

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI

Ecole Doctorale Gènes, Génomes, Cellules

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire du développement

Présentée et soutenue publiquement le 11 Décembre 2006 par :

Sébastien GIROUX

Pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI

**Analyse fonctionnelle de facteurs
impliqués dans l'émergence des
précurseurs hématopoïétiques
de l'embryon de souris**

Réalisée à l'INSERM U790

« Cellules souches normales et pathologiques »

Directeur : William Vainchenker

Mlle Isabelle GODIN	Directeur de thèse
M. Paul-Henri ROMEO	Rapporteur
M. Lucas WALTZER	Rapporteur
M. Bruno PEAULT	Examineur
M. Luc PARDANAUD	Examineur
M. Maurice WEGNEZ	Examineur

Lors de la composition de mon jury de thèse, Isabelle m'a dit qu'il serait bien que je réfléchisse moi-même aux personnes que je désirais contacter. Ce ne fut pas pour me déplaire, et mes choix se sont alors tournés vers les personnes qui me paraissaient les plus compétentes pour juger mon manuscrit. Au final, tous « mes vœux » ont été respectés et pour cela je remercie sincèrement les docteurs Lucas Waltzer, Paul-Henri Roméo, Luc Pardanaud, Maurice Wegnez et Bruno Péault. C'est pour moi un grand honneur de les compter parmi les membres de mon jury.

Je remercie William Vainchenker de m'avoir accueilli dans son unité. Mon passage dans son laboratoire à la pointe de la technique m'aura permis de développer de multiples compétences auxquelles il n'est pas toujours facile d'accéder.

Je remercie l'Association pour la Recherche contre le Cancer et l'Institut Gustave Roussy de m'avoir fournis les financements qui m'ont permis de réaliser mes travaux de thèse.

Isabelle, je crois que je n'ai pas besoin de te rappeler combien je te suis redevable. Tu m'as permis d'accéder à mon plus grand rêve et je suis extrêmement fier d'avoir travaillé au sein de ton équipe. Je me rappelle encore mes premières visites à Nogent, quand je cherchais un stage pour mon DEA. A l'époque, pour moi, avoir la possibilité de travailler à l'Institut d'Embryologie, ce n'était pas rien... D'ailleurs au départ, j'étais « comme qui dirait » plutôt timide, et il m'aura fallu du temps avant d'arriver à vous tutoyer, Michèle et toi. C'est en comptant sur tes grandes qualités relationnelles et sur la confiance que tu m'as accordée que j'ai progressivement fait ma place au sein de l'équipe. Le plus important je crois, lorsqu'on fait de la recherche, c'est d'être capable de continuer à s'émerveiller et de ne pas se prendre trop au sérieux, « Isabelle, viens voir, j'ai un truc, c'est vraiment génial ! », combien de fois j'ai pu te téléphoner de la pièce d'à côté pour te dire ça ? Reste qu'à chaque fois, tu accourais... et que la plupart du temps, c'était l'excuse d'une longue conversation où l'on pouvait confronter nos idées, d'égal à égal, et c'est là, je pense, ta plus grande qualité ! Ces dernières semaines ont, à mon sens, été un concentré de tout ça, et j'ai vraiment pris un réel plaisir à travailler avec toi. Alors que je papillonne entre Villejuif et ma Bourgogne natale, tu ne m'as pas lâché d'une semelle et tu m'as soutenu dans toutes mes démarches. Isabelle, trouve dans ces quelques mots toute ma gratitude et encore merci pour tout.

Merci Michèle pour tout ton soutien, tant moral que technique. Sache que je respecte profondément ton courage et ta gentillesse. « Face à la mer », c'est ce que chantait Etienne à Bernières, les vacances en Normandie... Pleins de souvenirs dans cet appartement, les pieds dans l'eau, c'était formidable ! Ces dernières semaines, avec tous ces allers-retours, je dois dire que de vous retrouver Isabelle et toi autour du café, tôt le matin, c'était vraiment très agréable, ça me manquera. Mais je sais qu'on ne se perdra pas de vue, et je ne manquerai pas de venir vous rendre visite.

Je tiens également à remercier Olivier Albagli. Son arrivée au laboratoire constitue un tournant décisif dans l'histoire de ma thèse. Sa rigueur et son expertise en biologie moléculaire m'ont permis de faire des progrès plus que significatifs dans ce domaine. J'ai pris un réel plaisir à le côtoyer et ceci m'aura permis d'apprendre à être plus précis dans mes actions et dans ma façon de raisonner. Pour tout ce que tu m'as apporté, je te remercie Olivier.

Je tiens également à remercier Aline, qui m'a aidé à « tourner » mon premier manuscrit de thèse, lors d'un week-end de folie que je ne suis pas prêt d'oublier, merci vraiment.

Vient le moment de parler un peu de mes collègues, étudiants, thésards, techniciens, docteurs ou plus encore. Il serait difficile de faire une liste exhaustive et c'est pour cela que je remercie ici en quelques mots tous ceux que j'ai côtoyé de près ou de loin, qui m'ont aidé dans les manip ou permis de passer de bons moments dans ce laboratoire. Pour être plus précis, n'en déplaise à la rumeur, mes premières pensées reviennent à Sabrina. Pourquoi Sabrina ? Et bien tout simplement parce j'ai

appris à la connaître et à l'apprécier en temps que « binôme » de manips, avec ces fameuses injections à la chaîne... Mais aussi parce que j'admire sa force de caractère et son opiniâtreté. Merci Sabrina, pour ton soutien et tes sourires. Je te souhaite tout ce que tu mérites et bonne chance pour le futur.

Réflexion faite, j'étais un étudiant veinard. Je m'explique : durant toutes ces années, j'aurai partagé mon bureau avec la seule gente féminine, et ceci ne fut pas pour me déplaire. Je remercie Oriane, Abire, Charleen, Aurore et Céline qui m'ont soutenu de leur agréable compagnie durant toutes ces années. Je remercie également Cyril, le Notcheur, qui m'a fait découvrir le tout Paris : Janson de Sailly, « j'y » aurai mis les pieds. C'est vrai qu'au départ, on ne se parlait pas beaucoup, mais au fil des réunions de groupe et des conversations scientifiques autour d'une cigarette, on a appris à se connaître et je pense à s'apprécier. Merci Cyril et bonne chance pour ta future vie de chercheur.

Je remercie également Steph qui m'aura fait découvrir le Plessis Robinson pendant ce dernier été de manips, loin des miens.

En quittant l'équipe, je cède ma place de « grand » (ou de vieux), à Anna-Lila. Quand tu es arrivée dans le labo, je dois dire que j'étais quelque peu réticent, peut-être sur le coup d'une mauvaise expérience... Pourtant, j'ai rapidement pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi, et si je ne l'ai pas encore déjà fait, je te félicite et je te remercie pour tout le travail que tu as fourni pour que notre papier soit au top. Alors reste cool, et continue sur ta lancée.

Et puisque dans mon cœur, les derniers sont les premiers, toutes mes pensées vont à Etienne et Stéphanie, ma petite famille. Je veux simplement leur dire que, sans eux, rien n'aurait été possible. Je remercie profondément mes parents car il m'ont permis, en me faisant confiance et en me laissant le choix, de me retrouver là où je suis aujourd'hui. Merci beaucoup aussi à mes beaux parents, pour ce pied à terre réconfortant, je ne l'oublierai jamais. Reste alors mes quatre grandes sœurs et mes beaux frères, qui m'ont beaucoup manqué durant ces dernières années. On a beaucoup de temps à rattraper...

Liste des figures

Figure 1 : Les cellules souches du muscle squelettique

Figure 2 : Modalités de division des cellules souches

Figure 3 : Différents types de cellules souches

Figure 4 : La compaction est à l'origine des cellules souches pluripotentes

Figure 5 : Modalités d'obtention des cellules souches embryonnaires

Figure 6 : Mise en place du mésoderme intra- et extra-embryonnaire

Figure 7 : Cinétique d'invagination de l'épiblaste

Figure 8 : Les cellules de crêtes neurales sont pluripotentes

Figure 9 : Compartimentalisation du système hématopoïétique

Figure 10 : Organisation hiérarchique de l'hématopoïèse

Figure 11 : Tests de reconstitution *in vivo*

Figure 12 : Composition de la niche hématopoïétique médullaire

Figure 13 : Contribution des différents organes hématopoïétiques au cours de la vie embryonnaire et fœtale

Figure 14 : Formation et composition des îlots sanguins chez la souris

Figure 15 : Contribution des cellules de l'épiblaste à la formation des cellules endothéliales et hématopoïétiques des îlots sanguins

Figure 16 : Erythropoïèse primitive et définitive

Figure 17 : Principe des chimères Caille-Poulet

Figure 18 : Structure et évolution du site hématogène intra-embryonnaire

Figure 19 : Structure de l'AGM

Figure 20 : L'aorte dorsale comme site de production des cellules souches hématopoïétiques de l'embryon

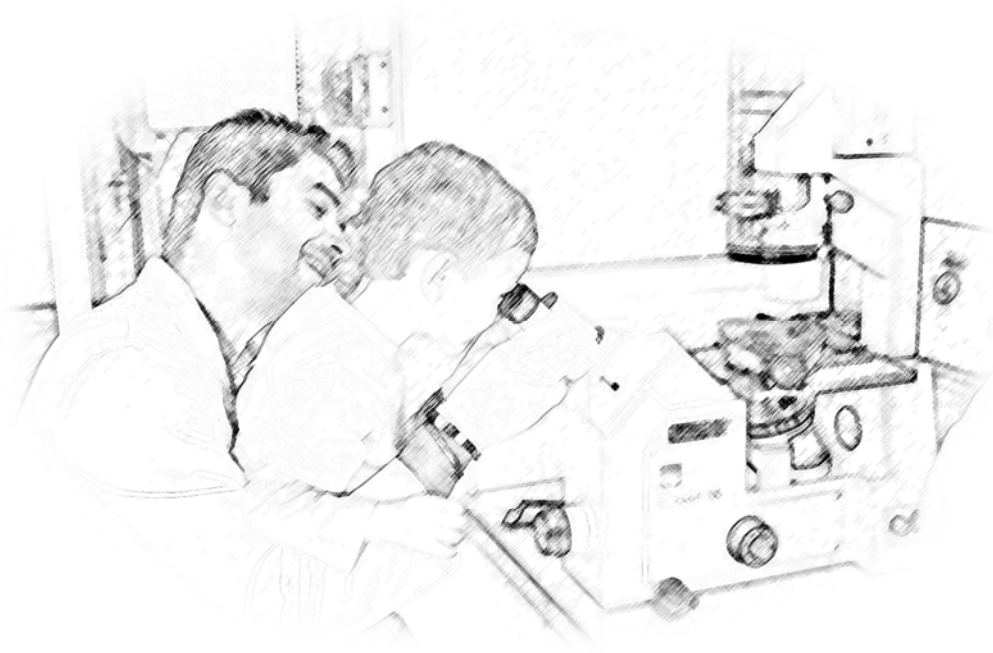
Figure 21 : Modèles alternatifs de génération des cellules souches hématopoïétiques à partir de l'AGM

Figure 22 : Origine sous-aortique des cellules souches hématopoïétiques de l'embryon

