

La Souris comme modèle d'étude de la morphogenèse du cœur chez les mammifères : origine des myocytes et études d'explants cardiaques

par Stéphane Zaffran, Robert Kelly, Andrew Munk, Nigel Brown* et Margaret Buckingham

* CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, Paris, 75015 France.

* St. George's Hospital Medical School, London SW17 0RE, United Kingdom.

Email : margab@pasteur.fr, zaffrans@pasteur.fr

Tel : 33-1-4568-8477 ; Fax : 33-1-4061-3452.

Reçu le 15 janvier 2003

RÉSUMÉ

Le cœur est l'un des premiers organes à se former pendant l'embryogenèse car sa fonction circulatoire est indispensable dès les premiers stades de la vie post-implantatoire. Chez l'Homme, les événements morphologiques sont sensibles aux perturbations moléculaires pouvant mener à un défaut congénital cardiaque. Il semble donc important de comprendre, non seulement les signaux moléculaires mais aussi de mieux définir les événements morphologiques qui régulent l'identité des myocytes. L'étude des lignées transgéniques de souris, *Mlc1v-nlacZ-24* et *Mlc3f-nlacZ-2*, nous a permis d'identifier un nouveau territoire précardiaque, « le champ cardiaque antérieur », qui contribue au pôle artériel du cœur. Récemment, des expériences de marquage chez le Poulet viennent de mettre aussi en évidence l'existence de ce champ

cardiaque secondaire. Chez la Souris, l'utilisation de culture d'explants démontre que le mésoderme pharyngé participe à la formation de la voie efférente et du ventricule droit, et indique que le tube cardiaque primitif a essentiellement l'identité du futur ventricule gauche. Nous avons montré que le facteur Fgf-10 est exprimé dans ce champ cardiaque antérieur, et les expériences avec des inhibiteurs de cette voie de signalisation suggèrent qu'elle puisse jouer un rôle dans la formation du pôle artériel. Enfin, à partir des cultures d'explants de la lignée *Mlc3f-nlacZ-2* nous avons étudié l'acquisition d'identité des deux oreillettes. Nous montrons que la fenêtre de temps nécessaire à la réception du signal d'asymétrie droite-gauche est comprise entre le stade quatre et six somites de développement.

SUMMARY The mouse as model for understanding heart morphogenesis in mammals: The origin of myocytes and studies with cardiac explants

The heart is one of the first organs to form during embryogenesis since its circulatory function is critical from early stages for embryo survival. In man, morphological events are affected by molecular perturbations, which can lead to a congenital heart defect. It is important therefore to understand not only the molecular signals, but also the morphological events, which govern myocardial cell identity. The study of transgenic mouse lines, *Mlc1v-nlacZ-24* and *Mlc3f-nlacZ-2*, has led to the identification of a new precardiac territory, the anterior heart field, which has also been described recently in birds, and which contributes to the myocardium of the arterial pole of the

heart. The use of explant cultures also indicates that pharyngeal mesoderm participates in the formation of the outflow tract and right ventricle and shows that the primitive heart tube has a predominantly left ventricular identity. We have also shown that Fgf-10 is expressed in the anterior heart field, where a role for FGF signaling in arterial pole morphogenesis is suggested by inhibitor experiments. Finally explant cultures have been employed to examine the acquisition of left-right atrial identity. The *Mlc3f-nlacZ-2* line, which marks the right atrium, allowed us to determine the time window during which left-right signaling confers left-right atrial identity.

INTRODUCTION

Le développement du cœur chez les vertébrés implique des événements morphogénétiques complexes qui se déroulent de manière ordonnée et régulée dans le

temps et l'espace. Cette morphogenèse inclut des événements comme la spécification, la différenciation ou la migration de types cellulaires différents. L'absence ou la malformation d'une des structures du cœur au cours du développement entraînent des pathologies congénitales

avec une incidence de 1 % des naissances chez l'Homme (jusqu'à 10 % de toutes les conceptions), ce qui en fait la première des malformations congénitales (Hoffman, 1995; Srivastava & Olson, 2000). Les maladies cardiaques qui se déclarent plus tard chez l'adulte peuvent, dans certains cas, avoir leurs origines dans des anoma-

lies développementales moins sérieuses. Il est maintenant bien démontré que le modèle murin fournit un très bon système d'étude du développement cardiaque chez les mammifères car la plupart des malformations décrites chez l'Homme y ont été retrouvées (Srivastava & Olson, 2000).

