

## La Souris comme modèle d'étude de la morphogenèse du cœur chez les Mammifères : croissance et lignage des myocytes

par Sigolène Meilhac, Robert Kelly, Didier Rocancourt et Margaret Buckingham

CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75015 Paris.  
email : margab@pasteur.fr, meilhac@pasteur.fr. Tél 01 45 68 84 77. Fax 01 40 61 34 52.

Reçu le 15 janvier 2003

### RÉSUMÉ

Par analyse clonale rétrospective basée sur le traqueur génétique *nlaacZ*, nous avons obtenu des clones aléatoires, observés à différents stades de développement du myocarde murin. La distribution de ces clones en amas suggère pour la première fois, que les cellules destinées à former le myocarde suivent deux phases de croissance. La première phase est dispersive et polarisée parallèlement à l'axe du tube cardiaque. La deuxième phase est cohérente et polarisée de façon spécifique dans différentes régions du cœur.

Ces propriétés de croissance sont corrélées à la naissance de formes géométriques. Ceci souligne que la morphogenèse du cœur est liée à des mécanismes de prolifération cellulaire contrôlée. D'autre part, la distribution des clones dans les ventricules met en évidence une ségrégation précoce des lignages des cellules des ventricules droit et gauche. Ce résultat est en accord avec l'existence de deux populations de précurseurs cardiaques, ou champs cardiaques primaire (ou postérieur) et secondaire (ou antérieur).

### SUMMARY Growth and lineage of cardiomyocytes during mouse heart morphogenesis

In order to follow cardiac precursor cells, we have adopted a retrospective clonal approach, based on the *nlaacZ* genetic label. Random clones were generated and observed at different developmental stages in murine myocardium. The distribution of these clones in clusters suggest for the first time that cells fated to form myocardium proliferate in two steps. The first growth phase, before E8.5, is dispersive and polarised along the axis of the primitive cardiac tube, contributing to its elongation. The second growth phase is coherent and polarised differentially in different cardiac subregions. Interestingly, this can be

correlated with production of geometrical forms (dilatation of a sphere, enlargement of a tube), showing the relation between heart morphogenesis and the controlled proliferation of myocardial cells. The restricted distribution of clones to the right or left ventricle was also investigated with the goal of establishing the time at which cardiac chamber identity emerges. Right and left ventricular lineages appear to segregate early, in agreement with the existence of two populations of cardiac precursors, the so-called primary (or posterior) and secondary (or anterior) heart fields.

Chez les Vertébrés, la structure du cœur varie considérablement. Le nombre de chambres cardiaques (oreillettes, ventricules) est variable : 2 chez les poissons, 3 chez les amphibiens et 4 chez les oiseaux et mammifères (Fishman & Chien, 1997). La géométrie des chambres cardiaques est variable : les ventricules de la Souris sont par exemple plus allongés que ceux de l'Homme. Ces observations suggèrent que les mécanismes cellulaires qui génèrent la forme de l'organe, notamment le mode de production et d'assemblage des cellules, sont spécifiques d'un vertébré donné. Afin de mettre en évidence les mécanismes cellulaires de la morphogenèse du cœur chez la Souris, nous avons ainsi cherché à suivre les cellules du myocarde au cours du développement.

Les premières cellules précurseurs du cœur ont été identifiées dans l'épiblaste postérieur, avant la gastrulation, chez le Poulet et la Souris (Lawson *et al.*, 1991 ; Hatada & Stern, 1994). Pendant la gastrulation (E6,5), ces cellules s'invaginent à travers la ligne primitive antérieure et se séparent, dans le mésoderme, en deux régions bilatérales qui sont déplacées antérieurement (Garcia-Martinez & Schoenwolf, 1993 ; Parameswaran & Tam, 1995) (voir Fig. 1 de Zaffran *et al.* (2003) dans ce même Journal de la Société de Biologie). Ces régions se rejoignent au niveau de la poche antérieure de l'intestin. Les précurseurs se condensent et commencent à se différencier dans le croissant cardiaque (E7,5) puis s'assemblent en un tube (E8). La signalisation de la polarité droite/gauche de l'embryon induit la courbure asymétrique du tube car-

diague vers la droite (E8,5). L'expansion régionalisée du tube génère les différentes chambres cardiaques (oreillettes, ventricules), qui peuvent être distinguées dès E10,5. Au cours de la période fœtale, les chambres continuent leur expansion, notamment dans l'épaisseur. Elles sont par ailleurs connectées entre elles par des valves ou séparées par des septa (Harvey, 2002).

Chez le Poulet, plusieurs expériences de traçage cellulaire ont été conduites. Par l'observation précoce des précurseurs cardiaques, avant la formation du tube, deux conclusions divergentes ont été tirées : (1) la première stipule que les précurseurs du myocarde se déplacent en un feuillet cohérent et sont régionalisés dès l'épiblaste et la ligne primitive, de façon rostro-caudale, pour leurs potentialités à participer plutôt à l'oreillette ou au ventricule (Rosenquist & De Haan, 1966; Stalsberg & De Haan, 1969; Garcia-Martinez & Schoenwolf, 1993). (2) la deuxième souligne que des mouvements dispersés des précurseurs du myocarde peuvent se produire dans le mésoderme, avant la formation du croissant cardiaque et que leur régionalisation ne s'établit définitivement qu'à partir du stade du croissant cardiaque (Redkar *et al.*, 2001). Par l'observation tardive, dans le myocarde fœtal, de cellules cardiaques marquées peu après la gastrulation, des amas de 200 cellules ont été décrits dans la paroi des ventricules, organisés en fuseaux, légèrement espacés (Mikawa *et al.*, 1992a; Mikawa *et al.*, 1992b).