Figure 23 : Localisation et origine des cellules souches hématopoïétiques

Table des matières

Préambule.....
INTRODUCTION.....	5
PREMIERE PARTIE LES CELLULES SOUCHES : GENERALITES.....	6
I/ La cellule Souche comme point de départ.....	8
a) Les cellules souches de l'adulte :.....	8
b) Différents types de cellules souches.....	9
II/ Du zygote au blastocyste : les cellules souches pluripotentes.....	10
a) La compaction est à l'origine des cellules souches pluripotentes.....	11
b) Cellules totipotentes versus cellules pluripotentes.....	11
III/ Du blastocyste à l'adulte, les cellules souches multipotentes.....	12
a) Spécification des feuilletts embryonnaires et cellules souches multipotentes.....	12
b) Spécification des feuilletts embryonnaires et cellules souches multipotentes.....	13
DEUXIEME PARTIE LA CELLULE SOUCHE HEMATOPOÏËTIQUE.....	15
I/ La cellule souche hématopoïétique, une course pour la vie, la survie.....	16
a) A l'origine du tissu hématopoïétique, la cellule souche hématopoïétique.....	16
b) Potentiel de différenciation des cellules souches hématopoïétiques :.....	19
II/ La Moelle osseuse, balance entre l'autorenouvellement et l'engagement des CSH de l'adulte.....	19
a) Notion de niche hématopoïétique :.....	19
TROISIEME PARTIE ONTOGENESE DU SYSTEME HEMATOPOÏËTIQUE.....	23
I/ Le Sac Vitellin est à l'origine des premières cellules sanguines de l'embryon.....	24
a) Origine des îlots sanguins du Sac Vitellin, l'hématopoïèse primitive :.....	25
b) Propriétés et potentiel de différenciation des précurseurs du SV.....	28
II/ Les premières CSH de l'embryon: contributions du modèle aviaire.....	30
a) Précurseurs intrinsèques et extrinsèques.....	31
b) L'aorte dorsale comme source de cellules souches hématopoïétiques :.....	32
c) Conclusion : Deux vagues successives de précurseurs hématopoïétiques.....	33
III) Origine intra-embryonnaire des CSH de l'embryon de souris.....	33
a) De la splanchnopleure intra-embryonnaire à la région AGM :.....	34
b) Les CSH de l'embryon sont produites dans la région Sp-PA/AGM.....	34
c) Structure de l'AGM et localisation des CSH embryonnaires :.....	37
d) Phénotype des CSH produites dans la région Sp-P/AGM :.....	38
e) Mode de formation des CSH de la Sp-PA/AGM.....	39
IV/ Les organes hématopoïétiques au cours du développement.....	43
V/ Conclusion.....	46
QUATRIEME PARTIE BASES MOLECULAIRES DE L'HEMATOPOÏËSE EMBRYONNAIRE.....	47
I/ Hématopoïèse « primitive » versus « définitive », similitudes et divergences.....	48
a) Du mésoderme vers la voie hématopoïétique.....	48
b) Précurseurs hématopoïétiques du SV et de l'AGM, quelles différences?.....	54
CINQUIEME PARTIE OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE.....	56
RESULTATS.....	61
RESULTATS 1^{ERE} PARTIE FACTEURS POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS L'EMERGENCE DES PRECURSEURS HEMATOPOÏËTIQUES DE L'EMBRYON DE SOURIS ARTICLE N°1.....	62
I/ Comparaison des patrons d'expression de <i>Lyl-1</i> et <i>SCL/Tal-1</i>.....	63
RESULTATS 2^{EME} PARTIE ANALYSE FONCTIONNELLE DE FACTEURS IMPLIQUES DANS L'EMERGENCE DES PRECURSEURS HEMATOPOÏËTIQUES DE L'EMBRYON DE SOURIS ARTICLE N°1.....	65
I/ Modification de l'expression génique dans les précurseurs du Sac Vitellin précoce.....	66
RESULTATS 2^{EME} PARTIE ANALYSE FONCTIONNELLE DE FACTEURS IMPLIQUES DANS L'EMERGENCE DES PRECURSEURS HEMATOPOÏËTIQUES DE L'EMBRYON DE SOURIS ARTICLE N°2.....	70
I/ Introduction.....	71
a) Les facteurs de transcription de type GATA.....	71
b) Les principaux rôles des facteurs GATA.....	73
c) GATA-3 et détermination des CSH de l'embryon.....	80
II/ Résultats : Evaluation du rôle de GATA-3 dans les PH de l'embryon :.....	83
a) Construction des vecteurs rétroviraux et plasmidiques.....	84
b) Analyse <i>in vitro</i> des effets de GATA-3 sur le devenir des PH du SV.....	87
c- Analyses des potentialités <i>in vivo</i>	96
III/ Discussion :.....	98
IV/ Matériel et méthodes.....	102
RESULTATS 3^{EME} PARTIE ARTICLES EN COLLABORATIONS/CONTRIBUTIONS A DES OUVRAGES : ARTICLE N°1.....	107
I/L'effet radioprotecteur d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I sur l'hématopoïèse passe par la voie de l'angiotensine II.....	107
RESULTATS 3^{EME} PARTIE ARTICLES EN COLLABORATION/CONTRIBUTIONS A DES OUVRAGES : ARTICLE N°2.....	110
I/Purification et localisation <i>in situ</i> des Cellules Souches Hématopoïétiques intra-embryonnaires dans l'AGM à 10 jdg.....	110
RESULTATS 3^{EME} PARTIE ARTICLES EN COLLABORATIONS/CONTRIBUTIONS A DES OUVRAGES : ARTICLE N°3.....	111
Hematopoietic Stem Cell Development During Mouse Embryogenesis.....	111
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	112
REFERENCES.....	123



Selon Aristote : « L'étonnement est le commencement de la philosophie et l'étonnement est à l'origine de la connaissance ».

Préambule

Ce manuscrit s'adresse sans nul doute à la compréhension d'un public « averti ». Aussi, parce que quatre ans d'une vie, ce n'est tout de même pas rien, je dédie ce préambule, aux personnes qui, pendant tout ce temps se sont rongées les « sangs » en se posant cette immuable question : « Mais à quoi un docteur qui ne soigne pas les gens peut-il bien servir ? ».

La cellule est « l'Unité » de base microscopique de tous les êtres vivants. Elle produit de l'énergie et utilise cette énergie pour la fabrication de toutes les substances nécessaires à sa vie. Elle est délimitée par une membrane semi-perméable contenant un gel (le cytoplasme) dans lequel se trouve un noyau qui renferme le matériel héréditaire sous forme de chromosomes. Dans la plupart des cas, le développement d'un organisme multicellulaire (embryogenèse) commence par une cellule unique, l'œuf fécondé ou zygote, qui donne naissance à l'embryon et toutes les cellules de l'organisme. Autrefois, on se demandait si tout était préformé dans l'embryon ou bien est-ce qu'au contraire de nouvelles structures apparaissent progressivement au cours de la formation d'un individu ?

Aristote postulait que la deuxième hypothèse était la bonne et nommait « épigenèse » cette mise en place progressive des structures. Cette vision ne s'imposa véritablement qu'avec l'apparition de la théorie cellulaire de Schwann (1839) et de Weismann qui fait la distinction entre lignée somatique et lignée germinale (1900) : « Puisqu'un individu entier ne reçoit ses caractéristiques que de deux cellules, il est difficile de penser que tout est préformé... ».

Pourtant, l'Homunculus, ou petit homme que les préformationnistes croyaient autrefois contenu, tout formé, dans la tête des spermatozoïdes ou dans les ovules, présageait déjà le fantasme d'une entité capable à elle seule de stocker la totalité des plans, des schémas de construction d'un organisme adulte.



fin du 19ème siècle, Wilson et Morgan, deux d'embryologistes et physiologistes, commencèrent à étudier le développement embryonnaire, se demandant comment des œufs fécondés donnent naissance à des organisme adultes. A l'époque, la controverse qui attribuait le contrôle de l'hérédité, soit au compartiment du noyau, soit à celui du cytoplasme, était vive. Hertwig, Roux et Boveri pensaient que les chromosomes du noyau contenaient les éléments constituant la forme. A ce groupe, s'opposaient Pflüger, Bischoff, His et leurs collègues, qui pensaient qu'aucune structure préformée ne pourrait causer les changement importants qui ont lieu pendant le développement, mais que les schémas hérités du développement étaient dus à la synthèse de nouvelles molécules résultant de l'interaction des cytoplasmes des gamètes. La suite de l'histoire montrera que le noyau contient le support physique de l'hérédité : le gène, et que le cytoplasme constitue le compartiment physique de la transmission de cette information, sous forme par exemple de protéine comme la mélanine qui permet de colorer notre peau.

On me pose souvent la question suivante : « Une cellule souche, c'est quoi ? »

La définition de la cellule souche qui me parait la plus simple, et qui de fait est sans doute la plus triviale, consistera à prendre pour exemple la cellule œuf ou zygote. Cette cellule contient dans ses chromosomes la totalité de l'information nécessaire à la construction d'un organisme dans toute sa complexité (cellule totipotente). Pourtant, comment faire le

distinguo entre cette cellule et toute autre cellule de l'organisme qui possède les mêmes chromosomes et donc cette même information. Les cellules des vaisseaux ou certains neurones persistent pendant toute la vie de l'individu, d'autres, comme celles de l'intestin ou du sang meurent très rapidement et doivent être remplacées en permanence. Toutes ces cellules (cellules somatiques) ont en quelque sorte sélectionnés une partie des gènes nécessaires à leur fonction spécifique. Pour les remplacer, une cellule souche de l'adulte (pluripotente par opposition à la cellule œuf) est nécessaire. Cette cellule possède la capacité de se diviser pour donner naissance à la fois à une cellule souche identique (autorenewement) et à une autre cellule qui par divisions successives produira des cellules spécialisées dans des registres différents : les cellules souches du sang, par exemple, donnent aussi bien des globules rouges que des globules blancs.

Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des propriétés d'autorenewement et de différenciation des cellules souches constitue un point crucial dans le traitement du cancer. En effet, certaines cellules cancéreuses peuvent être comparées à des cellules souches. Elles sont capables de se diviser à l'identique et de se différencier pour former les tumeurs.

Le développement de l'embryon de souris est, en de nombreux points, comparable à celui de l'embryon humain. Il est admis en général que les cellules souches de l'adulte sont formées pendant la vie embryonnaire. C'est pourquoi, les informations dérivant de l'étude du développement de l'embryon de souris pourraient participer à la progression des connaissances sur les cellules souches. Le système sanguin est bien connu et se prête particulièrement bien à l'expérimentation scientifique. Il constitue un modèle de choix pour l'étude des cellules souches.

Dans l'embryon, il existe deux types de précurseurs sanguins (terme général pouvant définir toutes sortes de cellules pouvant produire des cellules sanguines). Les premiers apparaissent très tôt dans le développement embryonnaire dans une annexe de l'embryon, le Sac Vitellin. Ces cellules ne sont pas des cellules souches, elles ont pour « mission » de produire rapidement les cellules sanguines nécessaires au développement de l'embryon. Plus tard, une seconde série de précurseurs apparaît dans l'embryon (par opposition à la première qui se forme dans l'annexe). Ces cellules ont une capacité d'autorenewement et donneront les futures cellules souches de l'adulte. Les deux types de cellules sanguines fabriquées pendant l'embryogenèse ne semblent pas être initialement identiques et n'utilisent donc probablement pas exactement les mêmes gènes. Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à mettre au point une approche expérimentale permettant d'analyser la fonction des gènes qui présentent une expression différente entre les deux types de cellules sanguines (cellules de l'annexe et de l'embryon) et d'évaluer l'importance de ces gènes dans l'acquisition du potentiel de la cellule souche hématopoïétique.

Les expériences effectuées chez l'embryon, chez l'adulte et dans d'autres modèles permettront à terme une meilleure compréhension du fonctionnement des cellules souches. Ces informations offriront peut-être la possibilité d'établir des protocoles permettant de maintenir ou d'amplifier des cellules souches *in vitro* et ainsi d'améliorer les traitements cliniques existants, en particulier dans le cadre de la greffe de moelle osseuse.

Première Partie

Les cellules souches : généralités

Pour comprendre un fait, quel qu'il soit : une guerre, l'apparition et l'évolution d'une maladie, instinctivement, nous recherchons la ou les cause(s) de ce dysfonctionnement. Cette démarche nécessite d'une part une connaissance approfondie du système en question, et d'autre part, l'analyse rétrospective de faits susceptibles d'être à l'origine de ce déséquilibre. Les étoiles qui illuminent la voûte céleste sont les messagers lumineux d'évènements venus du passé. En biologie, la cellule œuf est le « Big-bang » de la vie et les cellules souches enfantent des neurones ou des globules rouges comme le font les galaxies avec les étoiles.

De mon expérience, les néophytes s'accordent à penser qu'une cellule souche est une cellule qui est capable de tout. De tout, c'est-à-dire dans un premier temps d'être capable de produire un organisme entier. En cherchant dans le Robert illustré, on trouve : 1) Cellule : Élément fondamental constituant tous les êtres vivants ; 2) Souche : Ce qui reste du tronc, avec les racines, quand l'arbre a été coupé ; origine d'une lignée. Il est effectivement commun de présenter les choses sous forme d'un arbre : généalogique (« Il est de la souche de son grand père celui-là ») ou phylogénique (« Nous descendons tous du singe »). Le terme de souche renferme bien cette idée de commencement, d'entité ou d'évènement initiateur. Plus intéressant encore, on dit souvent de quelqu'un qui veille à se préserver : « Il dort comme une souche ». Comme si la cellule souche, elle aussi, veillait à se préserver. Avec un peu d'imagination, il est possible d'extraire de ces définitions, « La définition » de ce que serait peut-être une cellule souche. Pourtant, la cellule souche en tant qu'entité unique et parfaitement caractérisée n'existe pas. Les cellules souches sont de différents types et n'ont pas toutes les mêmes capacités. L'étude des étapes précoces du développement permet d'appréhender progressivement le « concept » de cellule souche. Du zygote au blastocyste, puis à l'adulte, le développement embryonnaire est à l'origine des cellules souches de l'organisme et permet de mettre en évidence leurs propriétés communes et la spécialisation à l'origine de leur diversité.

Une cellule souche constitue avant tout un point de départ. Le point de départ de cette introduction vise à définir les propriétés des cellules souches en prenant pour exemple les cellules souches de l'adulte. Cette parenthèse indispensable ainsi faite, nous continuerons par le commencement : de la cellule œuf à la gastrulation, dans le seul but d'appréhender en toute modestie les phénomènes à l'origine de la diversité et de la spécialisation des cellules souches. Viendra alors le moment de présenter la Cellule Souche Hématopoïétique (CSH), ses propriétés, et les modalités permettant sa caractérisation *in vivo* et *in vitro*. Le décor ainsi planté, l'histoire nous rattrape et nous rappelle que l'étude de l'ontogenèse du système hématopoïétique est récente, et riche d'expériences pionnières. C'est sur les bases de données acquises chez le poulet, que deux sites distincts d'émergence de cellules hématopoïétiques ont été découverts chez les embryons de vertébrés supérieurs. Comme nous pourrons le voir lors de la description des sites hématogènes de l'embryon de souris et des propriétés des cellules produites, l'embryon constitue un outil formidable pour

l'analyse des propriétés et des mécanismes d'émergence des CSH. Mais commençons par le début, qui constitue une fin en soit : qu'est ce qu'une cellule souche ?