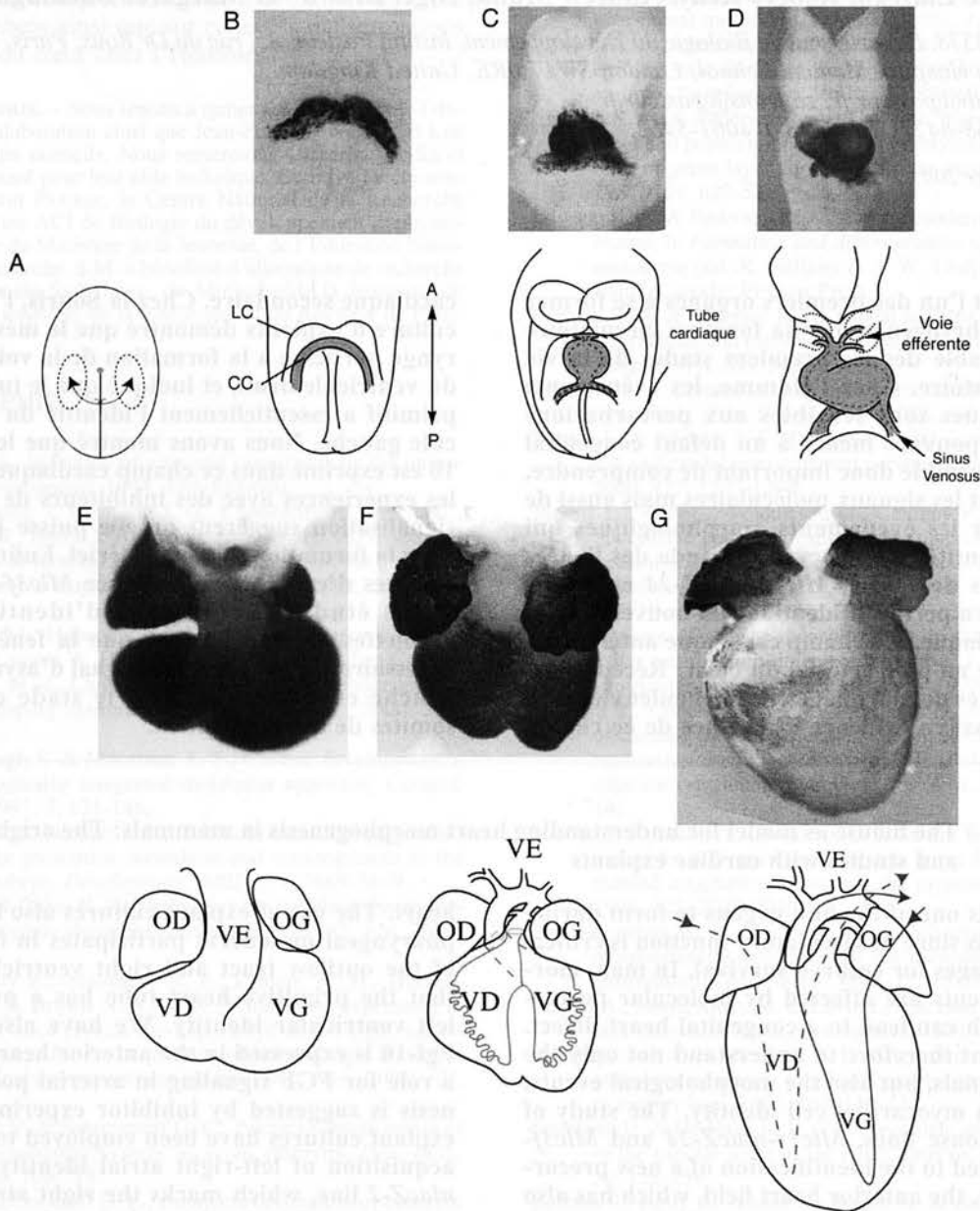


FIG. 1. – Principales étapes de la morphogénèse du cœur chez la Souris. Tous les embryons ou cœurs colorés proviennent de la lignée transgénique *Mlc3f-nlacZ-9*. (A) Lors de la gastrulation, 6,5 jours après la fécondation, les précurseurs des cellules cardiaques sont invaginés au niveau de la ligne primitive antérieure puis déplacés rostralement (flèches) au niveau de deux régions bilatérales. (B) Stade du croissant cardiaque (4 somites). Vue ventrale d'un embryon de souris au septième jour de développement montrant le croissant cardiaque (CC, en gris) dans la région antérieure du mésoderme latéral. A, antérieur; P, Postérieur; LC, Lobes céphaliques. (C) Stade du tube cardiaque linéaire (6 somites). Vue ventrale d'un embryon au huitième jour de développement. (D) Stade de l'inflexion du tube cardiaque. Vue ventrale d'un embryon âgé de 8,75 jours, montrant le tube cardiaque tourné vers sa droite. (E) À 10,5 jours après la fécondation, les chambres cardiaques sont identifiables dans le cœur embryonnaire. OD, oreillette droite; OG, oreillette gauche; VE, voie efférente; VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche. (F) Dans le cœur fœtal, à 14,5 jours après la fécondation, les parois des chambres cardiaques sont épaissies par des trabéculations (traits gris) et les chambres cardiaques sont séparées par des septa et des valves. (G) Dans le cœur nouveau-né, 7 jours après la naissance, le flux de sang carboné (trait pointillé) est complètement séparé de celui du sang oxygéné (trait plein).

