant que les cellules progénitrices cardiaques ont atteint un niveau de différenciation terminale, tandis que le pourcentage d'explants contractiles n'est que de 38 % en l'absence d'endoderme.

Nos résultats montrent que la spécification des progéniteurs cardiaques ne dépend pas exclusivement de l'endoderme, puisque les cellules épiblastiques sont, dès 6,5 jpc, capables de fournir des cellules cardiaques en culture. On peut dès lors penser que dans notre système

de culture, les potentialités de l'épiblaste murin à former des cellules cardiaques sont liées au contact existant entre ce feuillet et l'hypoblaste, à l'image des résultats obtenus chez l'embryon de poulet. En effet il a été montré en culture que des facteurs sécrétés par l'hypoblaste tels que l'activine et/ou le TGF β peuvent potentiellement induire la myogenèse cardiaque chez cette espèce au stade pré- ou milieu de gastrula (Yatskievych *et al.*, 1997; Ladd *et al.*, 1998). Néanmoins, nous observons que l'endoderme stimule, dans la période comprise entre les stades ES/PS et MS, les cellules mésodermiques à adopter le phénotype cardiaque. Nos résultats sont donc en accord avec les données obtenues par Arai *et al.* (1997) impliquant l'endoderme dans la phase tardive de différenciation des cellules progénitrices en cardiomyocytes pulsatiles exprimant la chaîne lourde de myosine. A partir du stade LS, la présence de l'endoderme n'apparaît plus essentielle puisque la différenciation cardiaque se réalise dans les explants dépourvus d'endoderme placés ou en culture ou en greffe. C'est aussi ce qui se passe chez l'embryon de poulet après le stade de gastrulation (stade 6) puisque la répression des signaux émanant de l'endoderme par des antagonistes ne bloque pas la myogenèse cardiaque.

Si l'on se réfère au pourcentage d'explants (6,5 jpc et ES/PS) exprimant les facteurs de transcription Nkx 2.5 et e/dHAND, la spécification du lignage cardiaque semble effective dès 6,5 jpc en culture, toutefois ces gènes ne sont exprimés que dans 60 % des cas lorsque des explants de même stade sont transplantés *in ovo*. Ceci n'est pas dû à un effet inhibiteur des signaux de l'environnement hôte sur la formation du mésoderme puisque la présence de ce dernier est attestée par l'expression du gène Brachyury. Au regard du patron d'expression du marqueur mésodermique (Wilkinson *et al.*, 1990; Herrmann, 1991; Kispert & Herrmann, 1994), la persistance de l'expression du gène Brachyury dans nos greffons à des stades tardifs suggère que les cellules mésodermiques ne se sont pas différenciées. Climent *et al.* (1995) ont démontré que des cellules neurogéniques inhibent la différenciation des cardiomyocytes chez l'embryon de poulet lorsque ces deux types cellulaires sont dissociés et réagregés en culture. Dans ces conditions, le tube neural et la chorde empêchent la différenciation cardiaque terminale du mésoderme antéro-médian (non cardiogène) induite par les BMPs (Climent *et al.*, 1995). De façon analogue si l'application de BMP-2 *in vivo* entre la plaque neurale et le mésendoderme induit l'expression de Nkx 2.5, elle ne permet pas l'expression ectopique de la chaîne lourde de myosine (Climent *et al.*, 1995). Ces données suggèrent que l'activité inductrice cardiaque de l'endoderme antérieur et des BMPs est contrecarrée par les signaux répressifs provenant des tissus axiaux qui bloquent la cardiogenèse dans le mésoderme paraxial antérieur. L'influence inhibitrice du tube neural peut être mimée par l'administration ectopique de Wnt-3a ou Wnt-1, deux molécules exprimées par le tube neural dorsal (Tzahor & Lassar, 2001). Nous montrons que l'ablation, chez l'embryon hôte, du tube neural et de la notochorde ou du tube neural seul ne modifie pas l'expression des gènes Nkx 2.5 et e/dHAND dans les cellules murines de 6,5 jpc. Des transplantations réalisées soit dans le flanc, soit dans le

membre postérieur, nous ont conduits à la même conclusion. De plus la spécification cardiogénique observée dans les cultures de cellules murines de 6,5 jours n'est pas affectée lorsqu'elles sont en présence de cellules du tube neural. Par conséquent, le fait que les cellules greffées *in vivo* n'atteignent pas, comme elles font *in vitro*, le stade de différenciation cardiaque terminale ne peut être dû à une influence inhibitrice de la part des structures axiales de l'hôte.