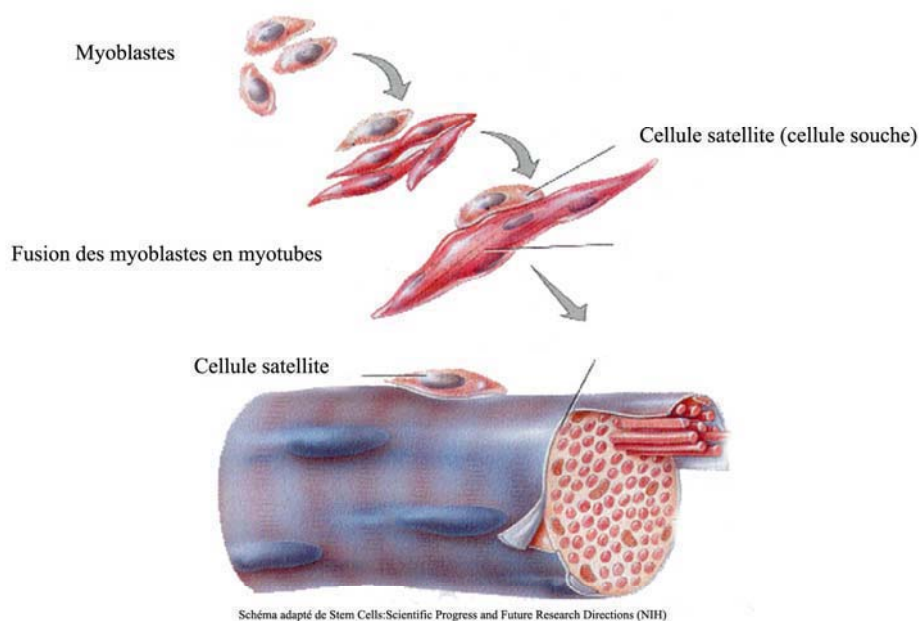
I/ La cellule Souche comme point de départ

a) Les cellules souches de l'adulte :

Les cellules souches sont peu nombreuses dans les tissus normaux, et leur taux de multiplication est très variable d'un tissu à l'autre. En dehors d'une agression externe, il est soit pratiquement nul (Cellules souches hépatiques), soit permanent, mais à taux variable en fonction des stimuli de l'environnement (Cellules souches de la peau). Les cellules souches au sens large n'expriment à priori aucun marqueur de surface commun, ni aucun gène spécifique permettant leur localisation dans l'organisme. L'anatomie particulière (architecture simple) de certains tissus permet d'en caractériser certaines, et d'en suivre le devenir. Par exemple, les cellules souches du muscle squelettique, ou cellules satellites, sont juxtaposées aux fibres musculaires, sous la lame basale où elles sont, dans le muscle adulte, dans un état qualifié de quiescent (Hepple, 2006; Sinanan et al., 2006) (Figure 1). Lors d'une lésion, elles adoptent un phénotype activé et prolifèrent sous forme de cellules mononuclées qui s'engagent dans la voie de différenciation nécessaire à la réparation des fibres lésées. Durant cette étape, une minorité de ces cellules échappe à la prolifération et retourne à un état quiescent sans s'être différenciées, permettant ainsi de restaurer et d'entretenir la population des cellules satellites.

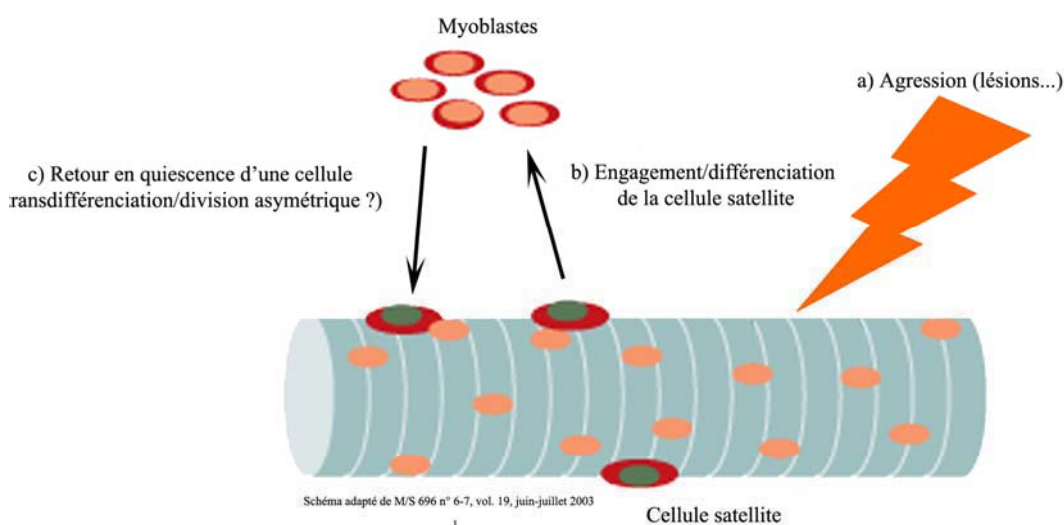
Caractéristiques communes aux cellules souches : D'une manière générale, quel que soit le tissu considéré, les cellules souches sont toujours identifiables par leur fonction. Elles assurent l'homéostasie et le maintien physiologique de la fonction d'un organe ou d'un tissu. Elles sont capables de remplacer les cellules mortes et assurent par là même la pérennité de la fonction d'un organe pendant la vie de l'individu. Pour assurer ces fonctions, une cellule souche doit être capable de se maintenir dans le temps en se multipliant à l'identique, c'est ce qu'on définit comme « l'autorenouvellement » (Morrison et al., 1997). Cette propriété assure le maintien du « contingent » de cellules souches de l'organisme. Elles doivent également avoir la capacité de se différencier pour produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique. Les cellules souches ont donc pour dénominateur commun leur capacité à s'autorenouveler et à se différencier. Ces deux points permettent de caractériser fonctionnellement les cellules souches, mais ne rendent pas compte de leur diversité.

Figure 1 : les cellules souches du muscle squelettique



A/ Formation du muscle et cellules souches musculaires :

Les myoblastes mononucléés fusionnent pour former les myotubes qui constituent le muscle. Les cellules satellites sont situées sous la lame basale des fibres musculaire et sont dans un état de quiescence.

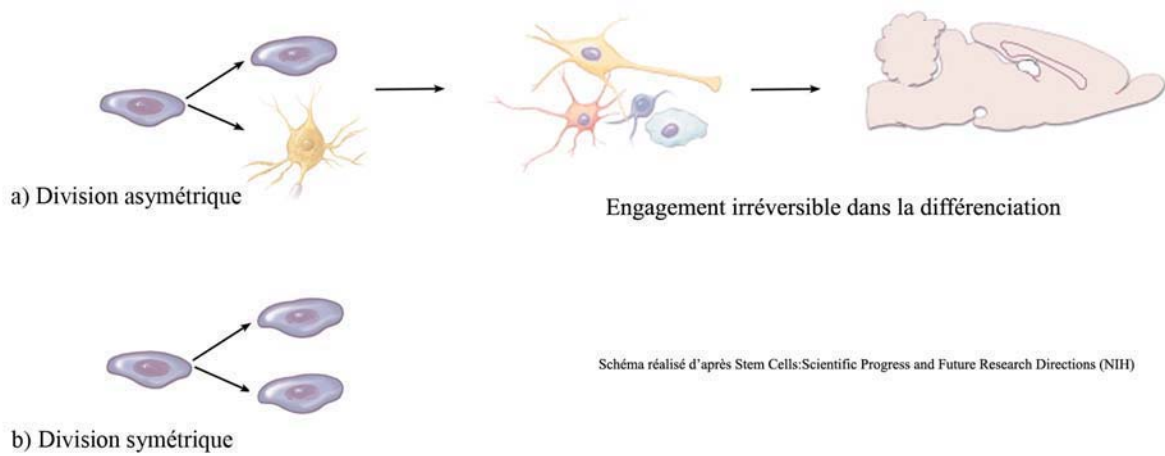


B/ Les cellules satellites assurent la régénération du muscle lésé :

a) Après une lésion musculaire, b) les cellules satellites qui sont quiescentes adoptent un phénotype actif et prolifèrent pour régénérer le muscle. c) Une minorité d'entre elles échappe à la prolifération et retournent à un état quiescent sans s'être différenciées, cette capacité d'autorenouvellement permet de restaurer la population de cellules satellites précurseurs.

Autorenouvellement versus différenciation : Toutes les cellules souches n'ont pas le même potentiel de différenciation, celui-ci est le plus souvent associé aux tissus dont elles sont issues. Dans un premier temps, intéressons nous à leur capacité d'autorenouvellement : Classiquement, on considère que la division d'une cellule souche produit une nouvelle cellule souche (cellule de réserve) et une cellule s'engageant dans un processus de différenciation qui la conduira à remplir une fonction précise. Théoriquement, la division d'une cellule souche peut donner naissance à une autre cellule souche selon deux modalités faisant intervenir le mode de division cellulaire (Figure 2).

Figure 2 : Modalités de division des cellules souches



La division d'une cellule souche peut donner naissance à une autre cellule souche selon deux modalités faisant intervenir le mode de division cellulaire : a) La division est de type asymétrique, dans ce cas, les deux cellules filles ne sont pas identiques et l'on obtient d'une part une cellule souche et de l'autre une cellule engagée dans un lignage particulier, b) La division est dite symétrique et permet d'obtenir deux cellules souches filles identiques.

Dans le premier cas, la division est dite symétrique et permet d'obtenir deux cellules souches filles identiques. La division peut aussi être de type asymétrique, dans ce cas, les deux cellules filles ne sont pas identiques et l'on obtient d'une part, une cellule souche et de l'autre une cellule engagée dans un lignage particulier (Ho, 2005; Morrison and Kimble, 2006). Parce qu'elle est indispensable, la capacité d'autorenouvellement est indissociable de « l'activité cellule souche ». Pourtant, il apparaît que la diversité des cellules souches ne repose pas uniquement sur leur potentiel de différenciation.

L'analyse des mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués dans l'autorenouvellement n'a pour l'instant pas permis de mettre à jour un mécanisme général et conserver dans les différents types de cellules souches. Cette propriété s'accompagne le plus souvent d'un « blocage de la différenciation » et la plupart des gènes communs impliqués dans ce phénomène sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Burdon et al., 2002; Niwa, 2001). En ce qui concerne la différenciation, les gènes impliqués sont par définition différents puisqu'ils sont spécifiques d'un lignage.

b) Différents types de cellules souches

Tous les êtres vivants pluricellulaires possèdent des cellules souches. Le terme de cellule souche est générique. Il désigne des cellules capables d'engendrer des types cellulaires différents. En d'autres termes, une cellule souche possède un répertoire de différenciation qui la caractérise (Figure 3).

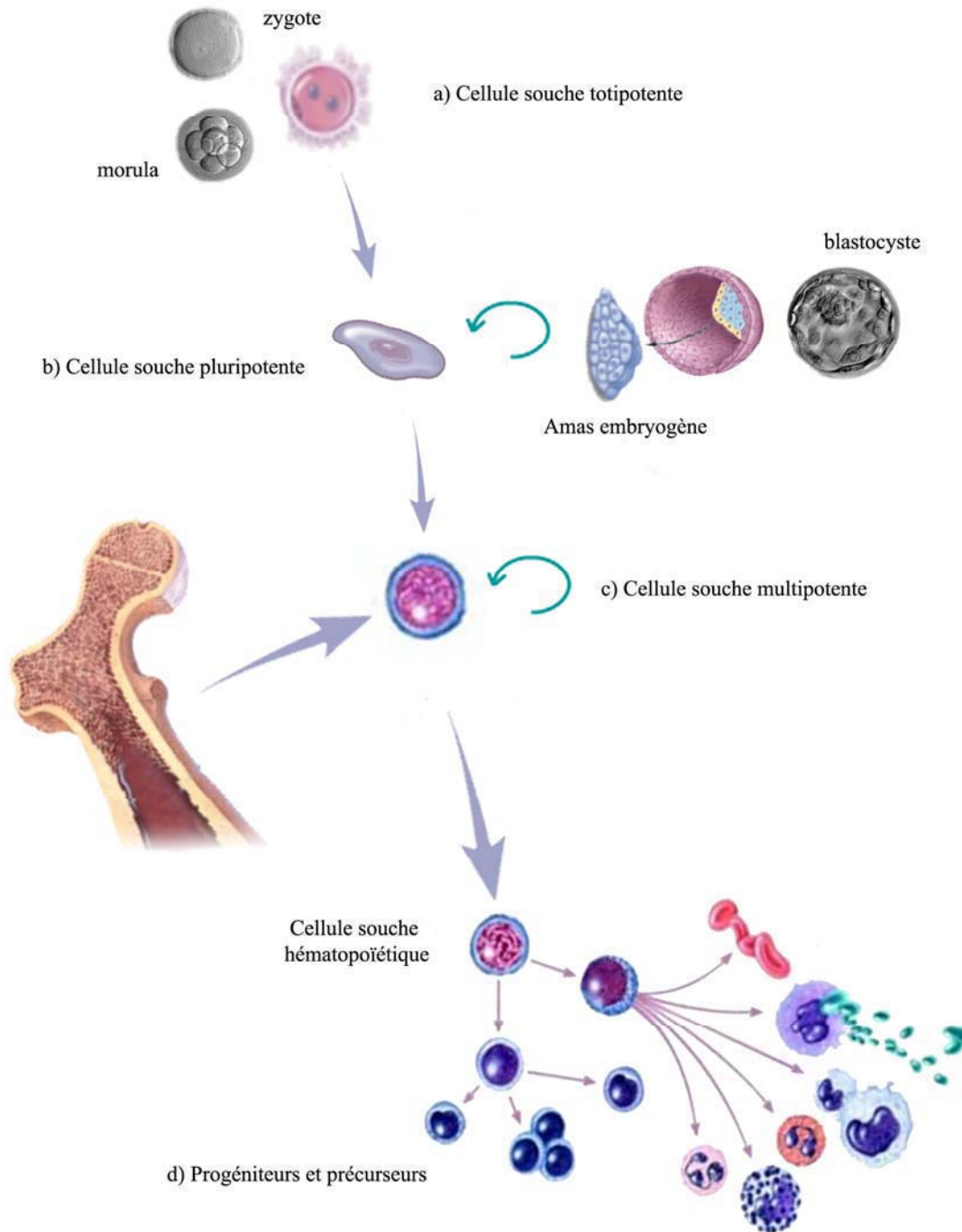
Les cellules totipotentes : Les cellules qui ont la capacité de développer un organisme complet sont qualifiées de totipotentes (du latin «pouvoir tout»). Après fusion de l'ovule et du spermatozoïde naît la cellule œuf ou zygote. Cette cellule peut se développer dans l'utérus en un organisme comptant quelque deux cent types cellulaires différents. L'ovule fécondé est totipotent ainsi que chacune des huit premières cellules (blastomères) qui en dérivent.