Chez la Souris, des expériences ponctuelles de traçage des cellules cardiaques ont été menées. Ainsi, le

devenir de certaines cellules du tube cardiaque a été mis en évidence (Franco *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2001), de même que la croissance dispersive des cellules de l'épiblaste (Lawson *et al.*, 1991; Lawson & Pedersen, 1992; Gardner & Cockcroft, 1998). Nous avons adopté une méthode d'analyse clonale plus systématique, nous permettant de marquer potentiellement tous les précurseurs du myocarde à tous les stades de développement.

## MÉTHODE : ANALYSE CLONALE AVEC LE GÈNE RAPPORTEUR *nlaacZ*

À cause du développement utérin de la souris, l'accès direct aux cellules précurseurs, en vue d'un marquage, n'est possible qu'en culture d'embryons. Or, dans les conditions techniques actuelles, les embryons de mammifères ne peuvent être cultivés que pendant une courte période. Afin de pouvoir suivre les cellules sur une plus grande durée, nous avons eu recours à un marqueur génétique, appelé *nlaacZ* (Nicolas *et al.*, 1996). Il s'agit d'un gène modifié de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne, rendu inactif par une duplication intragénique. Ce gène peut être activé à faible fréquence, de façon spontanée, par recombinaison de la duplication (Fig. 1A). Nous avons intégré *nlaacZ* dans le génome murin par ciblage au locus de l' $\alpha$ -actine cardiaque. L' $\alpha$ -actine cardiaque est en effet l'isoforme d'actine majoritairement présente dans le sarcomère des cardiomyocytes, dès le début de leur différenciation (E7,5).

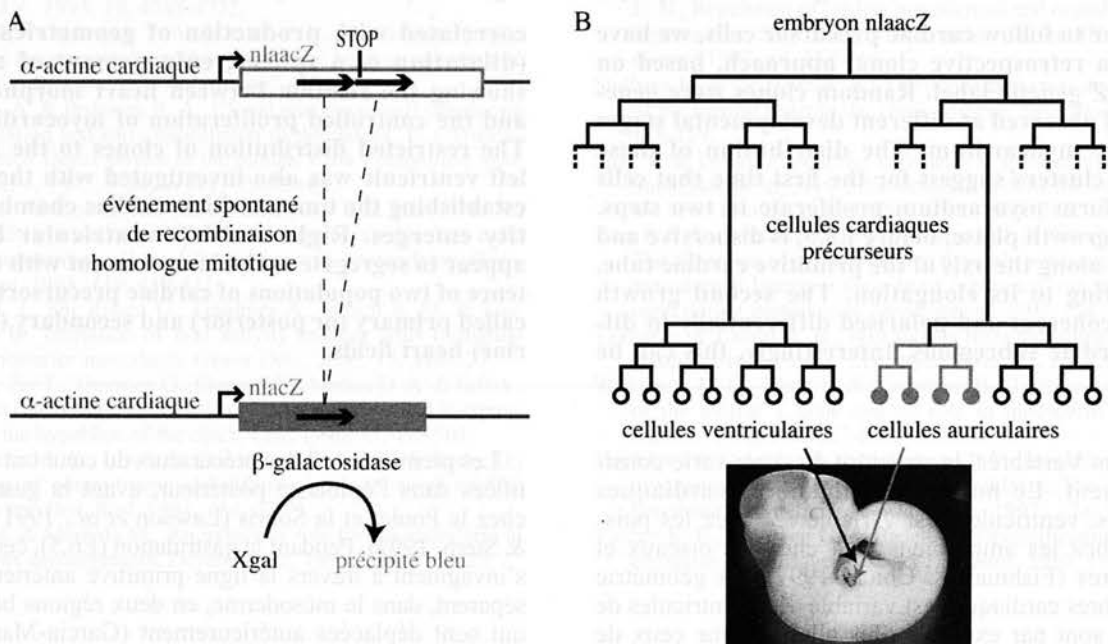


FIG. 1. — A. *NlaacZ* est un gène modifié de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne, comportant une duplication intragénique. Cette duplication change le cadre de lecture du gène, provoquant l'apparition d'un codon STOP. La protéine produite par la séquence codante tronquée est dépourvue d'activité enzymatique. Cependant, au cours des mitoses, les séquences dupliquées de *nlaacZ* sont recombinées spontanément, à faible fréquence, ce qui régénère un gène *nlaacZ* fonctionnel. *NlaacZ* est détecté par réaction histochemique, dans les cellules où son promoteur  $\alpha$ -actine cardiaque est actif, c'est-à-dire dans les cellules du myocarde. B. *NlaacZ*, intégré dans le génome murin, sert de marqueur clonal des cellules dans lesquelles il est exprimé. Dans une cellule précurseur (colorée en gris), *nlaacZ* est recombiné en *nlaacZ* et transmis de cellule-mère en cellules-filles. Si l'événement se produit tôt au cours du développement, le précurseur est dit précoce; à l'inverse il est dit tardif. Un choix aléatoire du précurseur se produit dans chaque embryon, si bien qu'avec un échantillonnage suffisamment grand d'embryons, on peut potentiellement marquer toutes les cellules précurseurs du myocarde, à tous les stades.