En résumé, nos résultats indiquent que la spécification des cardiomyocytes débute avant le processus de gastrulation chez la Souris dans les cellules épiblastiques de 6,5 jpc. Si les signaux émis par les structures axiales paraissent ne pas avoir d'influence sur l'activation du programme de différenciation cardiaque, l'endoderme semble être nécessaire à la stabilisation dans la voie cardiaque des cellules progénitrices commises. A partir du stade tardif de la ligne primitive la détermination du lignage cardiaque est effective.

BIBLIOGRAPHIE

- Alsas B. H. & Schultheiss T. M., Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development*, 2002, 129, 1935-1943.
- Antin P. B., Taylor R. G. & Yatskievych T., Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail. *Dev. Dynamics*, 1994, 200, 144-154.
- Auda-Boucher G., Bernard B., Fontaine-Pérus J., Rouaud T., Mericksay M., Gardahaut M. F., Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors. *Dev. Biol.*, 2000, 225, 214-225.
- Arai A., Yamamoto K. & Toyama J., Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. *Dev. Dynamics* (1997) 210, 344-353.
- Climent S., Sarasa M., Villar J. M. & Murillo-Ferrol N. L., Neurogenic cells inhibit the differentiation of cardiogenic cells. *Dev. Biol.*, 1995, 171, 130-148.
- De Groot I. J. M., Lamers W. H. & Moorman A. F. M., Isomyosin expression pattern during rat heart morphogenesis: an immunohistochemical study. *Anatomical Record*, 1989, 224, 365-373.
- De Ruiter M. C., Poelmann R. E., Vanderplasdevries I., Mentik M. M. T. & Gittenbergerdegrout A. C., The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos: fusion of two heart tubes? *Anat. Embryol.*, 1992, 185, 461-473.
- Downs K. M. & Davies T., Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development*, 1993, 118, 1255-1266.
- Durocher D. & Nemer M., Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev. Genetics*, 1998, 22, 250-262.
- Evans S. M., Yan W., Murillo M. P., Ponce J. & Papalopulu N., Tinman, a Drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. *Development*, 1995, 121, 3889-3899.
- Feulgen R. & Rossenbeck H., Über denursprung flügelmuskulatur. *Experimentelle untersuchungen mit wachtel-und hühnerembryonen experientia*, 1924, 30, 1446-1449.
- Fontaine-Pérus J., Jarno V., Fournier Le Ray C., Li Z. & Paulin D., Mouse-chick chimera: a new model to study the *in ovo* developmental potentialities of mammalian somites. *Development*, 1995, 121, 1705-1718.
- Fontaine-Pérus J., Halgand P., Chéraud Y., Rouaud T., Velasco M. E., Diaz C. C. & Rieger F., Mouse-chick chimera:

- a developmental model of muring neurogenic cells. *Development*, 1997, 124, 3025-3036.
- Gannon M. & Bader D., Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm. *Development*, 1995, 121, 2439-2450.
- Garcia-Martinez V. & Schoenwolf G. C., Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev. Biol.*, 1993, 159, 706-719.
- Gonzalez-Sanchez A. & Bader D., *In vitro* analysis of cardiac progenitor cell differentiation. *Dev. Biol.*, 1990, 139, 197-209.
- Grépin C., Dagnino L., Robitaille L., Haberstroh L., Antakly T. & Nemer M., An hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol. and Cell. Biol.*, 1994, 5, 3115-3129.
- Hamburger V. & Hamilton H., A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 1951, 99, 49-92.
- Harvey R. P., Nk-2 homeobox genes and heart development. *Dev. Biol.*, 1996, 178, 203-216.
- Heikinheimo M., Scandrett J. M. & Wilson D. B., Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev. Biol.*, 1994, 164, 361-373.
- Henrique D., Adam J., Myat A., Chitnis A., Lewis J. & Ish-Horowicz D., Expression of a delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature*, 1995, 375, 787-790.
- Herrmann B. G., Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount T^{wis}/T^{wis} mutant embryos. *Development*, 1991, 113, 913-917.
- Jacobson A. G. & Sater A. K., Features of embryonic induction. *Development*, 1988, 104, 341-359.
- Kispert A. & Herrmann B. G., Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev. Biol.*, 1994, 161, 179-193.
- Kispert A., Koschorz B. & Herrmann B. G., The T protein encoded by brachyury is a tissue - specific transcription factor. *EMBO J.*, 1995, 19, 4763-4772.
- Ladd A. N., Yatskievych T. A. & Antin P. B., Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGF β and bone morphogenetic proteins. *Dev. Biol.*, 1998, 204, 407-419.
- Lawson K. A. & Pedersen R. A., Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. In « Postimplantation Development in the mouse, Ciba Foundation Symposium », 1992, 3-26, Wiley, Chichester.
- Lintz T. J., Parsons L. M., Hartly L., Lyons I. & Harvey R. P., Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*, 1993, 119, 419-431.
- Marvin M. J., Dir Rocco G., Gardiner A., Busch S. M. & Lassar A. B., Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.*, 2001, 15, 316-327.
- Mitrani E., Ziv T., Thomsen G., Shimoni Y., Melton D. A. & Bril A., Activin can induce the formation of axial structures and is expressed in the hypoblast of the chick. *Cell*, 1990, 63, 495-501.
- Montgomery M. O., Litvin J., Gonzalez-Sanchez A. & Bader D., Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev. Biol.*, 1994, 164, 63-71.
- Nascone N. & Mercola M., An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development*, 1995, 121, 515-523.
- Parameswaran I. M. & Tam P. P. L., Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Dev. Genet.*, 1995, 17, 16-28.
- Rawles M. E., The heart-forming portion of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.*, 1943, 16, 22-42.
- Sanders E. J., Hu N. & Wride M. A., Expression of TGF β 1/b3 during early chick embryo development. *Anat. Rec.*, 1994, 238, 397-406.
- Sassoon D., Garnier I. & Buckingham M., Transcripts of α -cardiac and α -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development*, 1988, 104, 155-164.
- Sassoon D., Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev. Biol.*, 1993, 156, 11-23.
- Sater A. K. & Jacobson A. G., The specification of heart mesoderm occurs during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*, 1989, 105, 821-830.
- Schlange T., Andree B., Arnold H. & Brand T., BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech. Dev.*, 2000, 91, 259-270.
- Schultheiss T. M., Xydas S. & Lassar A. B., Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development*, 1995, 121, 4203-4214.
- Schultheiss T. M., Burch J. B. & Lassar A. B., A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.*, 1997, 11, 451-462.
- Slack J. M. W., From egg to embryo: regional specification in early development. *Cambridge University Press.*, 1991.
- Srivasta D., Hand proteins : molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc. Med.*, 1999, 9, 11-18.
- Srivasta D., Cserjesi P. & Olson E. N., A subclass of bHLH proteins required for cardiogenesis. *Science*, 1995, 270, 1995-1999.
- Srivasta D., Thomas T., Lin Q., Kirby M. L., Brown D. & Olson E. N., Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor dHAND. *Nat. Genet.*, 1997, 16, 154-160.
- Stalberg H. & De Hann R. L., The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 1969, 19, 128-159.
- Sugi Y. & Lough J., Anterior endoderm is specific effector of terminal cardiac myocyte differentiation of cells from the embryonic heart forming region. *Dev. Dyn.*, 1994, 200, 155-162.
- Tam P. P. L., Parameswaran M., Kinder S. J. & Weinberger R. P., The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development*, 1997, 124, 1631-1642.
- Tzahor E. & Lassar A. B., Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Gen. Dev.*, 2000, 15, 255-260.
- Wilkinson D. G., Bhatt S. & Herrmann B. G., Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature*, 1990, 343, 657-659.
- Yatskievych T. A., Ladd A. N. & Antin P. B., Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblasts: The role of the hypoblast and activin. *Development*, 1997, 124, 2561-2570.
- Yutzey K. E., Maureen G. & Bader, D., Diversification of cardiomyogenic cell lineages *in vitro*. *Dev. Biol.*, 1995, 170, 531-541.