Le cœur des mammifères et des oiseaux se forme à partir des cellules précardiogéniques du mésoderme antérieur et latéral (DeHaan & Ursprung, 1965). Les expériences de culture d'explant chez le Poulet et la Caille indiquent que la spécification des cardiomyocytes a lieu juste avant la formation du croissant cardiaque (Montgomery *et al.*, 1994; Yatskiyevych *et al.*, 1997). Après leur spécification, les précurseurs des cardiomyocytes prolifèrent et se condensent pour donner un épithélium en forme de croissant de part et d'autre de la ligne médiane de l'embryon (Fig. 1B). Récemment, des expériences chez la Souris ont mis en évidence une nouvelle population de précurseurs de cardiomyocytes située médialement par rapport au croissant cardiaque, qui participerait à la formation du pôle artériel du cœur (pour revue voir Kelly & Buckingham, 2002). Cette région est nommée le champ cardiaque antérieur ou secondaire en référence au champ cardiaque primaire qui constitue le croissant cardiaque. La convergence puis la fusion des deux demi-croissants cardiaques au niveau de la ligne médiane ventrale de l'embryon donne naissance au tube cardiaque primitif avec deux pôles séparés, la voie afférente (ou veineux) et la voie efférente (ou artériel) (Fig. 1C). Très rapidement, ce tube se courbe vers la droite, établissant ainsi la première asymétrie morphologique droite-gauche de l'embryon (Fig. 1D). En effet, alors que les domaines des futurs ventricules droit et gauche étaient orientés le long de l'axe antéro-postérieur, ils se retrouvent à côté l'un de l'autre (Fig. 1D, E). Après maturation, ce tube cardiaque ainsi courbé formera les quatre chambres cardiaques : deux oreillettes et deux ventricules (Harvey, 1998a). Chez la Souris, à la fin du dixième jour, tous les compartiments du cœur embryonnaire sont en place, mais les composants restent essentiellement disposés en série : le canal auriculo-ventriculaire connecte l'oreillette commune au futur ventricule gauche, et la voie efférente est reliée au ventricule droit. Un septum musculaire apparaît entre les ventricules gauche et droit, de l'apex du cœur vers sa base (Fig. 1F). La migration des cellules de la crête neurale contribue à la formation du septum de la voie efférente du cœur qui formera les gros vaisseaux et les branches aortiques (Kirby *et al.*, 1983). Plus tard, la formation des valves cardiaques a lieu à partir de la migration interne des cellules endothéliales cardiaques. La maturation du myocarde est marquée par un épaississement et l'apparition de saillies de myocarde, les trabécules, sur la surface endocardique. Enfin, le système de conduction électrique du cœur (incluant les fibres de Purkinje) dérive des cardiomyocytes eux-mêmes. À la naissance, la fermeture des septa auriculaires et du canal artériel sépare les circulations pulmonaire et systémique, isolant les deux circuits parallèles nécessaires à la vie après la naissance (Fig. 1G).

Les études faites chez le Poulet et la Souris ont mis en évidence l'existence de signaux inductifs venant de l'endoderme pour la spécification des précurseurs cardiaques (pour revue voir Harvey, 2002; Zaffran & Frasch, 2002). Brièvement, les signaux BMP et Fgf venant de l'endoderme induisent l'expression des gènes

de différenciation cardiaque, *Nkx2.5* ou *GATA-4* (Lough *et al.*, 1996; Rossant *et al.*, 1997). L'activation de ces facteurs cardiaques est restreinte au territoire précardiaque du mésoderme latéral sous l'effet négatif des facteurs Wnt3 et Wnt8 qui sont sécrétés par l'ectoderme (Schneider & Mercola, 2001; Tzahor & Lassar, 2001). Le gène à homéoboîte, *Nkx2.5* est le premier à être exprimé dans le territoire précardiaque (Komuro & Izumo, 1993; Lints *et al.*, 1993). Ensuite, *Nkx2.5* active avec d'autres facteurs de transcription cardiaques (*GATA-4*, *Mef-2*) les gènes de différenciation tel que l' α -actine cardiaque (Ross *et al.*, 1996).

L'identification des nouveaux facteurs de transcription, *Hand*, *Irx-4* et *Tbx-5*, a apporté la preuve que certains des facteurs cardiaques précoces sont exprimés de manière différentielle dans le cœur (Bruneau *et al.*, 2001; Bruneau *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1997). En effet, le gène à homéoboîte *Irx-4* est exprimé spécifiquement dans le territoire des futurs ventricules, tandis que *Tbx-5* est exclu de la partie antérieure du tube cardiaque qui donnera naissance au sac aortique et au ventricule droit (Bruneau *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 1999). Ces facteurs de transcription jouent un rôle dans la régionalisation du tube cardiaque primitif puisque leur perte de fonction entraîne une absence de l'identité moléculaire des ventricules (Bao *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent une régionalisation du tube cardiaque au cours de sa formation.

La découverte de ces facteurs cardiaques représente une avancée importante. Néanmoins nous ne comprenons toujours pas comment la régulation moléculaire qu'ils exercent se traduit en termes cellulaires. Notre laboratoire a développé différentes stratégies pour aborder les questions sur l'origine embryonnaire des compartiments cardiaques et sur la mise en place de l'identité cellulaire qui les caractérise. Ainsi, nous discuterons successivement de la découverte du deuxième champ cardiaque antérieur et de l'acquisition de l'asymétrie droite-gauche au niveau des futures oreillettes, en s'appuyant sur l'emploi expérimental des explants cardiaques.

RÉSULTATS

L'origine du champ cardiaque antérieur

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le tube cardiaque composé des deux pôles veineux et artériel, semble être à l'origine des différents compartiments qui forment le cœur mature. Mais des études menées chez le Poulet et la Souris mettant en évidence l'existence d'un deuxième champ cardiaque appelé antérieur, ont changé cette vision simpliste (Kelly *et al.*, 2001; Mjaatvedt *et al.*, 2001; Waldo *et al.*, 2001). Chez la Souris, cette découverte a été rendue possible en étudiant une lignée de souris transgéniques, générée dans le contexte de l'analyse du promoteur *Mlc1v* dans le muscle



squelettique (Jerkovic *et al.*, 1997), qui exprime la β -galactosidase dans le pôle artériel du cœur (le ventricule droit et la voie efférente) et le mésoderme pharyngé avoisinant (Fig. 2A et 3B). Le profil d'expression du transgène *Mlc1v-nlacZ-24* est partiellement complémentaire de celui du transgène *Mlc3f-nlacZ-9* qui marque le myocarde à l'exception du pôle artériel (Fig. 2A et 3D). L'expression dans le mésoderme pharyngé au cours de l'élongation du tube cardiaque est très dynamique. Elle pourrait correspondre à l'activation de ce transgène dans des cellules précurseurs des cardiomyocytes du pôle artériel. Par marquage avec le colorant, DiI, des embryons mis en culture, nous avons pu mettre en évidence un mouvement continu des cellules du mésoderme pharyngé vers le pôle artériel du cœur entre le huitième et le dixième jour du développement, et montré qu'il ne s'agit pas de cellules de la crête neurale (Kelly *et al.*, 2001). L'expression de *nlacZ* dans cette région est ectopique

puisqu'elle n'est pas observée dans les autres lignées porteuses du même transgène : elle pourrait donc être due à sa localisation près d'un élément régulateur d'un gène impliqué dans la morphogenèse du pôle artériel.