Nous disposons ainsi d'une lignée de souris comportant le gène rapporteur *nlaacZ* dans toutes ses cellules. Dans un petit nombre de précurseurs, *nlaacZ* est recombinaison en *nlaacZ*. Les clones issus de ces précurseurs ne seront visualisés que si leurs cellules expriment l' $\alpha$ -actine cardiaque (Fig. 1B). L'observation du nombre et de la répartition des cellules du clone nous renseigne sur les contraintes auxquelles les cellules ont été soumises pendant le temps des divisions cellulaires.

Comme l'événement de marquage des cellules est aléatoire, l'analyse est dite rétrospective : la localisation spatiotemporelle du précurseur peut seulement être estimée. L'avantage du marquage aléatoire est cependant qu'il peut potentiellement concerner tous les précurseurs du myocarde à tous les stades de développement, sans que l'expérimentateur ne biaise ce choix. L'analyse est ainsi systématique, pourvu que l'échantillon de clones observés soit suffisamment grand. Par ailleurs, l'emploi d'un marqueur génétique rend l'événement de marquage non invasif donc neutre pour la cellule et l'embryon.

Nous avons observé des clones de cardiomyocytes à différents stades de développement (voir Fig. 1 de Zafra et al. (2003) : dans le tube cardiaque à 8,5 jours après la fécondation (E8,5), le cœur embryonnaire à E10,5, le cœur fœtal à E14,5 et le cœur nouveau-né à 7 jours après la naissance (P7). Plus de 6 000 embryons, fœtus ou nouveau-nés ont été disséqués dont 1 453 comportaient des cellules à activité  $\beta$ -galactosidase (Fig. 2A).

À E8,5, la fréquence de recombinaison de *nlaacZ* en *nlaacZ* est suffisamment faible pour que, statistiquement, un seul précurseur du myocarde ait été marqué par embryon donc que l'analyse soit clonale. À E10,5, 90 % des précurseurs marqués donnent naissance à des clones de moins de 16 cellules (Fig. 2B). Ainsi, il est très probable que les événements de polyclonalité (recombinaison multiple) donnent naissance à moins de 16 cellules contaminantes. En outre, la répartition de ces polyclones sera aléatoire.

## LES CELLULES DESTINÉES À FORMER LE MYOCARDE SUIVENT DEUX PHASES DE CROISSANCE

Deux catégories de clones ont été obtenues dans le myocarde murin, à tous les stades observés (Meilhac et al., manuscrit en préparation). La première comporte un petit nombre de cellules, très proches les unes des autres, que nous nommerons amas (Fig. 3A). Dans la deuxième catégorie, les cellules sont regroupées en plusieurs amas (Fig. 3B). À cause de la faible fréquence de recombinaison à E8,5, il est statistiquement improbable que plusieurs amas à E8,5 correspondent à des événements de recombinaison distincts. En outre, les amas de la deuxième catégorie ont tendance à être plus gros que ceux de la première, ce qui suggère qu'ils sont issus de

A

|       | Nb de cœurs<br>à activité $\beta$ gal<br>(pourcentage<br>des <i>nlaacZ</i> <sup>+</sup> ) |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| E8.5  | 112 (7.5%)                                                                                |
| E10.5 | 430 (67%)                                                                                 |
| E14.5 | 595 (95%)                                                                                 |
| P7    | 316 (100%)                                                                                |

B

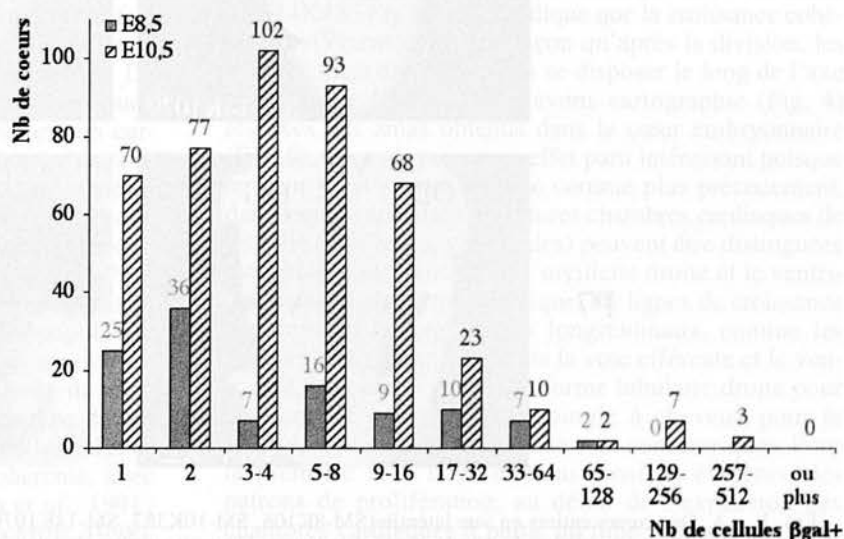


FIG. 2. — A. Échantillonnage de clones observés, exprimé, pour chaque stade, en nombre (Nb) de cœurs observés comportant des cellules à activité  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ gal). À titre d'indication de la fréquence de marquage, est donné le pourcentage de ces cœurs par rapport à la totalité des individus de la lignée *nlaacZ*, disséqués à un stade donné. B. Distribution du nombre de cellules à activité  $\beta$ -galactosidase observées par cœur embryonnaire aux stades E8,5 (barres pleines) et E10,5 (barres rayées). La faible fréquence de marquage à E8,5 ou de marquage d'un grand nombre de cellules à E10,5 indique que ces événements sont clonaux (voir texte).