Les cellules souches pluripotentes ou cellules souches embryonnaires : Au cours du développement embryonnaire, les cellules se spécialisent de plus en plus et leur capacité de différenciation diminue progressivement. Les cellules souches pluripotentes ou cellules souches embryonnaires (ES cells : Embryonic Stem Cells) sont issues de la masse interne du blastocyste et sont capables, après injection dans le blastocyste, de coloniser tous les tissus de l'organisme (y compris la lignée germinale), donnant ainsi naissance à des chimères. En culture, les cellules ES ont une capacité de prolifération quasi-illimitée, permettant l'accumulation d'un nombre très élevé de cellules, et l'isolement de lignées présentant les caractéristiques de cellules primaires. Les cellules ES conservent un génotype et un caryotype normal et accumulent peu de mutations. Elles sont clonales, et leur potentiel est donc identique. Toutes ces propriétés leur confèrent un avantage unique pour analyser les mécanismes à l'origine des propriétés d'autorenouvellement et de spécification de lignage des cellules souches (Rossant, 2001).

Les cellules souches multipotentes ou cellules souches de l'adulte : Elles ne produisent qu'un nombre restreint de types cellulaires. On les trouve dans l'organisme adulte et dans l'embryon où elles sont déjà très spécialisées et ne peuvent plus se différencier qu'en un seul type de cellules. Par exemple, les cellules souches du tube digestif renouvellent en permanence le revêtement de l'intestin, celles de la peau assurent l'approvisionnement en nouvelles cellules cutanées et celles de la moelle osseuse renouvellent tous les types de cellules sanguines.

La caractérisation d'une cellule souche implique d'identifier sa descendance. De ce fait, elle est indirecte et rétrospective. Il est généralement admis (mais rarement démontré) que les cellules souches de l'adulte sont générées au cours de l'embryogenèse : du zygote au blastocyste, nous allons voir comment à partir d'une cellule totipotente, une série d'évènements à priori « anodins » vont aboutir progressivement à l'émergence d'une nouvelle population de cellules souches, les cellules souches pluripotentes.

Figure 3 : Différents types de cellules souches



a) De la cellule œuf au stade de huit cellules, les cellules de l'embryon sont totipotentes. b) Plus tard, seules les cellules de l'amas embryogène du blastocyste, contribuent à la formation de tous les tissus de l'embryon par opposition aux cellules totipotentes, les cellules constituant l'amas embryogène sont pluripotentes. c) C'est pendant et à l'issue de la gastrulation que s'effectue la spécification de lignage cellulaire qui aboutie à l'apparition des premières cellules souches multipotentes qui en se différenciant seront à l'origine des progéniteurs, des précurseurs et finalement des cellules matures.

II/ Du zygote au blastocyste : les cellules souches pluripotentes

Malgré l'existence d'une embryogenèse ayant quelques traits atypiques, la souris constitue un modèle de choix pour étudier le développement des mammifères et les mécanismes à l'origine de l'émergence des cellules souches de l'adulte. Nous allons voir dans cette partie comment une succession d'évènements fondamentaux aboutit à la spécialisation cellulaire et à l'émergence d'une population de cellules souches pluripotentes à partir des tous premiers blastomères, mettant en évidence une restriction de potentiel de la cellule œuf au cours du développement. Cette décision capitale semble dépendre de la place occupée par les blastomères à un moment décisif, accordant un rôle crucial au microenvironnement cellulaire sur la spécification de lignage.

a) La compaction est à l'origine des cellules souches pluripotentes

Jusqu'au stade huit cellules, les blastomères de mammifères sont totipotents et forment un arrangement lâche. Au moment de la compaction, les cellules en position interne ou externe acquièrent des propriétés extrêmement différentes (Kimber and Surani, 1982; Pratt et al., 1982; Sutherland et al., 1990). Le déroulement des étapes ultérieures de la segmentation est profondément influencé par cet évènement : selon l'orientation des plans de divisions par rapport à l'axe de polarité possédé par les blastomères, émergent deux populations distinctes de cellules, dont les destinées sont hautement divergentes (Figure 4). Les cellules situées au centre du germe vont constituer l'amas embryogène (ou bouton embryonnaire), alors que celles en position externe vont former une structure épithéliale aplatie, le trophoblaste. Alors que l'amas embryogène donne naissance à l'embryon, les cellules du trophoblaste ne forment pas de structure embryonnaire et participe principalement à l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine.

Au stade 64 cellules, la partition des blastomères aboutit à la formation du blastocyste qui est constitué d'une couche de cellules épithéliales externes, le trophoctoderme qui dérive du trophoblaste et du bouton embryonnaire, interne, qui contient les premières cellules souches pluripotentes.

b) Cellules totipotentes versus cellules pluripotentes

De la cellule œuf au stade de huit cellules, les cellules de l'embryon sont totipotentes. Plus tard, seules les cellules de l'amas embryogène, au contraire de celles du trophoblaste, contribuent à la formation de tous les tissus de l'embryon lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste. On assiste donc à la première restriction du potentiel de différenciation de la cellule œuf. Par opposition aux cellules totipotentes, les cellules constituant l'amas embryogène sont pluripotentes (Tam, 1997; Zernicka-Goetz, 2002), puisqu'elles ne participent pas à la formation du trophoblaste. Cette observation va avoir des conséquences très importantes dans l'étude du développement des mammifères. En effet, quand ces cellules pluripotentes sont isolées et cultivées dans certaines conditions (Figure 5), elles peuvent être maintenues à l'état indifférencié et

continuent à proliférer en culture. Ces cellules sont appelées cellules souches embryonnaires ou cellules ES (voir chapitre I/b).

III/ Du blastocyste à l'adulte, les cellules souches multipotentes.

La gastrulation est un processus morphogénétique de réorganisation des cellules entourant la cavité du blastocyste, qui comprend alors deux feuillets, l'épiblaste, interne, et l'endoderme primitif, externe (Figure 6). Ces mouvements cellulaires aboutissent à la mise en place, à partir de l'épiblaste, des trois feuillets embryonnaires caractérisant les organismes triblastiques (à trois feuillets) : un feuillet externe, l'ectoderme ; un feuillet interne, l'endoderme, et un troisième feuillet intermédiaire, le mésoderme. La gastrulation est une étape clé dans la formation de l'organisme adulte. C'est pendant et à l'issue de la gastrulation que s'effectue la spécification de lignage cellulaire qui aboutit à l'organogenèse.

Lors de ce processus, les cellules des différents feuillets s'organisent en territoires qui participeront à l'architecture des différents organes. C'est au sein de ces tissus en voie de différenciation fonctionnelle qu'il devient possible de caractériser les premières cellules souches multipotentes, « précurseurs » des cellules souches de l'adulte.

Ainsi, au moment de la gastrulation, le décor change et les cellules souches embryonnaires quittent la scène au profit d'actrices différentes. Ces cellules ont perdu leur pluripotence et vont progressivement acquérir un potentiel de différenciation spécifique, directement associé au feuillet, puis au territoire où elles résident.

a) Spécification des feuillets embryonnaires et cellules souches multipotentes

L'objectif de cette partie est de montrer en quoi les événements morphogénétiques de réorganisation des cellules de l'épiblaste au cours de la gastrulation participent à l'apparition des cellules souches multipotentes. Nous allons voir comment, à partir d'une population de cellules pluripotentes, la formation des trois feuillets fondamentaux constitue une nouvelle étape de restriction de potentiel.

La gastrulation consiste en une internalisation de l'épiblaste le long d'une structure appelée ligne primitive. L'extrémité supérieure de la ligne primitive contient une dépression de l'épiblaste, entourée par une petite surélévation, le Noeud. Les cellules épiblastiques se détachent le long de la ligne primitive et migrent en profondeur pour former le mésoderme, dans l'espace virtuel situé entre l'épiblaste et l'endoderme viscéral (primitif).

La formation des trois feuillets fondamentaux : Au cours de la gastrulation, l'épiblaste s'organise pour former les trois feuillets embryonnaires fondamentaux : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. L'endoderme, issu de la gastrulation (définitif), repousse progressivement, dans le compartiment intra-embryonnaire, l'endoderme viscéral, ou primitif, qui restera restreint au compartiment extra-embryonnaire

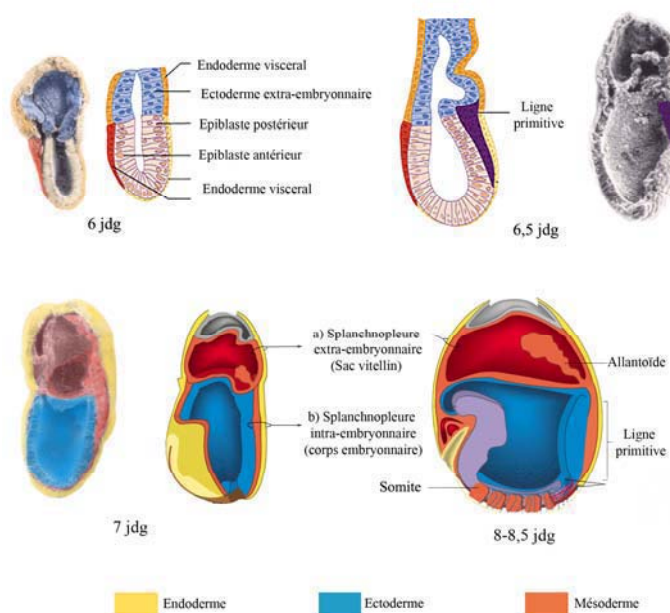
(Lawson et al., 1986). A la fin de la gastrulation, l'ensemble des territoires mésodermiques est inséré, formant pour la partie embryonnaire une structure tridermique (endoderme, mésoderme et ectoderme) et pour la partie extra-embryonnaire, une structure didermique (endoderme et mésoderme) (Figure 6).

Dans les deux compartiments (intra- et extra-embryonnaires), le mésoderme où apparaissent les cellules hématopoïétiques est associé à de l'endoderme dont l'origine diffère (endoderme primitif dans SV et définitif dans l'embryon) (Tam and Beddington, 1992). De plus, comme nous allons le voir ci-dessous, les mésodermes intra- et extra-embryonnaires ne sont pas issus du même territoire épiblastique. Ces deux éléments vont avoir des conséquences très importantes sur l'interprétation des phénomènes à l'origine de l'émergence des cellules sanguines au sein de l'embryon.

Cinétique d'invagination des cellules de l'épiblaste et origine du « mésoderme hématopoïétique » :

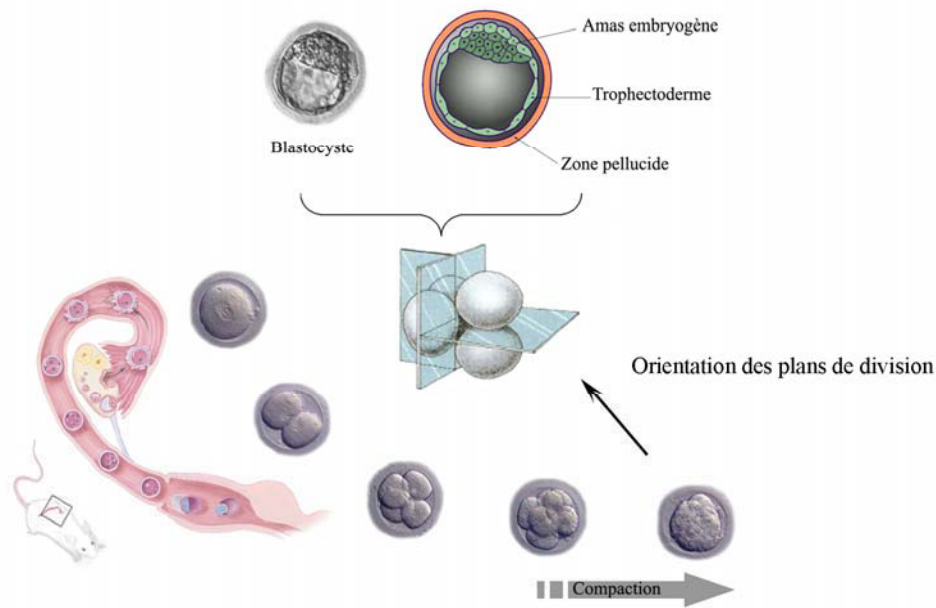
Au début de la gastrulation, le mésoderme formé est du mésoderme extra-embryonnaire. La ligne primitive progresse de façon proximo-distale. Les territoires épiblastiques précurseurs du mésoderme et de l'endoderme embryonnaires se trouvent recrutés après ceux des territoires du mésoderme extra-embryonnaire. En effet, l'ordre dans lequel s'effectue le recrutement des territoires cellulaires vers la zone d'invagination reflète leur distribution selon un axe antéropostérieur : les territoires localisés postérieurement près de la ligne primitive sont recrutés avant ceux situés latéralement, eux-mêmes précédant les zones présentes dans la région antérieure.