Le site d'intégration du transgène *Mlc1v-nlacZ-24* est situé en amont du gène codant pour le facteur de croissance *Fgf-10* (Kelly *et al.*, 2001). *Fgf-10* est un bon gène candidat, puisque le signal Fgf a déjà été identifié comme nécessaire à l'induction du mésoderme précardiaque et que, chez le zebrafish, *Fgf8* est nécessaire à la formation du ventricule (Reifers *et al.*, 2000). Comme le transgène *Mlc1v-nlacZ-24*, *Fgf-10* est exprimé dans une région du mésoderme antérieur médiale au croissant cardiaque (Fig. 2B). L'expression du transgène est ensuite observée dans le mésoderme pharyngé et les cellules épithéliales qui forment la paroi dorsale de la cavité péricardique. Ces cellules sont continues avec le pôle artériel du cœur (Kelly *et al.*, 2001). À jour 9,5 du développement, la voie effé-

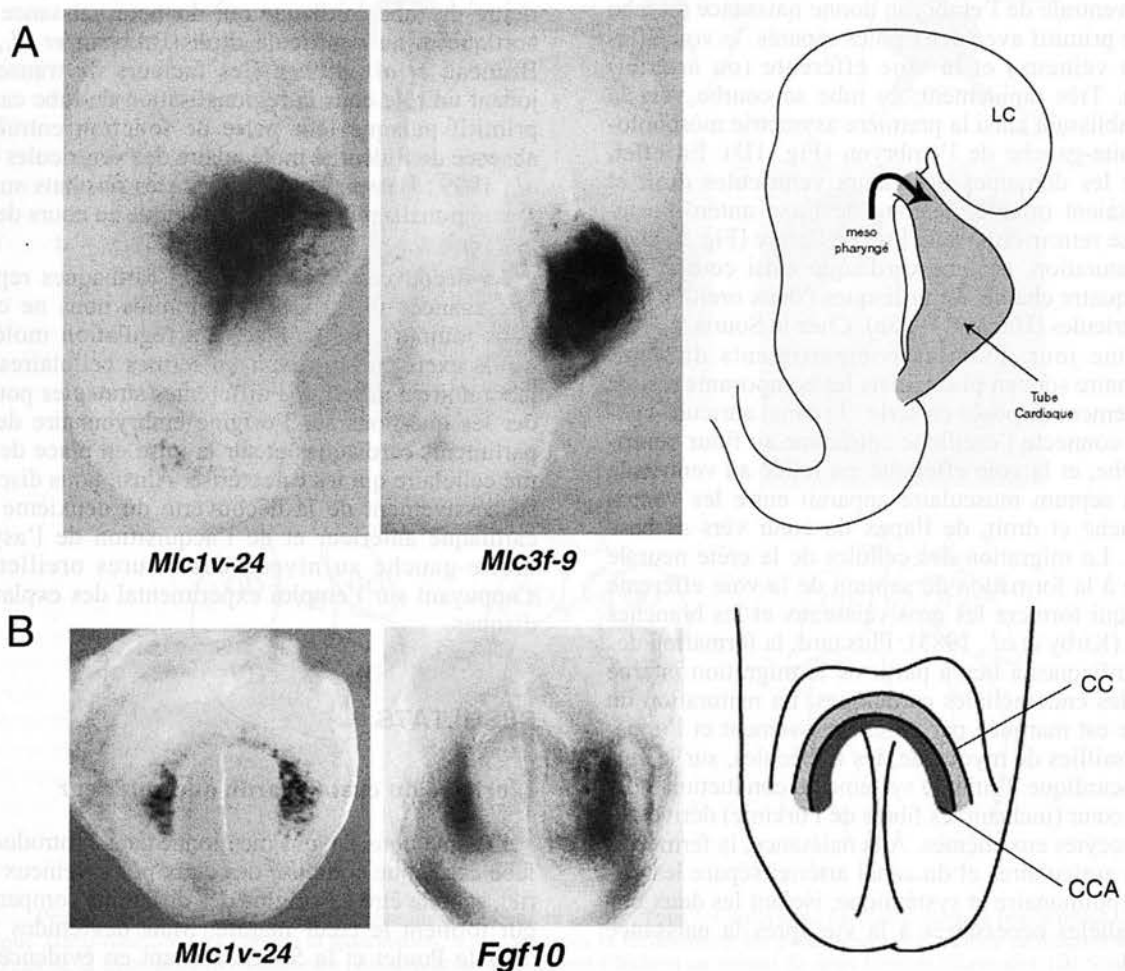


FIG. 2. – Deux populations contribuent à la formation du cœur. (A) Comparaison des domaines d'expression de la β -galactosidase des lignées transgéniques *Mlc1v-nlacZ-24* et *Mlc3f-nlacZ-9*. Vue latérale d'embryons âgés de 8 jours. Le schéma représente le modèle que nous proposons, avec une participation du mésoderme pharyngé dans la formation du tube cardiaque. (B) Comparaison de l'expression de la β -galactosidase de lignée *Mlc1v-nlacZ-24* et du mRNA, *Fgf-10*. Vue ventrale d'embryons âgés de 7,5 jours. Les deux domaines d'expression définissent un nouveau champ cardiaque, nommé champ cardiaque antérieur. Ce champ cardiaque antérieur est médial au croissant cardiaque. Le schéma représente la position des deux champs cardiaques, CC : croissant cardiaque ; CCA : champ cardiaque antérieur.