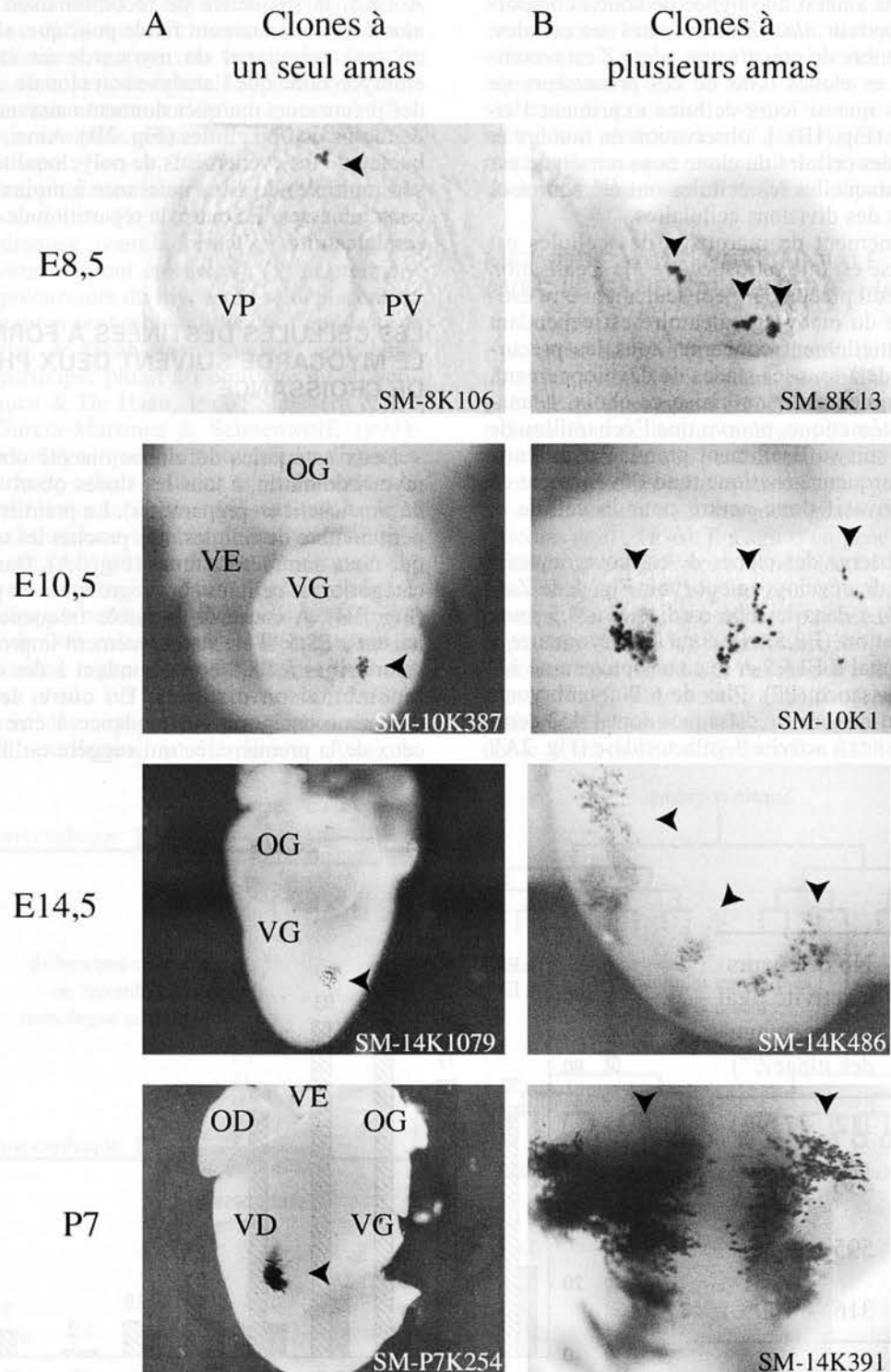


FIG. 3. — A. Des cœurs entiers en vue latérale (SM-8K106, SM-10K387, SM-14K1079) ou ventrale (SM-P7K254) sont présentés dans la colonne de gauche, aux stades de développement indiqués. Un petit nombre de leurs cellules (pointé par une flèche) est marqué par le gène *nlacZ* recombiné. Chaque point sombre correspond au noyau d'une cellule. Ces clones sont représentatifs de la phase de croissance cohérente des cellules du myocarde. OD, oreillette droite; OG, oreillette gauche; PV, pôle veineux; VE, voie éfférente; VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche; VP, ventricule primitif. B. Dans la colonne de droite des clones composés de plusieurs amas de cellules marquées (pointés chacun par une flèche) sont visibles sur des grossissements d'une région du cœur (SM-8K13 dans le pôle artériel, SM-10K1 et SM-P7K391 dans le ventricule droit et SM-14K486 dans le ventricule gauche). Les amas sont larges, proches et alignés, indiquant leur origine clonale (voir texte). Ces clones sont représentatifs de la phase de croissance dispersive des cellules du myocarde.

précurseurs différents ayant des propriétés différentes. Si plusieurs événements indépendants de recombinaison avaient eu lieu, une distribution aléatoire des amas est attendue. Au contraire, les amas de la deuxième catégorie sont proches les uns des autres et alignés. En conclusion, les amas de la deuxième catégorie sont reliés clonalement et montrent que deux phases de croissance interviennent lors de la formation du cœur : une phase de dispersion des amas et une phase de croissance cohérente à l'intérieur des amas.