Figure n°6 : Mise en place du mésoderme intra- et extra-embryonnaire



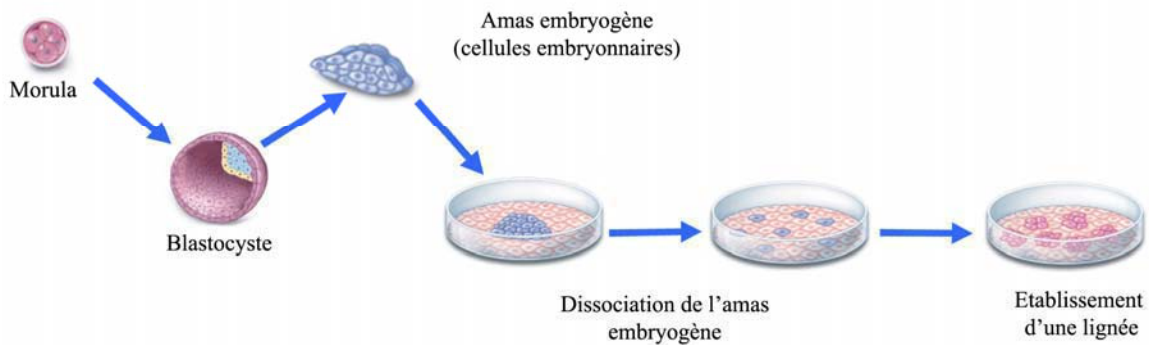
Au cours de la gastrulation, l'épiblaste s'organise pour former les trois feuillets embryonnaires fondamentaux : l'ectoderme, l'endoderme (définitif) et le mésoderme. Le mésoderme au contact de l'endoderme viscéral (primitif) est dit extra-embryonnaire (mésoderme du Sac Vitellin) et le mésoderme intercalé entre l'endoderme définitif (produit de la gastrulation) et l'ectoderme est dit intra-embryonnaire. Dans les deux compartiments, le mésoderme où apparaissent les cellules hématopoïétiques est associé à de l'endoderme pour former de la splanchnopleure intra- ou extra-embryonnaire. On assiste donc à l'apparition de deux territoires embryonnaires distincts : a) les annexes extra-embryonnaires : sac vitellin et allantoïde et b) le corps embryonnaire proprement dit.

Figure 4 : La compaction est à l'origine des cellules souches pluripotentes



Au moment de la compaction, les blastomères totipotents présentent des divisions orientées. Selon l'orientation des plans de divisions par rapport à l'axe de polarité des blastomères, émergent deux populations distinctes de cellules. Les cellules situées au centre du germe vont constituer l'amas embryogène, alors que celles en position externe, vont former une structure épithéliale aplatie : le trophoblaste.

Figure n°5 : Modalités d'obtention des cellules souches embryonnaires



Les cellules souches pluripotentes ou cellules souches embryonnaires ("ES cells" : Embryonic Stem cells) sont issues de l'amas embryogène et sont capables, après injection dans un blastocyste, de coloniser tous les tissus de l'organisme (y compris la lignée germinale), donnant ainsi naissance à des chimères. En culture, les cellules ES ont une capacité de prolifération quasi-illimitée, permettant l'accumulation d'un nombre très élevé de cellules, et l'isolement de lignées présentant les caractéristiques de cellules primaires.

b) Spécification des feuillets embryonnaires et cellules souches multipotentes

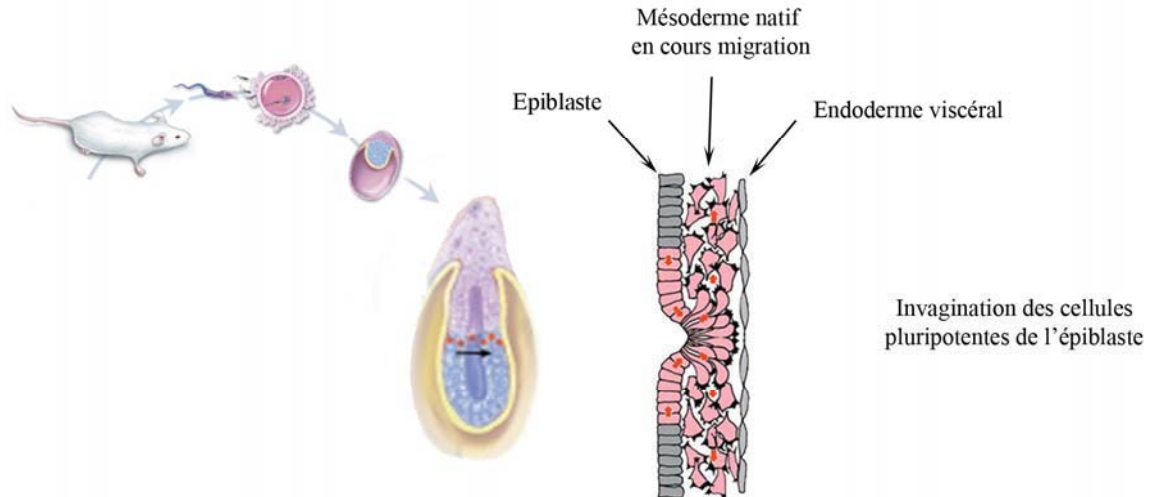
La plupart des cellules épiblastiques, y compris celles qui migrent à travers la ligne primitive, sont pluripotentes, c'est-à-dire capables de se développer dans la plupart des types cellulaires de l'organisme (Hatano et al., 2005). Leur destinée dépend de l'endroit de l'embryon où elles se rendent. En fonction de leur position et du moment de leur invagination dans la ligne primitive, elles auront une destinée différente. Elles s'invaginent le long de la ligne primitive et se différencient en cellules mésodermiques pour constituer progressivement le mésoderme axial (notochorde), paraxial (somites), intermédiaire et latéral (Figure 7). Lors de la formation de la cavité coelomique, le mésoderme latéral se scinde en deux pour former deux feuillets. Le feuillet dorsal où le mésoderme est en contact avec de l'ectoderme, est dit somatopleural, alors que le feuillet ventral où le mésoderme, associé à de l'endoderme, est qualifié de splanchnopleural.

Origine embryonnaire des cellules souches multipotentes : Les différents territoires cellulaires mis en place dans l'embryon pendant la gastrulation vont progressivement s'engager dans différentes voies de différenciation permettant l'apparition des organes du futur adulte. D'une manière générale, les modalités régissant la spécification des cellules souches dans l'embryon suggèrent que les cellules filles des cellules souches, ont des capacités de différenciation de plus en plus restreintes. Elles donnent naissance à des progéniteurs, qui produisent à leur tour les précurseurs, à l'origine de la formation des cellules spécialisées de l'organe.

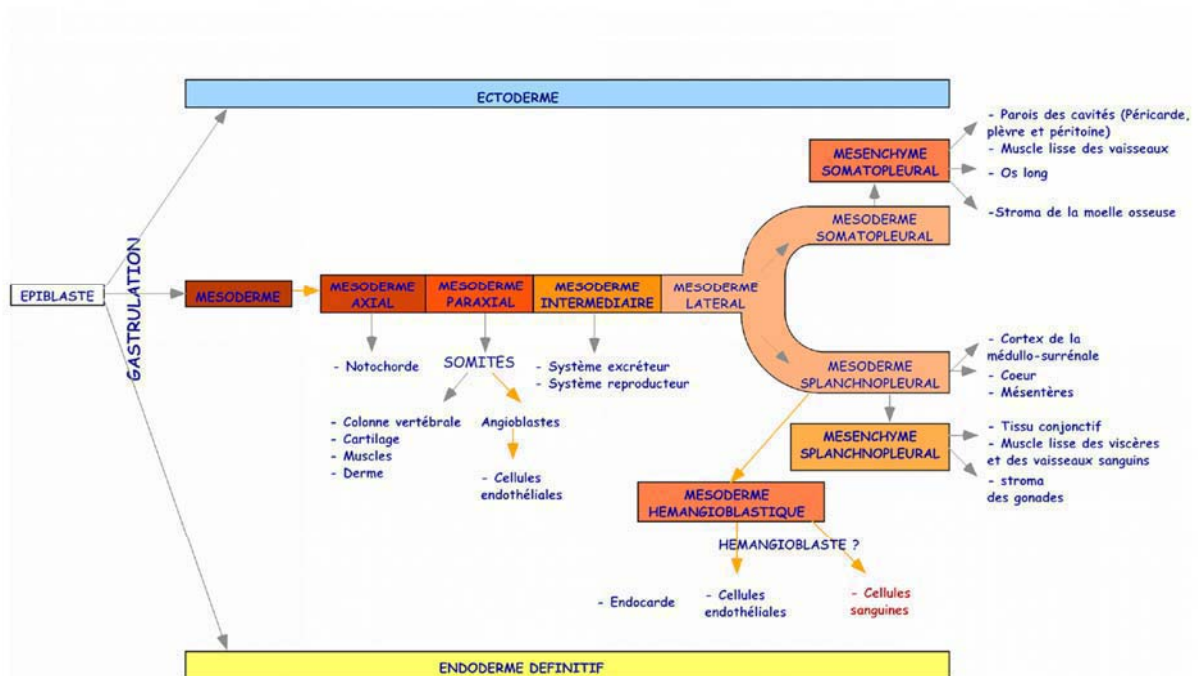
D'un autre point de vue, les organes se formeraient progressivement en fonction de l'apport en cellules à partir de la ligne primitive, et « les dernières cellules arrivées » participeraient alors à la formation d'un contingent de cellules souches. Dans les deux cas, il apparaît évident qu'une nouvelle étape de spécialisation des cellules pluripotentes de l'épiblaste est responsable de la spécification des lignages cellulaires à l'origine de la diversité des types cellulaires composant l'embryon en cours d'organogenèse. La plupart des cellules épiblastiques qui s'invaginent dans la ligne primitive sont pluripotentes. Partant de ce constat, c'est au cours de leur migration ou au contact d'un nouveau microenvironnement que ces cellules acquièrent leurs spécificités (Kanatsu et al., 1997; Watson and Tam, 2001). Le feuillet d'origine est déterminant pour le choix du devenir cellulaire d'une cellule épiblastique : les cellules souches neurales sont originaires de l'ectoderme et les cellules souches hépatiques de l'endoderme définitif.

Néanmoins, ceci ne constitue pas une règle stricte et certaines cellules ne répondent pas à ce critère. Les cellules des crêtes neurales (Harris and Erickson, 2006), qui dérivent de l'ectoderme, sont des cellules capables de produire des cellules différenciées appartenant aux trois feuillets embryonnaires. Dans une certaine mesure, elles ont conservé leur pluripotence (Figure 8). De même, les cellules germinales primordiales, localisées dans le mésoderme, sont des cellules qui participent à la formation des gamètes, et peuvent être considérées comme un contingent de cellules souches totipotentes.

Figure 7 : Spécification des feuillets embryonnaires



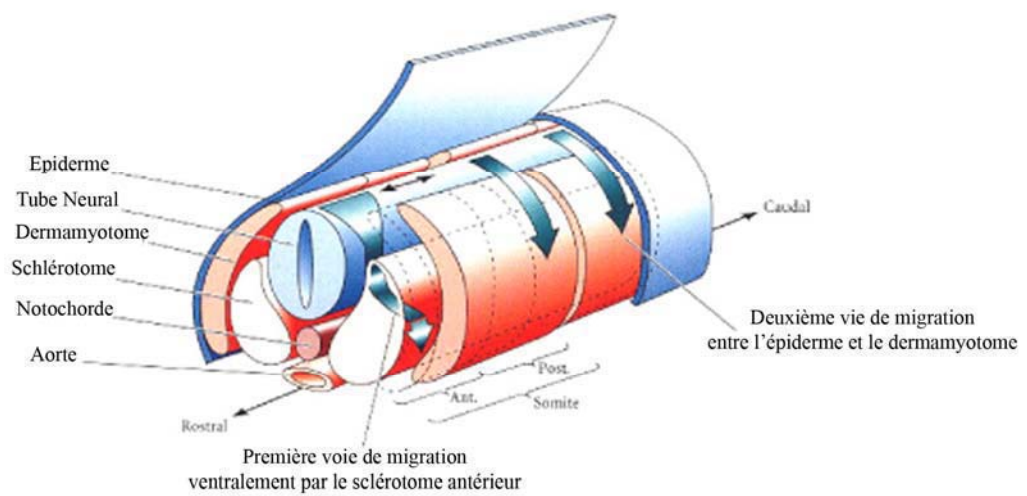
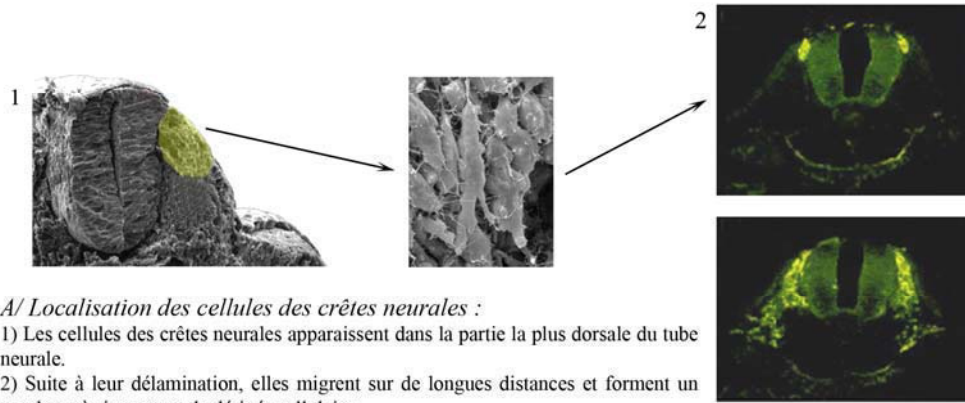
A/ Invagination des cellules de l'épiblaste le long de la ligne primitive



B/ Devenir des cellules de l'épiblaste

La ligne primitive progresse de façon proximo-distale. Les territoires épiblastiques, précurseurs du mésoderme et de l'endoderme embryonnaires, se trouvent recrutés après ceux des territoires du mésoderme extra-embryonnaire. Les cellules épiblastiques, qui migrent à travers la ligne primitive, sont pluripotentes. Leur destinée dépend de l'endroit de l'embryon où elles se rendent. En fonction de leur position et du moment de leur invagination dans la ligne primitive, elles auront une destinée différente. Le début de la régression de ligne primitive dans la partie postérieure de l'embryon annonce le début de l'organogenèse.