rente elle-même est marquée par la β -galactosidase, mais les transcrits *Fgf-10* et *lacZ* n'y sont pas détectés, ce qui suggère que ces cellules sont originaires d'une région où le transgène et *Fgf-10* sont transcrits à un haut niveau, la stabilité de la β -galactosidase expliquant sa perdurance dans le myocarde (Kelly *et al.*, 2001). La découverte de l'expression de *Fgf-10* dans le champ cardiaque antérieur de souris suggère que ce facteur puisse jouer un rôle dans le contrôle de la migration de ces cellules lors de la formation du tube cardiaque. Nous étudions actuellement le rôle que peut en effet jouer le signal Fgf, en utilisant des inhibiteurs spécifiques de la voie Fgf, qui perturbent la formation du pôle artériel du cœur quand les embryons sont mis en leur présence. Nous analysons en détail la morphologie cardiaque des souris portant une délétion du locus *Fgf-10* (Sekine *et al.*, 1999).

Ces résultats nous ont permis d'établir un modèle de formation du pôle artériel du cœur dans lequel des cel-

lules exprimant *Fgf-10* au niveau du mésoderme pharyngé entrent dans l'épithélium splanchnique et se déplacent vers le tube cardiaque (Fig. 2A). Notre modèle vient d'être renforcé par les observations de deux laboratoires qui travaillent sur la cardiogenèse chez le Poulet aux États-Unis (Mjaatvedt *et al.*, 2001; Waldo *et al.*, 2001). Ces résultats sont importants, puisqu'ils apportent pour la première fois une réponse claire à la question de l'origine embryonnaire du pôle artériel du cœur qui a longtemps été controversée (de la Cruz *et al.*, 1977; Viragh & Challice, 1973). Enfin, nous pensons que la voie efférente ainsi que le ventricule droit du cœur dérivent de cellules précurseurs situées en dehors des régions à l'origine des autres compartiments cardiaques (Zaffran *et al.*, 2003 en préparation).

Afin de conforter notre hypothèse sur l'implication du champ cardiaque antérieur dans la formation pôle artériel