Nous avons ensuite cherché à dater l'occurrence de ces phases de croissance. La première approche est de comparer le nombre de cellules par clone cohérent (un seul amas) ou dispersé (plusieurs amas). En effet, si un précurseur précoce est marqué, il subira un plus grand nombre de divisions qu'un précurseur tardif, pour un taux de prolifération constant, c'est-à-dire qu'il donnera naissance à un clone comportant un plus grand nombre de cellules. Comme à E8,5, le nombre de cellules par clone dispersé est significativement plus grand que celui par clone cohérent, il semble que la croissance dispersive caractérise des cellules plus précoces que la croissance cohérente. Une deuxième approche consiste à comparer des clones dispersés à différents stades de développement pour voir dans quel sens ils évoluent (Fig. 3B). Nous avons observé que, de E8,5 à P7, en moyenne, le nombre d'amas n'augmente pas, alors que la taille des amas augmente considérablement. Entre E8,5 et P7, les clones dispersés ont donc tendance à croître de manière cohérente, par expansion des amas, plutôt que de manière dispersive, par addition d'amas. Ainsi ces observations suggèrent que la phase de dispersion des amas précède la phase de croissance cohérente à l'intérieur des amas et que la transition se situe autour de E8,5.

Chez le Poulet, les méthodes anciennes de marquage cellulaire par greffes ont montré que si les cellules de l'endocarde se dispersaient entre la gastrulation et la formation du tube cardiaque, les cellules du myocarde se déplacent en un feuillet cohérent (Rosenquist & De Haan, 1966; Stalsberg & De Haan, 1969). Une étude plus récente de suivi en temps réel de précurseurs cardiaques marqués a cependant mis en évidence qu'ils pouvaient présenter des mouvements dispersés dans le mésoderme, avant qu'ils ne forment le croissant cardiaque (Redkar *et al.*, 2001). Nos résultats contredisent les expériences anciennes et soutiennent cette étude récente. Pour concilier ces données, il est possible que les précurseurs cardiaques dans la ligne primitive soient une population hétérogène, certains portant déjà une information de régionalisation, d'autres pas. Chaque méthode de marquage met ainsi l'accent sur l'un ou l'autre type de ces précurseurs. Chez la Souris, il est connu que les cellules de l'épiblaste croissent de manière non cohérente, avec intercalation de cellules voisines (Lawson *et al.*, 1991; Lawson & Pedersen, 1992; Gardner & Cockcroft, 1998). De même dans d'autres tissus qui s'allongent rostro-caudalement, une phase de croissance dispersive a été décrite en début d'organogenèse (Lawson & Pedersen, 1987; Lawson & Pedersen, 1991; Beddington, 1994; Nicolas *et al.*, 1996; Mathis & Nicolas, 2000; Mathis *et*

*al.*, 1999; Eloy-Trinquet & Nicolas, 2002). En accord avec ces données, nos résultats suggèrent que, chez la Souris, la plupart des précurseurs du myocarde, comme ceux d'autres structures à la même période, subissent une phase de croissance dispersive continue, depuis la gastrulation jusqu'à la formation du tube cardiaque. Des expériences de suivi en temps réel de cellules individuelles marquées, dans des embryons précoces en culture, devraient permettre de mettre en évidence le mécanisme de cette dispersion.

## LA POLARISATION DE LA CROISSANCE EST UN MÉCANISME POTENTIEL DE GENÈSE DE LA FORME DU CŒUR

Afin de caractériser la polarisation de la croissance des cellules du myocarde, nous nous sommes intéressés à la forme des clones. Dans les clones dispersés, la distribution des amas est reproductible. Ils se répartissent en effet le long d'un axe qui est parallèle à celui du tube, primitivement rostro-caudal (SM-8K13 et SM-10K1 Fig. 3). À l'extrême, les plus grands clones obtenus, vraisemblablement issus d'un précurseur précoce, contiennent des amas dispersés tout le long du tube, depuis la voie afférente jusqu'à la voie efférente (deux clones à E8,5 et un à E10,5), alors qu'ils sont restreints dans les axes perpendiculaires. Ceci suggère que la croissance dispersive est polarisée le long de l'axe rostro-caudal du tube cardiaque primitif, dans le sens de l'allongement du tube.

La polarisation de la phase cohérente a pu être abordée par l'observation des amas de cellules  $\beta$ -galactosidase positives pris individuellement. Chaque amas présente une forme allongée (par exemple ceux du clone SM-14K486 Fig. 3). Ceci indique que la croissance cohérente est orientée de telle façon qu'après la division, les cellules filles ont tendance à se disposer le long de l'axe principal de l'amas. Nous avons cartographié (Fig. 4) les axes des amas obtenus dans le cœur embryonnaire (E10,5). Ce stade nous a en effet paru intéressant puisque le cœur y est encore un tube comme plus précocement, dans lequel cependant les futures chambres cardiaques de l'adulte (oreillettes, ventricules) peuvent être distinguées morphologiquement. Dans l'oreillette droite et le ventricule gauche, de forme sphérique, les lignes de croissance apparaissent le long d'axes longitudinaux, comme les baleines d'un parapluie. Dans la voie efférente et le ventricule droit en revanche, de forme tubulaire droite pour la première ou repliée en épingle à cheveux pour le second, les lignes de croissance sont concentriques. Pour la première fois, nous mettons ainsi en évidence des patrons de prolifération, au début de l'expansion des chambres cardiaques à partir du tube précoce, qui peuvent être corrélés à la construction d'une forme (dilatation d'une sphère, élargissement d'un tube).

