

## *L'hémangioblaste, précurseur commun des cellules endothéliales et hématopoïétiques*

M. Tavian<sup>1,2</sup>, F. Cortés<sup>2</sup>, C. Robin<sup>3</sup>, V. Schiavon<sup>3</sup>, M.F. Hallais<sup>2</sup>,  
L. Coulombel<sup>3</sup>, P. Charbord<sup>1</sup>, M.C. Labastie<sup>2</sup>, B. Péault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm unité 506, hôpital Paul-Brousse, 12, avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif cedex ;

<sup>2</sup> Institut d'embryologie cellulaire et moléculaire, Nogent-sur-Marne ; <sup>3</sup> Inserm unité 362, pavillon de recherche 1, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France

### Cellules souches angiohématogènes : généralités

On a d'abord désigné sous le terme d'« hémangioblastes » les amas de cellules mésodermiques qui, dans le sac vitellin de l'embryon, donnent naissance aux premiers vaisseaux sanguins contenant les premières cellules hématopoïétiques, adhérant en foyers à l'endothélium [1]. On appelle maintenant ces amas « îlots sanguins », mais le terme d'hémangioblaste est resté – et a même connu récemment un regain de popularité – pour désigner une cellule unique à l'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques expriment effectivement, depuis les premiers stades du développement, des marqueurs communs tels que MB1/QH1 chez l'oiseau [2, 3], CD31 chez l'homme [4] ou

CD34 chez la souris [5] et chez l'homme [20]. Les deux lignées sont absentes chez les embryons dans lesquels le gène codant Flk-1, le récepteur 2 du VEGF, a été inactivé [7], et fortement réduites après recombinaison homologue du gène du TGFβ1 [8]. Par ailleurs, la surexpression de *scl/tal1* chez l'embryon de poisson mène à une production accrue de cellules hématopoïétiques et vasculaires [9]. Ces observations suggèrent l'origine embryonnaire commune des compartiments hématopoïétique et endothélial. Une démonstration plus directe de l'existence de cellules souches angiohématogènes a été obtenue dans le modèle des cellules ES de souris, qui sont des cellules multipotentielles du blastocyste immortalisées en culture. Les corps embryonnaires, qui représentent la descendance immédiate des cellules ES, incluent des cellules donnant naissance à la fois aux cellules de l'hématopoïèse primitive et

---

\* Correspondance et tirés à part.

définitive [10] et à des cellules de type endothélial [11]. De tels hémangioblastes dérivés de cellules ES répondent au VEGF et expriment son récepteur Flk-1 [14]. On a pu trier chez l'embryon d'oiseau une population de cellules mésodermiques primitives Flk-1<sup>+</sup> donnant naissance à une descendance de cellules hématopoïétiques *ou* endothéliales selon les conditions de culture utilisées [13].

Pour certains auteurs, cependant, ces hémangioblastes embryonnaires seraient déjà engagés dans le lignage endothélial dont ils exprimeraient le marqueur VE-cadherine [12]. On est ainsi revenu à la notion d'endothélium hémotogène selon laquelle certaines cellules endothéliales embryonnaires peuvent redonner naissance à des cellules hématopoïétiques. Dans un modèle de différenciation endothéliale des cellules ES de souris, l'expression de l'intégrine  $\alpha 4$  marquerait la transition d'une population de cellules endothéliales Flk-1<sup>+</sup> vers une descendance de cellules sanguines [15]. Après injection de la molécule *acetylated low-density lipoprotein* (AcLDL) dans la circulation de l'embryon d'oiseau, afin d'en marquer toute la surface interne des vaisseaux, on voit se développer, vraisemblablement à partir du territoire aorte-gonades-mesonephros (AGM), une population de cellules hématopoïétiques AcLDL<sup>+</sup>, ce qui suggère le pouvoir hémotogène de l'endothélium embryonnaire [16].