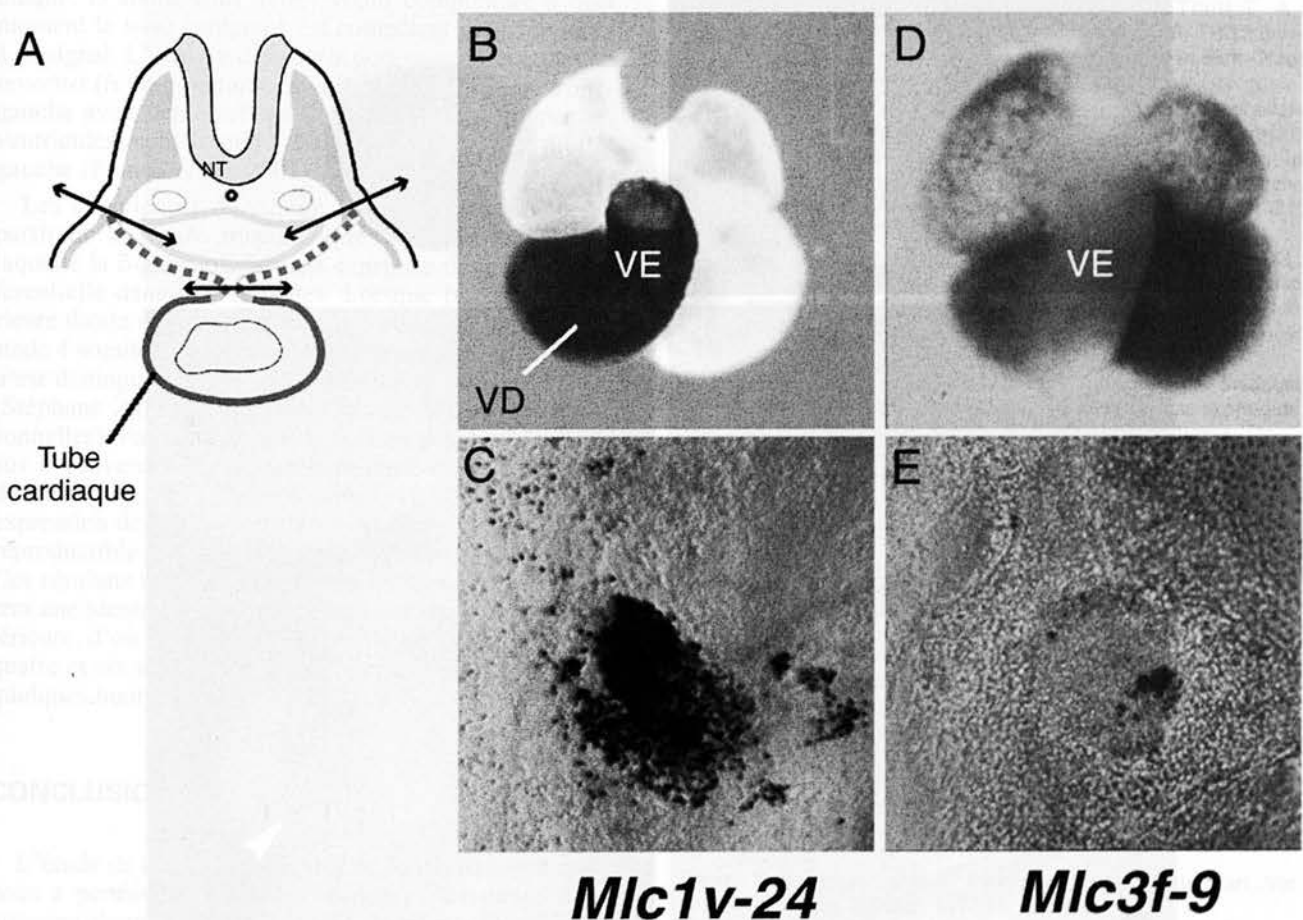


FIG. 3. – La voie efférente provient du mésoderme pharyngé. (A) Schéma représentant une coupe d'embryon âgé de 8,5 jours sur lequel est prélevé la région du mésoderme pharyngé (en pointillé). (B) Vue d'un cœur d'un embryon transgénique *Mlc1v-nlacZ-24* âgé de 10,5 jours. L'expression de la β -galactosidase est détectée uniquement dans le ventricule droit (VD) et la voie efférente (VE). (C) Vue d'un explant cardiaque après coloration X-gal et prélevé à partir du mésoderme pharyngé (comme indiqué en A) d'un embryon *Mlc1v-nlacZ-24* âgé de 8,5 jours. (D) Vue d'un cœur de 10,5 jours d'un embryon transgénique *Mlc3f-nlacZ-9*. L'expression de la β -galactosidase est visible dans les quatre chambres cardiaques, mais est exclue de la voie efférente. (E) Vue d'un explant cardiaque après coloration et prélevé à partir du mésoderme pharyngé (comme indiqué en A) d'un embryon *Mlc3f-nlacZ-9* âgé de 8,5 jours.

du cœur nous avons fait appeler à des techniques de culture *in vivo* d'embryon et d'explant embryonnaire. Le mésoderme pharyngé disséqué à partir de différentes lignées d'embryons transgéniques de 8,0 jours de développement est maintenu en culture pendant 48 h avant d'observer l'expression du rapporteur *lacZ* par révélation de l'activité de la β -galactosidase. Comme nous l'avions suggéré, le mésoderme pharyngé en culture est capable de produire des cardiomyocytes contractiles qui ont une identité de type voie efférente et ventricule droit (Fig. 3). En effet, l'explant contractile ayant été prélevé sur les souris transgéniques, *Mlc1v-nlacZ-24* exprime la β -galactosidase, ce qui révèle une identité de type voie efférente et ventricule droit (Fig. 3B, C). Les explants provenant de la lignée *Mlc3f-nlacZ-9*, qui marque le ventricule droit mais pas la voie efférente, ont également des cellules positives pour la β -galactosidase mais en plus faible nombre à ce

stade (Fig. 3D,E). De plus, notre expérience de culture de la partie centrale du tube cardiaque d'embryon de 8,0 jours de développement révèle que le tube cardiaque linéaire a une identité de type ventricule gauche à 8,0 jours (Fig. 4A,B). Ce résultat a été confirmé par d'autres expériences menées sur des cultures d'embryon de 8,0 jours de développement. Le marquage du tube cardiaque avec le colorant DiI est retrouvé de manière reproductible dans le ventricule gauche des embryons mis en culture (Fig. 4C,D). Enfin, tous ces résultats suggèrent qu'au stade du tube cardiaque, l'identité majeure du tube est de type ventricule gauche. Ce constat est conforme à notre modèle sur l'origine différente de la voie efférente et d'au moins une partie du ventricule droit, qui proviennent du champ cardiaque antérieur, tandis que le ventricule gauche est formé à partir du tube cardiaque primitif (Zaffran *et al.*, 2003 en préparation).