L'analyse de mutants comportant des chambres cardiaques hypoplastiques a également suggéré que la prolifération cellulaire intervient dans la formation des

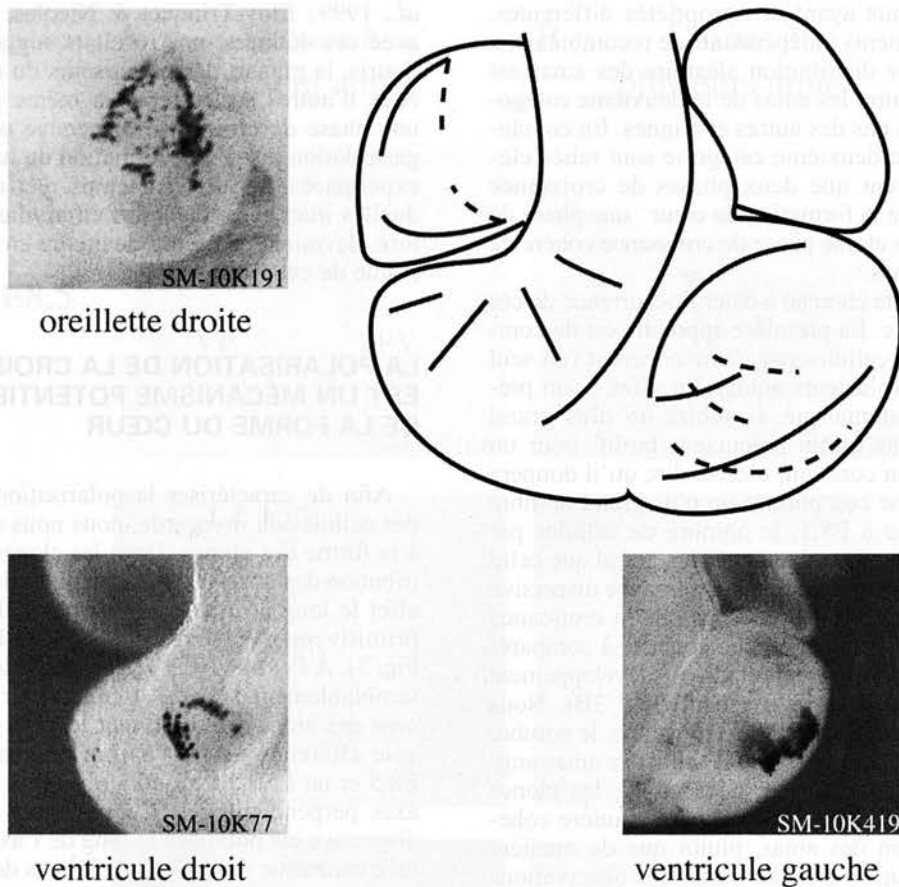


FIG. 4. – Représentation schématique d'un cœur embryonnaire (E10,5) dans lequel sont dessinées les lignes de croissance préférentielle des amas (lignes continues dans la surface au-dessus du plan, lignes discontinues au-dessous). La croissance dans chaque région est illustrée par un exemple photographié. OD, oreillette droite; OG, oreillette gauche; VE, voie efférente; VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche.

chambres cardiaques (Chen *et al.*, 2002), de même que l'effet sur l'expansion des chambres cardiaques de facteurs de croissance en culture d'embryons de souris (Hertig *et al.*, 1999). Notons cependant que d'autres mécanismes d'expansion des chambres cardiaques ont été proposés précédemment, comme la tension générée par sécrétion de gelée cardiaque (Manasek, 1983) ou la transdifférenciation de cellules (de Jong *et al.*, 1997). Un modèle d'expansion des chambres cardiaques au niveau de la courbure externe (ou ventrale) du tube cardiaque a été proposé, à partir de l'observation de la régionalisation de l'expression transcriptionnelle de gènes cardiaques (Christoffels *et al.*, 2000).

### À LA FRONTIÈRE DES VENTRICULES

Par les méthodes de traçage cellulaire, la question de la régionalisation des précurseurs peut être abordée. Ainsi les ventricules droit et gauche de l'adulte ont une identité distincte pour leur physiologie (activité contrac-

tile), leur structure (épaisseur de la paroi) et leur expression moléculaire (Zaffran *et al.* (2003)). Nous avons également mis en évidence leurs propriétés distinctes de polarisation lors de la phase de croissance cohérente (Fig. 4). Se pose alors la question de savoir si cette identité est présente d'emblée dans les précurseurs cardiaques.

Les ventricules ne peuvent être clairement distingués morphologiquement qu'à partir de E9,5. Pour caractériser la régionalisation des précurseurs des amas, nous avons observé la géométrie des amas à la jonction entre les ventricules à E10,5 (Fig. 5A). Grands ou petits, ces amas apparaissent fortement polarisés dans le sens du futur septum interventriculaire. Ceci les empêche de traverser la jonction interventriculaire. Ainsi lorsque la phase de croissance cohérente commence, les cellules semblent déjà restreintes à participer à l'un ou l'autre des ventricules. Par ailleurs, le chevauchement d'amas de l'un et l'autre ventricule, issus de deux embryons distincts (par exemple les deux plus grands amas gris clair et foncé (Fig. 5A)) suggère que la restriction clonale ne