Figure 8 : Les cellules des crêtes neurales sont multipotentes



B/ Voie de migration des cellules des crêtes neurales :

L'un des caractères les plus fascinant des cellules des crêtes neurales est qu'elles constituent une population de cellules pluripotentes dans l'embryon. Elles sont capables de générer des dérivés du système nerveux périphérique, des dérivés endocrines et para-endocrines, des mélanocytes, des dérivés ectomésenchymateux (cartilage et os du squelette de la face) et des tissus conjonctifs (thymus, hypophyse et thyroïde).

Deuxième Partie

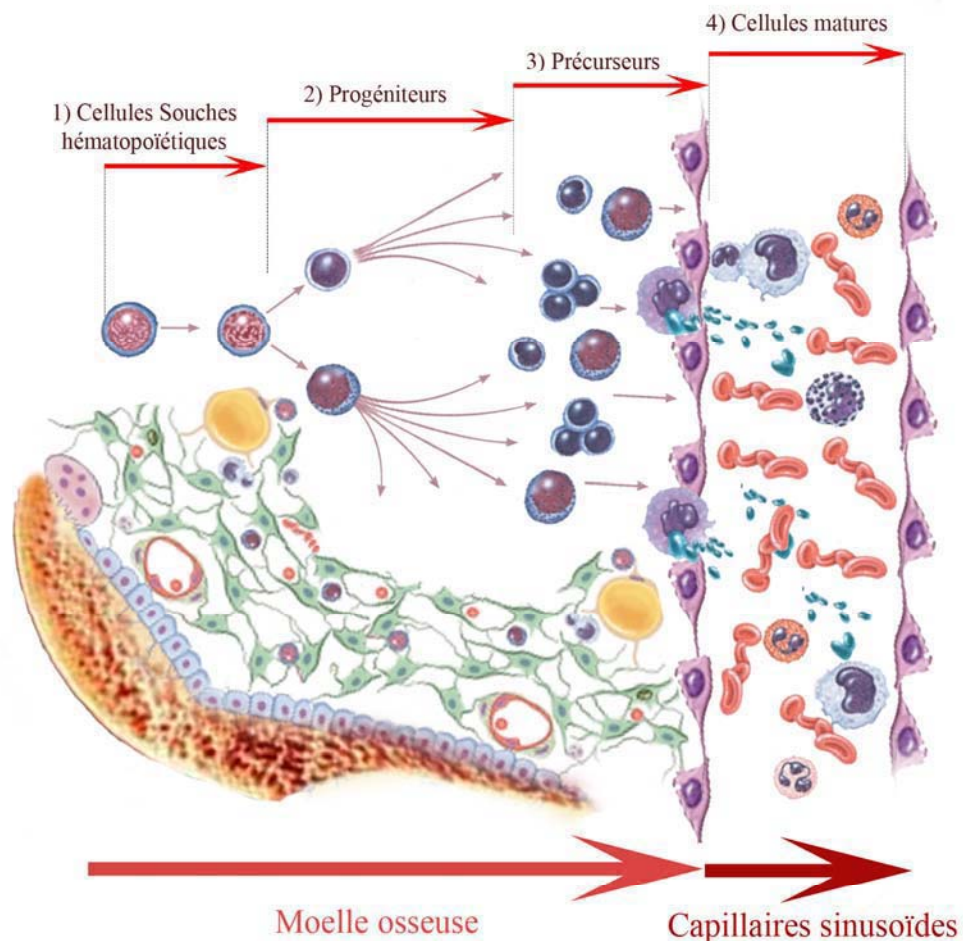
La Cellule

Souche Hématopoïétique

I/ La cellule souche hématopoïétique, une course pour la vie, la survie

De la cellule œuf à l'adulte, cette première partie nous a permis de décrire les événements qui au cours de l'embryogenèse aboutissent à la mise en place des différentes cellules souches de l'organisme. L'objectif de mon travail de thèse consistait à effectuer l'analyse au cours du développement de facteurs potentiellement impliqués dans les différentes propriétés des CSH de l'embryon de souris. Afin d'appréhender ces étapes, nous devons au préalable disposer des éléments permettant de caractériser *in vivo* et *in vitro* les propriétés générales des cellules CSH. C'est pourquoi, nous débuterons cette partie consacrée à l'hématopoïèse, par la description des principales caractéristiques des CSH de l'adulte.

Figure 9 : Compartimentation du système hématopoïétique



Les cellules différenciées de chacune des lignées sanguines (érythroïde, myéloïde, mégacaryocytaire et lymphocytaire) sont renouvelées en permanence à partir du pool de cellules souches hématopoïétiques. Le tissu hématopoïétique est constitué de quatre compartiments cellulaires : 1) Les cellules souches hématopoïétiques, 2) les progéniteurs, 3) les précurseurs et 4) les cellules matures.

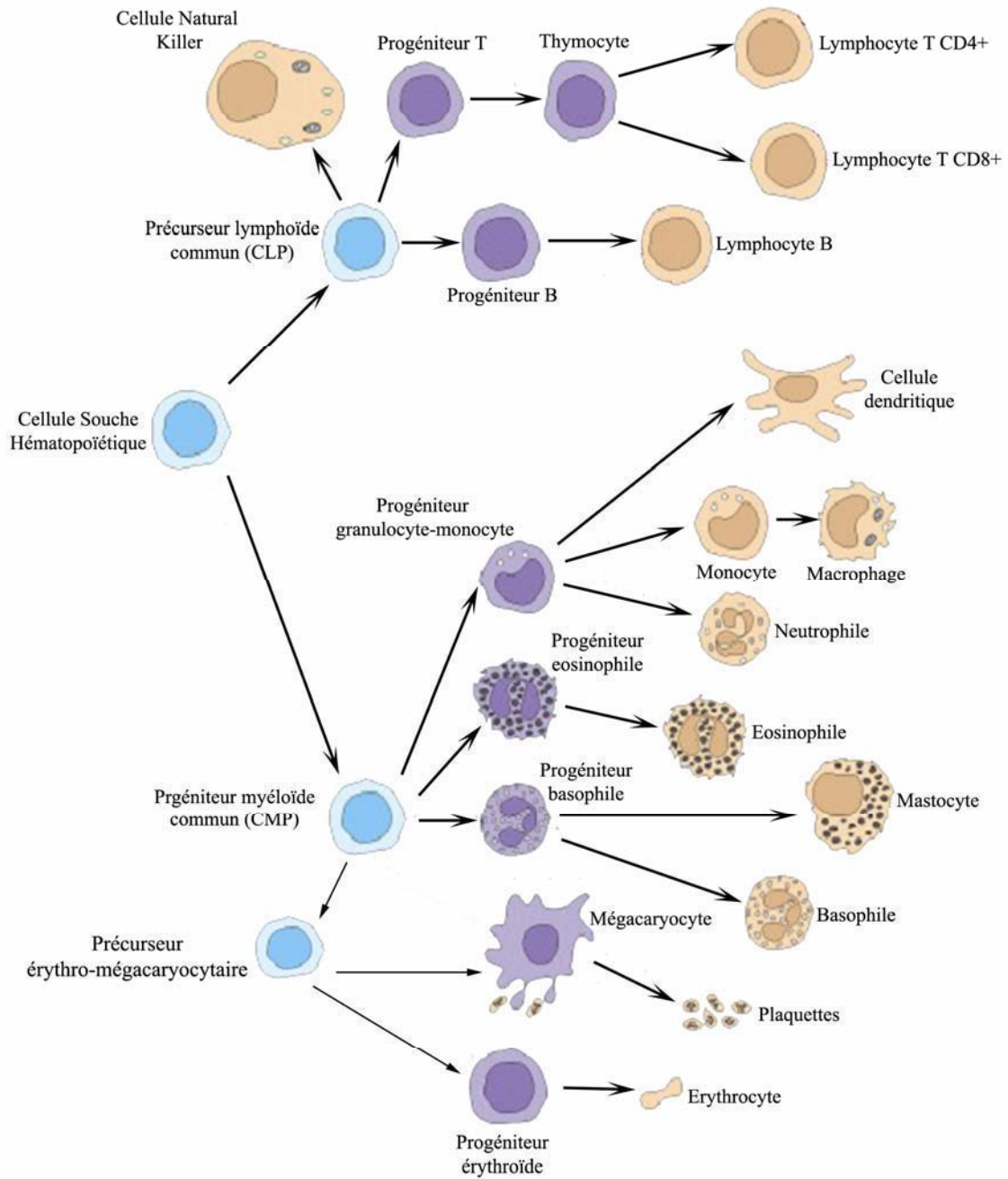
a) A l'origine du tissu hématopoïétique, la cellule souche hématopoïétique

Il est en général admis que le contingent de CSH de l'adulte est constitué au cours de la vie embryonnaire. Les premières cellules sanguines apparaissent au niveau du SV entre 8 et 8,5 jours de gestation (jdg). Dès 12 jdg, le relais est pris par le foie fœtal (FF) à partir duquel les CSH colonisent la moelle osseuse (MO) qui constitue alors l'organe hématopoïétique majeur de l'adulte. Les CSH présentent deux propriétés essentielles : d'une part, elles ont une capacité d'autorenouvellement, d'autre part, elles sont multipotentes et capables de se différencier vers l'ensemble des lignages médullaire, splénique et thymique.

Multipotentialité des cellules souches hématopoïétiques : Chez l'adulte, les cellules différenciées de chacune des lignées sanguines (érythroïdes, myéloïdes, mégacaryocytaires et lymphoïdes) sont renouvelées en permanence à partir d'un contingent de CSH selon un processus hiérarchisé d'expansion et de restriction progressive de lignage. L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes de prolifération et de différenciation qui conduisent à la production continue et régulée de cellules sanguines fonctionnelles et matures. Chez la souris, le tissu hématopoïétique est principalement situé dans la moelle osseuse et dans la rate (Metcalf and Moore, 1971) et il est composé de quatre compartiments cellulaires : les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Les CSH prolifèrent et s'engagent dans la différenciation des progéniteurs, puis des précurseurs et enfin des cellules matures (Figure 9). La maturation cytologique des différents types de précurseurs conduit à la formation des différents types de cellules composant les éléments figurés du sang. Le sang est majoritairement composé

d'érythrocytes (globules rouges) qui sont anucléés chez l'adulte. Ce point est important car il distingue les érythrocytes de l'adulte de ceux de l'embryon (primitifs) qui sont transitoirement nucléés. Nous reviendrons plus en détail sur cette distinction lorsque nous définirons pour l'embryon les termes d'érythropoïèse et d'hématopoïèse définitive versus primitives. Le sang contient également des plaquettes qui sont produites à partir d'une cellule appelée mégacaryocyte. Par opposition au lignage rouge (érythrocytes et plaquettes), les autres cellules sont couramment appelées globules blancs ou leucocytes. On distingue les cellules lymphoïdes (B, T et « Natural Killer ») de la lignée myéloïde comprenant des cellules « mononuclées » ou monocytes, qui se différencient en macrophage, les cellules dendritiques, ainsi que les polynucléaires qui regroupent les neutrophiles, basophiles et éosinophiles (Figure 10).

Figure 10 : Organisation hiérarchique de l'hématopoïèse



Les CSH produisent l'ensemble des cellules différenciées qui permettent le transport de substances et la protection de l'organisme. La maturation cytologique des précurseurs conduit à la formation des différents types de cellules composant les éléments figurés du sang. La lignée érythro-mégacaryocytaire est à l'origine des érythrocytes et des plaquettes, la lignée myéloïde comprend des monocytes qui se différencient en macrophages, ainsi que les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) et les cellules dendritiques. La lignée lymphoïde comprend les cellules B, T et NK.