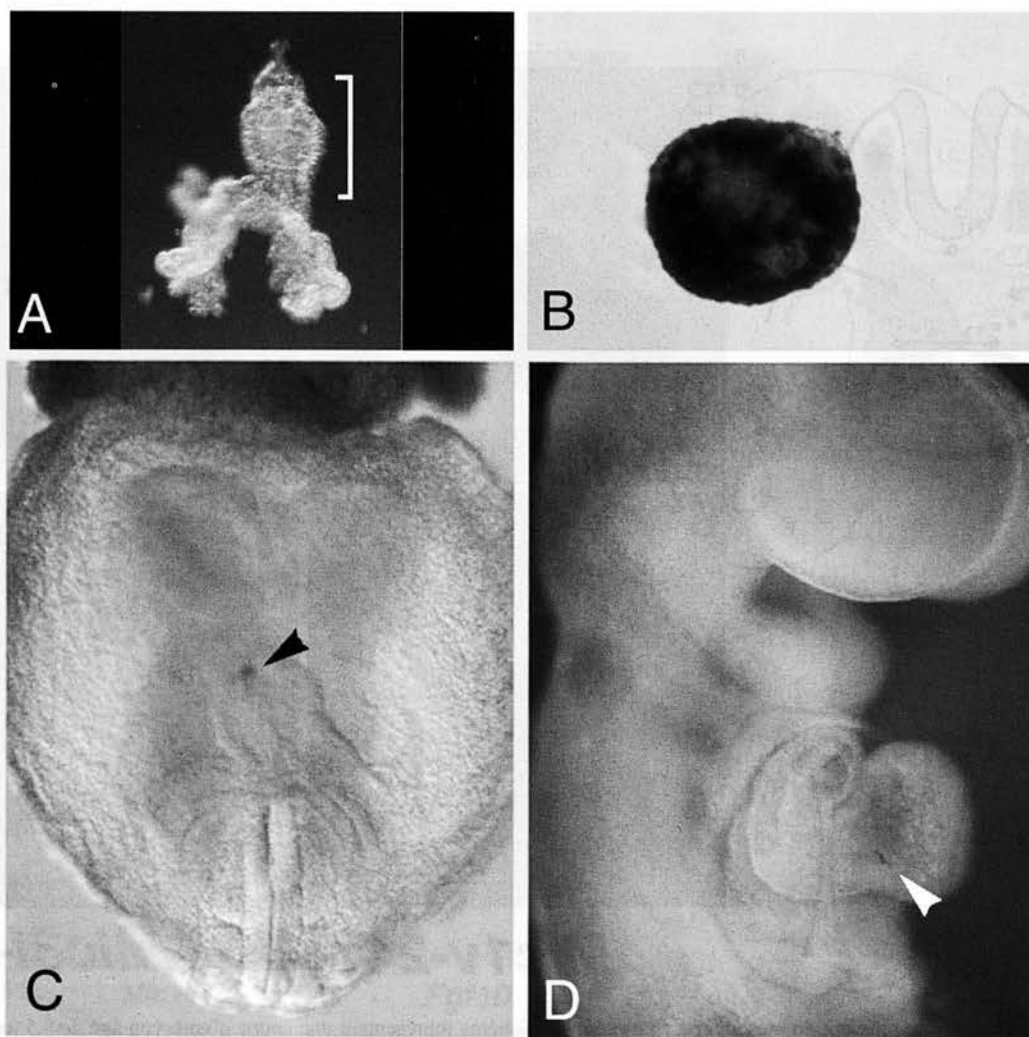


FIG. 4. – Origine du ventricule gauche et tube cardiaque chez la Souris. (A) Tube cardiaque disséqué sur un embryon âgé de 8 jours. (B) Vue d'un explant cardiaque après coloration provenant de la partie centrale du tube cardiaque (braquet en A) d'un embryon *Mlc3f-nlacZ-2* âgé de 8 jours. (C) Vue ventrale d'un embryon âgé de 8 jours avant sa mise en culture. Le colorant DiI est injecté dans la partie antérieure du tube cardiaque (tête de flèche). (D) Vue latérale d'embryon après 24 heures de culture, le colorant DiI est maintenant localisé dans le ventricule gauche (tête de flèche).

La voie de signalisation droite-gauche

Le cœur est la première structure embryonnaire à présenter une asymétrie droite-gauche. L'asymétrie axiale est sous le contrôle de trois membres de la superfamille des TGF- β , *nodal*, *lefty-1* et *lefty-2*, qui sont exprimés dans la partie gauche du mésoderme latéral (Pour revue voir Harvey, 1998b; Mercola, 1999). Les récents travaux sur le gène à homéoboîte, *Pitx2* ont permis de mieux comprendre l'interprétation de ces signaux. L'expression délocalisée de *nodal* ou *lefty-2* dans le mésoderme latéral droit d'embryons de Poulet ou de Xénope conduit à la mis-expression de *Pitx2*, et une inversion de l'axe du corps, suggérant que ce facteur est à l'interface du signal d'asymétrie droite-gauche et de la morphogenèse polarisée des organes (Logan *et al.*, 1998; Piedra *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998). Malgré notre compréhension de cette voie de signalisation, nous ne savons toujours pas comment cette information est interprétée, par l'intermédiaire de *Pitx2*, dans le tube cardiaque. D'abord nous avons voulu comprendre à quel moment le tissu cardiaque est compétent pour répondre à ce signal. L'analyse des souris porteuses de la mutation *inversus* (*iv*) qui perturbe la voie de signalisation droite-gauche avait démontré que les oreillettes, mais pas les ventricules, sont la cible d'une perte d'identité droite-gauche (Franco *et al.*, 2001).

Les expériences de culture d'explant sont opérées à partir de la lignée transgénique, *Mlc3f-nlacZ-2* dans laquelle la β -galactosidase est exprimée de manière différentielle dans les oreillettes. Lorsque la partie postérieure droite et gauche du croissant cardiaque (Fig. 1B; stade 4 somites) sont mises en culture, aucune différence n'est distinguée dans l'expression de la β -galactosidase (Stéphane Zaffran et Andrew Munk, observations personnelles). Par contre, dans la culture des « sinus venosus » provenant de la partie postérieure du tube cardiaque (Fig. 1C; stade 6 somites), une plus forte expression de la β -galactosidase est observée de manière reproductible dans les explants provenant du côté droit. Ces résultats suggèrent donc que les signaux qui confèrent une identité droite-gauche agissent sur la région postérieure, d'où proviennent les oreillettes, entre les stades quatre et six somites de développement, une période de quelques heures.

CONCLUSION

L'étude de différentes lignées de souris transgéniques nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau champ cardiaque appelé champ cardiaque antérieur. L'utilisation de culture d'explant et d'injection de colorant, dans des embryons de 8,0 jours de développement, montre que le champ cardiaque antérieur participe à la formation du cœur et en particulier de la voie efférente et du ventricule droit. Nous avons identifié une expression du gène *Fgf-10* dans ce champ cardiaque antérieur, ce qui suggère une implication potentielle de

ce facteur dans la formation de cette partie du cœur chez la Souris.

Les cultures d'explant de lignées transgéniques nous ont aussi permis de mettre en évidence la fenêtre de temps de compétence dans la réponse à la voie d'asymétrie droite-gauche qui se situe au cours du huitième jour de développement.

Remerciements. – Nous remercions Emmanuel Pecnard pour son aide technique dans le maintien des lignées de souris. Stéphane Zaffran et Robert Kelly sont respectivement chercheurs (CR1) au CNRS et à l'INSERM.