Alors que la recherche d'hémangioblastes a été jusqu'à présent restreinte aux stades précoces de l'ontogenèse, on a récemment décrit une sous-population de cellules hématopoïétiques humaines CD34<sup>+</sup> exprimant également le récepteur KDR (Flk-1). Ces cellules KDR<sup>+</sup>, qui représentent moins de 0,5 % des cellules CD34<sup>+</sup>, sont rencontrées dans le sang de cordon ombilical mais également dans la moelle osseuse et le sang de l'adulte [17]. Considérablement enrichies en cellules souches hématopoïétiques primitives, ces cellules pourraient

représenter une population d'hémangioblastes persistant chez l'adulte.

Il a donc fallu attendre plus de 70 ans pour que la notion de cellule souche angiohématopoïétique déduite des observations des embryologistes du début du XX<sup>e</sup> siècle [18] commence à être étayée expérimentalement. Les démonstrations récentes sont néanmoins fondées sur l'utilisation du modèle quelque peu artificiel des cellules ES et il demeure à établir de façon non-équivoque que de telles cellules souches émergent au cours du développement normal, et éventuellement persistent jusqu'à la vie adulte.

### Rapports entre cellules endothéliales et cellules souches hématopoïétiques émergentes dans l'embryon humain

L'hématopoïèse débute dans le sac vitellin humain autour de 17 jours de développement et est définitivement établie dans la moelle osseuse à la 30<sup>e</sup> semaine [19]. Entre les deux, nous avons observé une première colonisation de l'ébauche hépatique au 27<sup>e</sup> jour par des cellules hématopoïétiques différenciées. En revanche, les premiers progéniteurs CD34<sup>+</sup> n'y apparaissent qu'au 31<sup>e</sup> jour. Cet événement fait suite à la prolifération, à partir du 28<sup>e</sup> jour, d'une population dense de cellules hématopoïétiques au contact de l'endothélium ventral de l'aorte dorsale et de l'artère vitelline. Ces cellules ont le profil phénotypique de cellules souches primitives (CD34<sup>++</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD164<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>) et expriment des médiateurs moléculaires des phases initiales de l'hématopoïèse tels que c-myb, SCL/TAL-1, GATA-2, GATA-3 et c-kit [6, 20-22]. Des cellules capables d'établir des cultures hématopoïétiques de longue durée (LTC-IC) ont été détectées dans ce territoire embryonnaire (appelé splanchnopleure paraortique, ou PSp, et donnant naissance à l'AGM) dès le 22<sup>e</sup> jour du développement, c'est-à-dire environ six jours

avant que de réelles cellules souches n'y soient identifiées [20]. Cela suggère que les cellules souches de l'hématopoïèse émergent réellement in situ dans cette région de l'embryon. Nous avons effectivement identifié dans la PSp une population mineure de cellules mésodermiques qui ne participent pas à des phénomènes d'angio- ou de vasculogénèse et qui néanmoins expriment KDR, le récepteur 2 du VEGF [23]. Ces cellules représentent une population candidate d'hémangioblastes humains.

Afin de caractériser plus avant les rapports ontogénétiques existant entre les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques qui émergent dans l'embryon de 28 jours, la région AGM a été prélevée à 26 jours et les compartiments cellulaires endothélial ( $CD34^+CD45^-$ ) et mésodermique périaortique indifférencié ( $CD34^-CD45^-$ ) en ont été triés par cytométrie en flux, puis cultivés en présence de cellules stromales MS-5 capables de promouvoir et d'entretenir l'hématopoïèse. Aucune cellule sanguine ne s'est développée à partir de l'endothélium, contrairement aux observations faites chez l'embryon d'oiseau [16]. En revanche, une hématopoïèse significative a été obtenue à partir du mésoderme périaortique. Cela confirmerait l'hypothèse de l'émergence des cellules souches sanguines à partir des hémangioblastes candidats  $CD34^-KDR^+$  identifiés dans ce territoire [23]. En accord avec cette notion, l'endothélium sous-jacent aux foyers de cellules souches intra-aortiques est désorganisé et partiellement interrompu, suggérant la prolifération de ces cellules souches à partir du mésoderme sous-aortique [20].