Caractérisation des CSH de l'adulte *in vivo* : La notion de l'existence dans l'organisme d'une cellule capable de générer ces différents types de cellules hématopoïétiques fut pour la première fois suggérée en 1924. Maximow propose l'existence d'une cellule originaire du mésenchyme de l'embryon et capable de produire toutes les cellules du système hématopoïétique (Maximow, 1924). L'existence des CSH a été mise en évidence au début des années 60 dans un modèle murin dans lequel l'aplasie médullaire consécutive à une irradiation létale pouvait être corrigée par une greffe de moelle osseuse. Cette capacité de reconstitution, révélée *in vivo*, a permis de faire la démonstration de la présence de CSH dans la MO. Ce test constitue aujourd'hui l'outil principal permettant la caractérisation des CSH *in vivo* (test RLT : Reconstitution à Long Terme). Les cellules des différentes lignées hématopoïétiques ont un taux de renouvellement très rapide. Le fait de retrouver à long terme dans le receveur irradié des cellules ayant pour origine le donneur, reflète la capacité des cellules injectées à se maintenir à l'état multipotent et donc à s'auto-renouveler.

Lors de ces mêmes expériences Till et Mc Culloch ont démontré l'existence de clones dans la rate (appelés colony forming unit-spleen, CFU-S) contenant des progéniteurs hématopoïétiques multipotents capables de générer des colonies érythroïdes, granuleuses, monocytaires et mégacaryocytaires (Figure 11A). Ils ont montré que l'injection d'une fraction de ces cellules conduisait également à la reconstitution hématopoïétique d'une souris irradiée létalement. La formation de CFU-S ne suffit pas à définir le caractère souche d'une population de cellules hématopoïétiques, puisque les CFU-S ne donnent pas toujours naissance à des lymphocytes (Abramson et al., 1977). En revanche, il est possible de détecter dans le sang ou dans la MO d'une souris reconstituée la présence de lymphocytes du donneur. On effectue le plus souvent des greffes chimériques combinant des souris exprimant l'un ou l'autre des allo-antigènes (Ly5.1 et Ly5.2) (Quesenberry et al., 2001) de la phospho-tyrosine phosphatase CD45 (marqueur pan-leucocytaire). L'analyse en cytométrie en flux des cellules du donneur permet d'évaluer au cours du temps le chimérisme dans le sang des souris reconstituées et donc la capacité de ces cellules à effectuer une reconstitution à plus ou moins long terme (Figure 11B).

Caractérisation phénotypique des CSH chez la souris adulte : Les cellules hématopoïétiques expriment à la membrane un ensemble de marqueurs protéiques spécifiques des différents lignages.

Par exemple, les lymphocytes B, T, les cellules myéloïdes et érythroïdes permettent la caractérisation de cellules spécialisées et engagées dans une voie de différenciation particulière. Dans la moelle, les CSH sont par définition indifférenciées et n'expriment a priori aucun de ces marqueurs : on dit qu'elles sont « lignages négatives » ou Lin⁻. Il est néanmoins possible d'isoler par sélection négative dans une moelle fraîchement isolée une population cellulaire enrichie en CSH. Les CSH sont définies comme étant Lin^{-/faible}, c-Kit⁺, Thy-1⁺, Sca-1⁺ (Spangrude et al., 1988).

Phénotype et capacité de reconstitution : Des analyses *in vivo* en condition de dilution limite ont montré que toutes les CSH n'arborent pas les mêmes propriétés vis-à-vis de leur capacité à reconstituer un

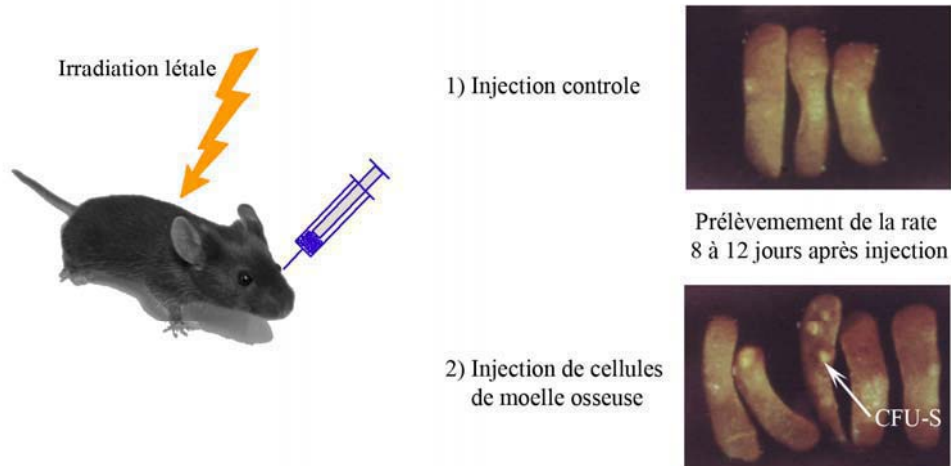
animal létalement irradié. Les cellules ainsi caractérisées ($\text{Lin}^{-/\text{faible}}$, c-Kit^+ , Thy-1^+ , Sca-1^+) restent hétérogènes et deux populations de CSH coexistent. Elles sont mises en évidence en fonction de la persistance de leur activité après injection dans un animal létalement irradié. L'une est capable d'effectuer une reconstitution hématopoïétique à long terme et douée d'un fort potentiel d'autorenouvellement (LT-CSH : Long Term CSH), et l'autre, ne permet une reconstitution que pour une période limitée et avec un potentiel d'autorenouvellement plus faible (ST-CSH : Short Term CSH). La distinction entre ces deux populations est à priori dépendante de l'intensité d'expression de l'antigène Mac-1 (CD11b : marqueur myéloïde) (Bellantuono, 2004). A l'heure actuelle, chez l'adulte, les CSH les plus « immatures » sont caractérisées fonctionnellement par leur capacité à exclure le marqueur Hoechst 33342 (Goodell et al., 1996; Goodell et al., 1997). Ces cellules sont Lin^- , Sca1^+ , c-Kit^+ , CD45^+ (Hirschi and Goodell, 2001) et sont capables de s'auto-renouveler.

En routine, la purification des CSH de souris adultes s'effectue par le tri à partir de la MO fraîchement isolée, des cellules de phénotype Lin^- , Sca-1^+ , c-kit^+ , couramment appelées LSK. Néanmoins, comme nous pourrions le voir, ce phénotype ne permet pas toujours la caractérisation des CSH. En particulier, au niveau des sites d'émergence et des différents organes colonisés lors du développement, les CSH ne répondent pas à ce phénotype.

b) Potentiel de différenciation des cellules souches hématopoïétiques :

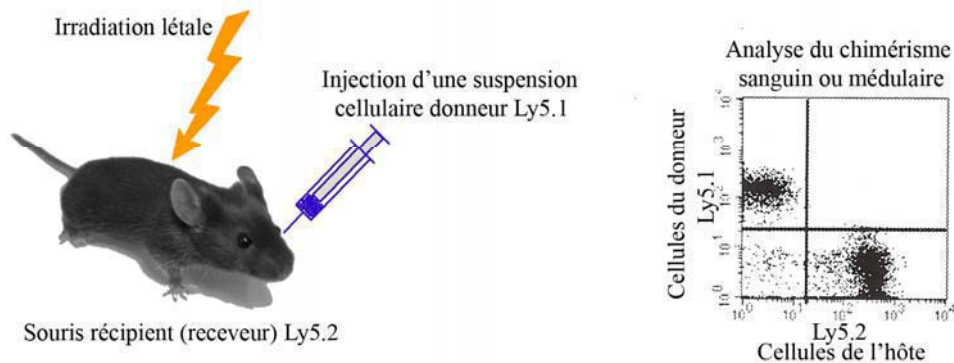
La première étape de l'engagement des CSH dans une voie de différenciation aboutit à la formation de cellules présentant un fort pouvoir de prolifération. Ces cellules sont les progéniteurs hématopoïétiques qui se sont engagés de façon irréversible dans la différenciation (Humphries et al., 1981). Les progéniteurs, qui ne sont plus capables d'assurer une reconstitution hématopoïétique à long terme (absence d'activité RLT), peuvent être caractérisés en culture en milieu semi solide (méthyl-cellulose) et sont alors appelées CFC (Colony Forming Cells) (Bradley and Metcalf, 1966). L'analyse de l'expression de molécules de surface a permis de caractériser des progéniteurs multipotents très précoces, capables de conduire à la fois aux progéniteurs communs lymphocytaires (« Common Lymphoid Progenitor » ou CLP) (Kondo et al., 1997), et aux progéniteurs communs aux cellules myéloïdes (« Common Myeloid Progenitor » ou CMP) (Akashi et al., 2000).

Figure 11 : Caractérisation *in vivo* de l'activité des cellules souches hématopoïétiques



A/ Test des CFU-S : Colony Forming Unit in the spleen (Till et Mc Culloch)

L'existence des CSH a été mise en évidence au début des années 60 dans un modèle murin dans lequel l'aplasie médullaire consécutive à une irradiation létale pouvait être corrigée par une greffe de moelle osseuse. Lors de ces mêmes expériences Till et Mc Culloch ont démontré l'existence de clones dans la rate (appelés colony forming unit-spleen, CFU-S) contenant des progéniteurs hématopoïétiques multipotents capables de générer des colonies érythroïdes, granuleuses, monocytaires et mégacaryocytaires.



B/ Test RLT : capacité de reconstitution à long terme

Pour tester la présence de CSH dans une suspension cellulaire, on effectue le plus souvent des greffes combinant des souris donneurs et receveurs exprimant l'un ou l'autre des allo-antigènes (Ly5.1 et Ly5.2) de la phospho-tyrosine phosphatase CD45 (marqueur pan-leucocytaire). L'analyse en cytométrie en flux des cellules du donneur (ici Ly5.1) permet d'évaluer la capacité de ces cellules à effectuer une reconstitution à plus ou moins long terme.

II/ La Moelle osseuse, balance entre l'autorenouvellement et l'engagement des CSH de l'adulte

Au cours de la vie embryonnaire, fœtale et adulte, l'activité hématopoïétique se déroule dans des sites successifs suivant un calendrier précis: l'hématopoïèse extra-embryonnaire du sac vitellin, l'hématopoïèse embryonnaire du foie fœtal, du thymus, et de la rate, puis finalement la MO. Ces différents tissus, en dehors du SV, ne fournissent que l'environnement et les cellules souches sont d'origine extrinsèque. Ces CSH résident dans un microenvironnement particulier qui comprend des cellules de soutien et des facteurs solubles, favorisant les interactions des cellules entre elles et avec les différentes matrices extracellulaires. L'ensemble de ces paramètres permet de contrôler la prolifération, la migration et la différenciation des CSH.

a) Notion de niche hématopoïétique :

Au niveau de la MO comme dans beaucoup de tissus (gonades, peau), la répartition des cellules hématopoïétiques est organisée selon un gradient de différenciation, de la périphérie de la moelle, pour les plus immatures, vers l'axe longitudinal de l'os pour les cellules différenciées. Les CSH sont préférentiellement localisées au contact des lamelles osseuses en formation, issues des ostéoblastes qui, après minéralisation, forment l'os compact. Les progéniteurs, puis les précurseurs migrent vers les vaisseaux de la cavité médullaire centrale et en fin de maturation, ils sont relargués dans le flux sanguin. La MO constitue l'organe hématopoïétique essentiel où prennent naissance la totalité des hématies, des neutrophiles et des plaquettes et une bonne partie des monocytes et des lymphocytes. Les CSH vont trouver au sein de la moelle les conditions nécessaires, fournies par le microenvironnement, à leur survie, à leur multiplication et à leur différenciation, de sorte à maintenir à peu près constant le nombre de cellules sanguines. L'activité hématopoïétique est extravasculaire et les cellules matures doivent franchir la paroi des sinus veineux de la MO, pour passer dans la circulation.

La connaissance de la composition et de la structure de la moelle osseuse permet une approche de la compréhension des mécanismes de fonctionnement de l'hématopoïèse. Il apparaît évident que le microenvironnement joue un rôle important pour les mécanismes de régulation du maintien de la taille du contingent de CSH, de la prolifération ou de la différenciation des cellules hématopoïétiques. L'étude de l'implication du stroma médullaire dans la régulation de l'hématopoïèse a donné lieu au concept de « niche hématopoïétique », capable d'influencer et de contrôler l'autorenouvellement et l'engagement des CSH vers la différenciation (Arai et al., 2005; Calvi, 2006; Li and Xie, 2005).

Composition de la niche hématopoïétique médullaire : Le microenvironnement de la MO est un ensemble disparate de structures regroupées par leurs fonctions, qui assurent aux CSH la possibilité d'exprimer leurs différentes propriétés d'autorenouvellement, de prolifération et de différenciation dans les différents lignages (Figure 12). Ce tissu est composé d'un ensemble hétérogène de cellules stromales

d'origine mésenchymateuse comprenant des cellules fibroblastiques et myofibroblastiques, des adipocytes, des cellules endothéliales et des ostéoblastes. Le tissu hématopoïétique médullaire contient deux types de cellules souches, les CSH et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les CSM sont à l'origine des cellules stromales du microenvironnement. La population stromale du tissu hématopoïétique assure le rôle de niche pour les CSH. Elle comprend des CSM dont le potentiel de différenciation est très large puisqu'elles peuvent être à l'origine des tissus graisseux, osseux, cartilagineux (Dazzi et al., 2006), mais également des cellules musculaires lisses (Charbord et al., 2000) et l'endothélium des vaisseaux (Kopp et al., 2005), qui pourraient jouer un rôle dans la modulation des propriétés des CSH.