BIBLIOGRAPHIE

- Bao Z. Z., Bruneau B. G., Seidman J. G., Seidman C. E. & Cepko C. L., Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*, *Science*, 1999, 283, 1161-1164.
- Basson C. T., Bachinsky D. R., Lin R. C., Levi T., Elkins J. A., Soultis J., Grayzel D., Kroumpouzou E., Traill T. A., Leblanc-Straceski J. *et al.*, Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome, *Nat Genet*, 1997, 15, 30-35.
- Bruneau B. G., Bao Z. Z., Fatkin D., Xavier-Neto J., Georgakopoulos D., Maguire C. T., Berul C. I., Kass D. A., Kuroski-de Bold M. L., de Bold A. J. *et al.*, Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression, *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21, 1730-1736.
- Bruneau B. G., Bao Z. Z., Tanaka M., Schott J. J., Izumo S., Cepko C. L., Seidman J. G. & Seidman C. E., Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*, *Developmental Biology*, 2000, 217, 266-277.
- Bruneau B. G., Logan M., Davis N., Levi T., Tabin C. J., Seidman J. G. & Seidman C. E., Chamber-specific cardiac expression of *Tbx5* and heart defects in Holt-Oram syndrome, *Developmental Biology*, 1999, 211, 100-108.
- de la Cruz M. V., Sanchez Gomez C., Arteaga M. M. & Arguello C., Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo, *J Anat*, 1977, 123, 661-686.
- DeHaan R. L. & Ursprung H., In Organogenesis., In (ed. Holt. Winston. & Rinehart.), 1965, pp. 377-419, Austin, TX.
- 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, *Developmental Dynamics*, 2001, 221, 206-215.
- Harvey R. P., Cardiac looping – an uneasy deal with laterality, *Semin Cell Dev Biol*, 1998a, 9, 101-108.
- Harvey R. P., Links in the left/right axial pathway, *Cell*, 1998b, 94, 273-276.
- Harvey R. P., Organogenesis : Patterning the vertebrate heart, *Nat Rev Genet*, 2002, 3, 544-556.
- Hoffman J. I., Incidence of congenital heart disease : II. Prenatal incidence, *Pediatr Cardiol*, 1995, 16, 155-165.
- Jerkovic R., Vitadello M., Kelly R., Buckingham M. & Schiaffino S., Fibre type-specific and nerve-dependent regulation of myosin light chain 1 slow promoter in regenerating muscle, *J Muscle Res Cell Motil*, 1997, 18, 369-373.
- 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.

- Kelly R. G. & Buckingham M. E., The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart, *Trends Genet*, 2002, 18, 210-216.
- Kirby M. L., Gale T. F. & Stewart D. E., Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation, *Science*, 1983, 220, 1059-1061.
- Komuro I. & Izumo S., Csx : a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90, 8145-8149.
- Lints T. J., Parsons L. M., Hartley 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, 969.
- Logan M., Pagan-Westphal S. M., Smith D. M., Paganessi L. & Tabin C. J., The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals, *Cell*, 1998, 94, 307-317.
- Lough J., Barron M., Brogley M., Sugi Y., Bolender D. L. & Zhu X., Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm, *Developmental Biology*, 1996, 178, 198-202.
- Mercola M., Embryological basis for cardiac left-right asymmetry, *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10, 109-116.
- Mjaatvedt C. H., Nakaoka T., Moreno-Rodriguez R., Norris R. A., Kern M. J., Eisenberg C. A., Turner D. & Markwald R. R., The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field, *Developmental Biology*, 2001, 238, 97-109.
- Montgomery M. O., Litvin J., Gonzalez-Sanchez A. & Bader D., Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes, *Developmental Biology*, 1994, 164, 63-71.
- Piedra M. E., Icardo J. M., Albajar M., Rodriguez-Rey J. C. & Ros M. A., Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry, *Cell*, 1998, 94, 319-324.
- Reifers F., Walsh E. C., Leger S., Stainier D. Y. & Brand M., Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar), *Development*, 2000, 127, 225-235.
- Ross R. S., Navankasattusas S., Harvey R. P. & Chien K. R., An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and established an anterior-posterior gradient of expression, *Development*, 1996, 122, 1799-809.
- Rossant J., Ciruna B. & Partanen J., FGF signaling in mouse gastrulation and anteroposterior patterning, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1997, 62, 127-133.
- Ryan A. K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C., Yonei-Tamura S., Tamura K., Tsukui T., de la Pena J., Sabagh W., Greenwald J., Choe S. *et al.*, Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates, *Nature*, 1998, 394, 545-551.
- Schneider V. A. & Mercola M., Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*, *Genes Dev*, 2001, 15, 304-315.
- Sekine K., Ohuchi H., Fujiwara M., Yamasaki M., Yoshizawa T., Sato T., Yagishita N., Matsui D., Koga Y., Itoh N. *et al.*, Fgf10 is essential for limb and lung formation, *Nat Genet*, 1999, 21, 138-141.
- Srivastava D., Cserjesi P. & Olson E. N., A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis, *Science*, 1995, 270, 1995-1999.
- Srivastava D. & Olson E. N., A genetic blueprint for cardiac development, *Nature*, 2000, 407, 221-226.
- Srivastava 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.
- Tzahor E. & Lassar A. B., Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis, *Genes Dev*, 2001, 15, 255-260.
- Viragh S. & Challice C. E., Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse, *J. Ultrastructure Res.*, 1973, 42, 1-24.
- Waldo K. L., Kumiski D. H., Wallis K. T., Stadt H. A., Hutson M. R., Platt D. H. & Kirby M. L., Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field, *Development*, 2001, 128, 3179-3188.
- Yatskievych T. A., Ladd A. N. & Antin P. B., Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast : the role of the hypoblast and activin, *Development*, 1997, 124, 2561-2570.
- Zaffran S. & Frasch M., Early signals in cardiac development, *Circ Res*, 2002, 91, 457-469.