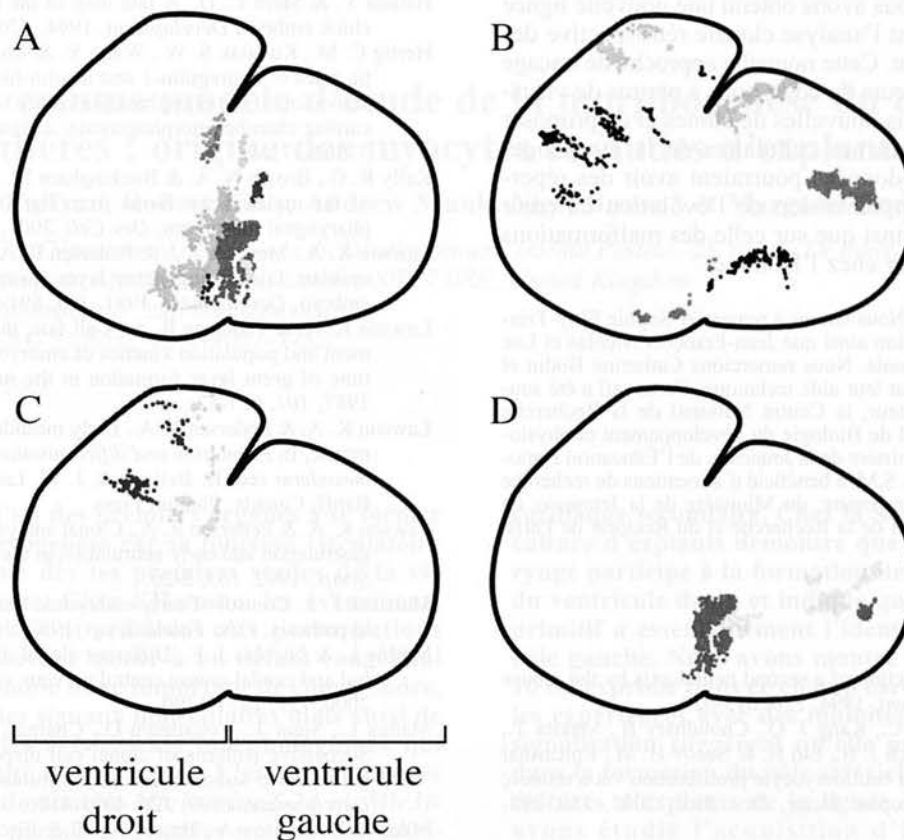


FIG. 5. – Représentation schématique des clones obtenus dans les ventricules, en vue postérieure d'un cœur embryonnaire (E10,5) : amas cohérents dans la région interventriculaire (A) ; clones dispersés colonisant les deux ventricules (B) ; clones dispersés colonisant uniquement le ventricule droit (C) ou gauche (D). Chaque couleur indique un clone distinct.

s'établit pas de part et d'autre d'une frontière linéaire mais plutôt dans une région de transition.

Afin de chercher plus précocement des précurseurs communs aux deux ventricules, nous avons observé la régionalisation des clones dispersés à E10,5. Nous avons montré qu'à E8,5, il existe une classe de clones dont les amas sont clonalement reliés, ce qui implique l'existence de cette classe à E10,5. À E10,5, 94 % des amas ont moins de 16 cellules. Nous avons exclu ces amas de notre analyse, car ils sont très probablement issus d'un précurseur marqué entre E8,5 et E10,5 et nous ne pouvons pas les relier clonalement au reste des cellules  $\beta$ -galactosidase positives. Nous considérons en revanche qu'à E10,5, des amas grands, proches et alignés sont très probablement issus d'un même précurseur.

Trois types de clones dispersés sont observés à E10,5 : certains colonisent les deux ventricules (Fig. 5B), et d'autres seulement le ventricule droit (Fig. 5C) ou gauche (Fig. 5D). Or, le premier type de clone comporte un nombre de cellules significativement plus grand que les deux autres, ce qui suggère qu'il est issu d'un pré-

curseur plus précoce. Ainsi, il semble exister précocement des précurseurs communs aux deux ventricules. Cependant, puisqu'il existe des amas dispersés restreints à un seul des ventricules, alors déjà pendant la phase dispersive, les précurseurs cardiaques semblent acquérir une identité de ventricule droit ou gauche.

Les expériences précédentes cherchant à mettre en évidence la régionalisation des précurseurs du myocarde cherchaient à mettre en évidence l'origine des identités oreillette et ventricule (Rosenquist & De Haan, 1966 ; Stalsberg & De Haan, 1969 ; Garcia-Martinez & Schoenwolf, 1993). Depuis qu'il a été découvert récemment que les cellules participant au tube cardiaque proviennent de deux champs distincts, primaire et secondaire (ou antérieur) (Zaffran *et al.*, 2003) se rencontrant dans la région interventriculaire, la question de l'origine de la ségrégation des lignages cellulaires de chacun des deux ventricules est devenue majeure. Nos résultats suggèrent ainsi que ces deux populations cellulaires divergent tôt, pendant la phase dispersive, mais qu'elles partagent une origine précoce commune.

En conclusion, nous avons obtenu une nouvelle lignée de souris, permettant l'analyse clonale rétrospective des cellules du myocarde. Cette nouvelle approche de traçage des cellules précurseurs du cœur nous a permis de visualiser des distributions nouvelles de clones et de proposer de nouveaux mécanismes cellulaires de la morphogénèse du cœur. Ces données pourraient avoir des répercussions sur la compréhension de l'évolution du cœur chez les vertébrés ainsi que sur celle des malformations congénitales du cœur chez l'Homme.