La PSp/AGM humaine est un territoire hématopoïétique multipotent doué de potentialités myéloïdes, NK et lymphoïdes B et T [20 et résultats non publiés].

En conclusion, dans l'embryon humain, la PSp et la région AGM qui en dérive soutiennent l'émergence et l'expansion, entre les 28<sup>e</sup> et 40<sup>e</sup> jours du développement, d'une population

de cellules souches hématopoïétiques associées à l'endothélium artériel et vraisemblablement dérivées d'hémangioblastes  $CD34^-KDR^+$ . Les propriétés intrinsèques de ces cellules, mais également l'extrapolation de résultats convergents obtenus dans les modèles animaux suggèrent qu'elles sont à l'origine de l'hématopoïèse définitive.

## Références

- 1 Murray PDF. The development in vitro of blood of the early chick embryo. *Proc R Soc London B Biol Sci* 1932 ; 111 : 497-521.
- 2 Péault B, Thiery JP, Le Douarin NM. Surface marker for hemopoietic and endothelial cell lineages in quail that is defined by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 2976-80.
- 3 Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lièvre F, Buck CA. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 1987 ; 100 : 339-49.
- 4 Watt SM, Williamson J, Geneviev H, Fawcett J, Simmons DL, Hatzfeld A, et al. The heparin binding Pecan-1 adhesion molecule is expressed by  $CD34^+$  hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 1993 ; 82 : 2649.
- 5 Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. The sialomucin  $CD34$  is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995 ; 85 : 96-105.
- 6 Tavian M, Coulombel L, Luton D, San-Clemente H, Dietevlen-Lièvre F, Péault B. Aorta-associated  $CD34^+$  hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* 1996 ; 87 : 67-72.
- 7 Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fisher KD, Schuch AC, Schwartz L, et al. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997 ; 89 : 981-90.
- 8 Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 1995 ; 121 : 1845-54.
- 9 Gering M, Rodaway ARF, Göttgens B, Patient RK, Green AR. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J* 1998 ; 17 : 4029-45.
- 10 Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997 ; 386 : 488-93.
- 11 Choi K, Kennedy M, Kasarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998 ; 125 : 725-32.
- 12 Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, Yoshida H, Kizumoto M, Kataoka H, et al. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 1998 ; 8 : 761-9.

- 13 Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5141-6.
- 14 Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherine+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 1998 ; 125 : 1747-57.
- 15 Ogawa M, Kizumoto M, Nishikawa S, Fujimoto T, Kodama H, Nishikawa SI. Expression of  $\alpha 4$ -integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. *Blood* 1998 ; 93 : 1168-77.
- 16 Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 1998 ; 125 : 4575-83.
- 17 Ziegler BL, Valtieri M, Almeida Porada G, De Maria R, Müller R, Masella B, et al. KRD receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999 ; 285 : 1553-8.
- 18 Sabin FR. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Inst Wash Pub n° 272. Contrib Embryol* 1920 ; 9 : 214-62.
- 19 Charbord P, Tavian M, Humeau L, Péault B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 1996 ; 8 : 4109-19.
- 20 Tavian M, Hallais MF, Péault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999 ; 126 : 793-803.
- 21 Labastie MC, Cortés F, Roméo PH, Dulac C, Péault B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* 1998 ; 92 : 3624-35.
- 22 Watt SM, Butler LH, Tavian M, Bühring HJ, Rappold I, Buck D, et al. Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34+ cells throughout ontogeny, but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Blood* 2000 ; à paraître.
- 23 Cortés F, Debacker C, Péault B, Labastie MC. Differential expression of KDR/Flk-1 and CD34 defines distinct stages of endothelial and hematopoietic development in early human embryos. *Mech Dev* 1999a ; 83 : 161-64.