**Remerciements.** – Nous tenons à remercier Sophie Eloy-Trinquet pour sa collaboration ainsi que Jean-François Nicolas et Luc Mathis pour leurs conseils. Nous remercions Catherine Bodin et Emmanuel Pecnard pour leur aide technique. Ce travail a été soutenu par l'Institut Pasteur, le Centre National de la Recherche Scientifique et une ACI de Biologie du développement et physiologie intégrative du Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche. S.M. a bénéficié d'allocations de recherche de l'École Normale Supérieure, du Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche et du Rectorat de Paris.

## BIBLIOGRAPHIE

- Beddington R. S., Induction of a second neural axis by the mouse node, *Development*, 1994, 120, 613-620.
- Chen T. H., Chang T. C., Kang J. O., Choudhary B., Makita T., Tran C. M., Burch J. B., Eid H. & Sucov H. M., Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor, *Dev. Biol.*, 2002, 250, 198-207.
- Christoffels V. M., Habets P. E., Franco D., Campione M., de Jong F., Lamers W. H., Bao Z. Z., Palmer S., Biben C., Harvey R. P. *et al.*, Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart, *Dev. Biol.*, 2000, 223, 266-278.
- de Jong F., Viragh S. & Moorman A. F., Cardiac development: a morphologically integrated molecular approach, *Cardiol. Young*, 1997, 7, 131-146.
- Eloy-Trinquet S. & Nicolas J. F., Cell coherence during production of the presomitic mesoderm and somitogenesis in the mouse embryo, *Development*, 2002, 129, 3609-3619.
- Fishman M. C. & Chien K. R., Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions, *Development*, 1997, 124, 2099-2117.
- Franco D., Kelly R., Moorman A. F., Lamers W. H., Buckingham M. & Brown N. A., MLC3F transgene expression in iv mutant mice reveals the importance of left-right signaling pathways for the acquisition of left and right atrial but not ventricular compartment identity, *Dev. Dyn.*, 2001, 221, 206-215.
- Garcia-Martinez V. & Schoenwolf G. C., Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos, *Dev. Biol.*, 1993, 159, 706-719.
- Gardner R. L. & Cockcroft D. L., Complete dissipation of coherent clonal growth occurs before gastrulation in mouse epiblast, *Development*, 1998, 125, 2397-2402.
- Harvey R. P., Organogenesis: Patterning the vertebrate heart, *Nat. Rev. Genet.*, 2002, 3, 544-556.
- Hatada Y. & Stern C. D., A fate map of the epiblast of the early chick embryo, *Development*, 1994, 120, 2879-2889.
- Hertig C. M., Kubalak S. W., Wang Y. & Chien K. R., Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 37362-37369.
- Kelly R. G., Brown N. A. & Buckingham M. E., The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm, *Dev Cell*, 2001, 1, 435-440.
- Lawson K. A., Meneses J. J. & Pedersen R. A., Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo, *Development*, 1991, 113, 891-911.
- Lawson K. A. & Pedersen R. A., Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse, *Development*, 1987, 101, 627-52.
- Lawson K. A. & Pedersen R. A., Early mesoderm formation in the mouse, In *Formation and differentiation of early embryonic mesoderm* (ed. R. Bellairs & J. W. Lash), 1991, pp. 1-14, Banff, Canada: Plenum Press.
- Lawson K. A. & Pedersen R. A., Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse, *Ciba Found Symp.*, 1992, 165, 3-26.
- Manasek F. J., Control of early embryonic heart morphogenesis: a hypothesis, *Ciba Found Symp.*, 1983, 100, 4-19.
- Mathis L. & Nicolas J. F., Different clonal dispersion in the rostral and caudal mouse central nervous system, *Development*, 2000, 127, 1277-1290.
- Mathis L., Sieur J., Voiculescu O., Charnay P. & Nicolas J. F., Successive patterns of clonal cell dispersion in relation to neuromeric subdivision in the mouse neuroepithelium, *Development*, 1999, 126, 4095-4106.
- Mikawa T., Borisov A., Brown A. M. & Fischman D. A., Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus: I. Formation of the ventricular myocardium, *Dev. Dyn.*, 1992a, 193, 11-23.
- Mikawa T., Cohen-Gould L. & Fischman D. A., Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus. III: Polyclonal origin of adjacent ventricular myocytes, *Dev. Dyn.*, 1992b, 195, 133-141.
- Nicolas J. F., Mathis L., Bonnerot C. & Saurin W., Evidence in the mouse for self-renewing stem cells in the formation of a segmented longitudinal structure, the myotome, *Development*, 1996, 122, 2933-2946.
- Parameswaran M. & Tam P. P., Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation, *Dev. Genet.*, 1995, 17, 16-28.
- Redkar A., Montgomery M. & Litvin J., Fate map of early avian cardiac progenitor cells, *Development*, 2001, 128, 2269-2279.
- Rosenquist G. C. & De Haan R. L., Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study, *Contributions to embryology*, 1966, 263, 111-121.
- Stalsberg H. & De Haan R. L., The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo, *Dev. Biol.*, 1969, 19, 128-159.
- Zaffran S., Kelly R., Munk A., Brown N. & Buckingham M., La souris comme modèle d'étude de la morphogénèse du cœur chez les mammifères : origine des myocytes et sondes d'explants cardiaques. *Journal de la Société de Biologie*, 2003, 197, 185-192.