La cavité médullaire est occupée par une quantité élevée d'adipocytes. Des hypothèses s'appuyant sur un rôle direct des adipocytes médullaires dans l'hématopoïèse ont été formulées depuis longtemps : les adipocytes pourraient constituer des réserves de précurseurs métaboliques et d'énergie nécessaires à l'hématopoïèse. Chez la souris, lors de culture *in vitro* à long terme, l'hématopoïèse semble dépendante de l'apparition d'adipocytes dans la couche stromale. Les lignées cellulaires stromales murines capables de permettre l'hématopoïèse et la lymphopoïèse sont pour la plupart pré-adipocytaires (Gimble et al., 1996). Des expériences récentes ont montré que des colonies stromales, fibroblastiques ou adipocytaires, implantées dans des chambres de diffusion, peuvent acquérir des propriétés ostéogéniques (Bennett et al., 1991). De ces expériences de transplantation, on peut déduire que les cellules stromales qui se sont différenciées vers un phénotype adipocytaire sont capables de se dédifférencier, puis de se différencier à nouveau vers un phénotype ostéoblastique. C'est l'ensemble de ces observations, *in vitro* et *in vivo* qui a conduit au concept de CSM, qui se maintiendrait dans le microenvironnement de la moelle et serait à l'origine des cellules non hématopoïétiques du stroma médullaire (Caplan, 1991).

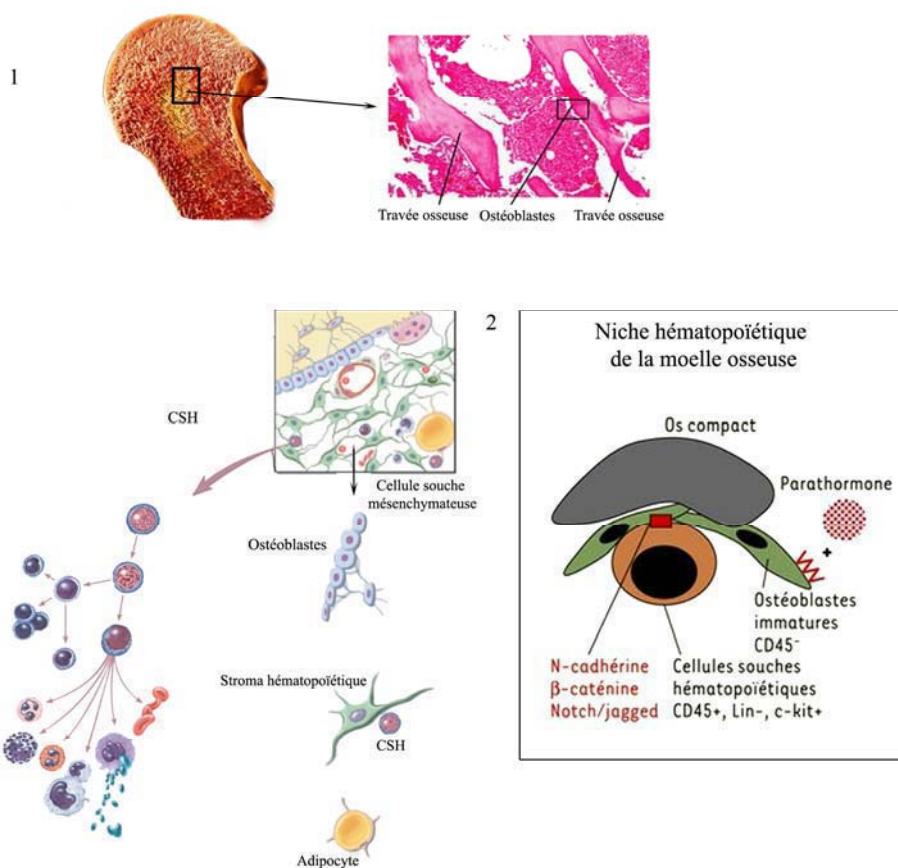
La vascularisation est un des éléments essentiels de la structure médullaire. Il existe une structure vasculaire particulière, le capillaire sinusoïde, dont la paroi sépare la moelle en deux compartiments, un compartiment extravasculaire, siège de l'hématopoïèse, et un compartiment intra-vasculaire, d'échange. Le capillaire sinusoïde constitue, anatomiquement, l'unité fonctionnelle élémentaire de la moelle. Les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux constituent un lieu de passage entre les cellules médullaires et la circulation générale (Kopp et al., 2005) (Figure 9).

Les ostéoblastes sont situés entre la bordure de l'os, l'endosteum, et le tissu hématopoïétique (Lord, 1990). Ils synthétisent un grand nombre de protéines de la matrice extra-cellulaire, telles que le collagène de type 1, la fibronectine, l'ostéopontine ou l'ostéocalcine. L'expression conditionnelle d'un récepteur des facteurs BMP (« Bone morphogenetic proteins ») (Zhang et al., 2003) ou la surexpression ciblée, dans les cellules osseuses, du gène codant pour les récepteurs de la parathormone (PTH) et du peptide associé (PTHrP, PTH related peptide) (Calvi et al., 2003) s'accompagnent d'une augmentation du nombre d'ostéoblastes. Dans ces deux modèles murins, l'augmentation du nombre d'ostéoblastes corrèle avec celle du nombre de CSH, mais pas avec celle des précurseurs hématopoïétiques déjà plus engagés dans la

différenciation, suggérant une fonction particulière de ce type cellulaire en tant que « niche » adapté à la physiologie des cellules souches (division asymétrique, maintien en quiescence ?).

C'est au moyen de contacts directs entre les cellules hématopoïétiques et stromales via des molécules d'adhérence et/ou par la production de facteurs de croissance que s'effectue la subtile balance entre autorenouvellement et engagement vers une voie de différenciation spécifique. Chez la drosophile, l'autorenouvellement des cellules souches germinales (CSG) est sous l'influence directe de leur ancrage aux cellules somatiques au pôle de la gonade via la E-cadhérine et la β -caténine (Spradling et al., 2001). Dans la MO, c'est au contact des ostéoblastes que s'accumulent les CSH. Cet ancrage fait intervenir le même type d'interaction que chez la drosophile. Néanmoins, cette association n'est pas suffisante et un troisième acteur est indispensable à l'autorenouvellement. L'activation des récepteurs PTHR a pour conséquence l'augmentation de l'expression de jagged 1 qui active la voie de signalisation Notch qui est considérée comme un élément essentiel qui conditionne le choix pour une CSH entre l'autorenouvellement et la détermination (Chiba, 2006).

Figure 12 : Composition de la niche médullaire



Le microenvironnement de la moelle est largement impliqué dans les phénomènes d'autorenouvellement ou de différenciation des CSH.

1) Dans la MO, les CSH sont situées au contact des ostéoblastes. Elles sont également susceptibles d'interagir avec les adipocytes, les cellules fibroblastiques et myofibroblastiques, mais également avec les cellules endothéliales.

2) C'est en grande partie au contact des ostéoblastes que s'accumulent les CSH. En effet, l'activation des récepteurs à la parathormone a pour conséquence l'augmentation de l'expression de jagged 1 qui active la voie de signalisation Notch qui conditionne pour une large part le choix pour la CSH entre l'autorenouvellement et la détermination.

Troisième Partie

Ontogenèse du système

hématopoïétique

Au cours de la vie embryonnaire, plusieurs organes hématopoïétiques prennent en charge tour à tour la production des cellules sanguines. Chez les mammifères, avant même que les organes ne s'individualisent, les premières ébauches du système sanguin apparaissent, non pas dans l'embryon lui-même, mais dans une annexe, le Sac Vitellin (SV). Ces cellules (principalement des globules rouges) commencent dès lors à assurer l'oxygénation et la nutrition des tissus en formation. Le SV est ensuite relayé par le foie du fœtus (FF), puis par la rate et la MO. Les circonstances dans lesquelles apparaissent les cellules hématopoïétiques de l'embryon ont fait et font encore l'objet d'intenses recherches (Figure 13).

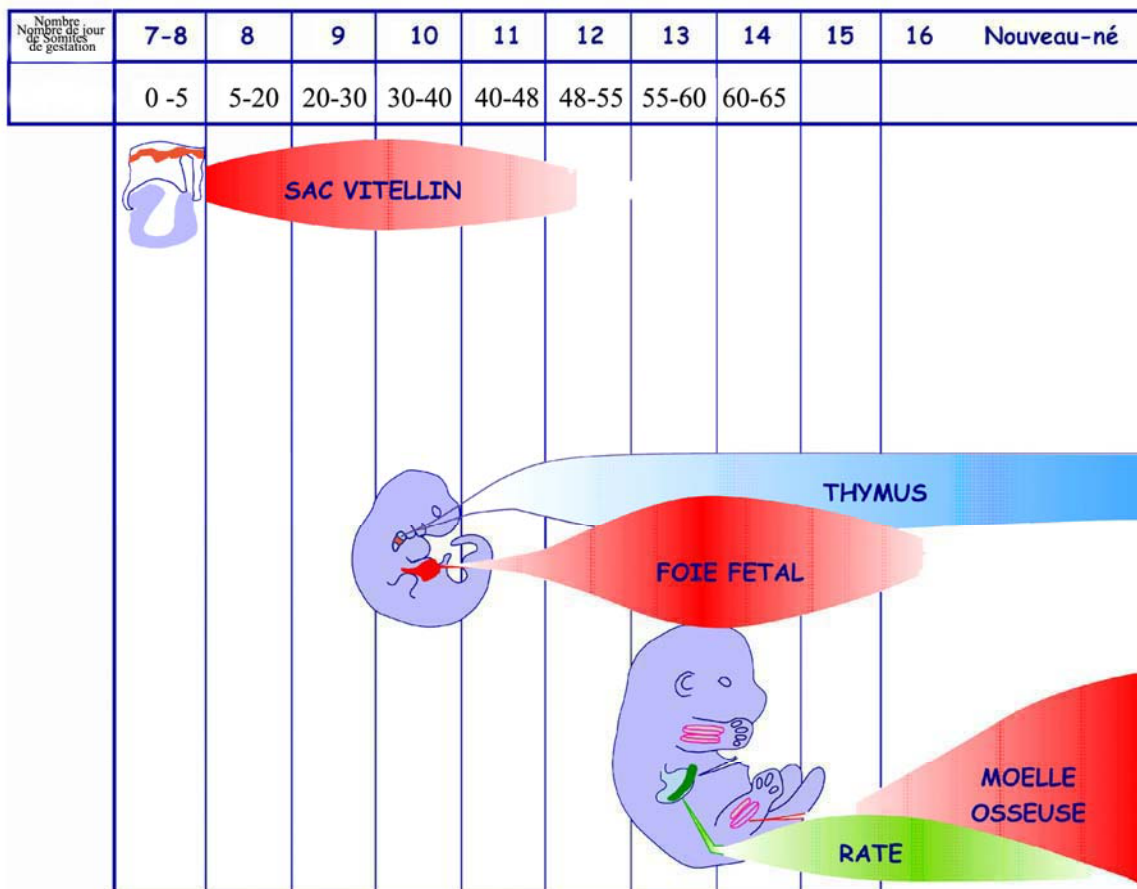
Dans les paragraphes qui suivent, j'ai choisi de traiter de façon indépendante les deux sites hématogènes de l'embryon de vertébrés, afin d'insister sur l'importance du « timing », dans l'interprétation des événements qui aboutissent à l'apparition des CSH et la mise en place de l'hématopoïèse adulte. Je débiterai par la description du Sac Vitellin qui est le site initial de production de cellules hématopoïétiques dans l'embryon. En procédant ainsi, je ne parviendrai pas à maintenir le suspense longtemps sur l'origine des CSH de l'embryon. Néanmoins, après mûre réflexion, il me semble que pour une meilleure compréhension et afin d'éviter les redondances, je me dois de respecter la chronologie du développement. Viendra tout de même le moment de dévoiler toute la vérité sur la localisation, le site de « naissance » des CSH de l'embryon. Pour ce faire, j'utiliserai les données acquises du modèle aviaire. Cette parenthèse « historique » me permettra d'introduire l'existence d'un second site de production de cellules hématopoïétiques dans l'embryon : la région Aorte/Gonades/Mésonéphros (AGM), berceau des CSH de l'adulte. Les préliminaires alors accomplis, nous pourrions enfin nous consacrer au vif du sujet : *Où se cachent les CSH dans l'embryon de souris et quelle est leur véritable identité ?*

I/ Le Sac Vitellin est à l'origine des premières cellules sanguines de l'embryon

L'émergence des cellules hématopoïétiques dans le SV et l'AGM s'effectue de façon indépendante. Bien appréhender cette notion permet d'éviter certaines incertitudes ou inexactitudes qui persistent çà et là et qui sont en partie liées à une méconnaissance des séquences dans le temps et dans l'espace, du développement des sites hématogènes intra- et extra-embryonnaire. Au cours de la vie embryonnaire, différents tissus hématopoïétiques sont mis en jeu. Nous allons décrire ci-dessous, leur rôle et leur contribution à l'hématopoïèse en débutant par la description et la caractérisation du SV en tant que site initial de production de cellules sanguines, au niveau de structures particulières, appelées îlots sanguins. Nous verrons, qu'à l'origine de cette mise en place se trouvent deux populations cellulaires qui semblent apparaître simultanément et en étroite association : les cellules endothéliales (CE), qui donneront le revêtement interne des vaisseaux, et les précurseurs hématopoïétiques (PH).

L'hématopoïèse du SV n'a pas encore livré tous ses secrets, et nous verrons combien il est ardu de définir avec précision les événements à l'origine de la diversité des types cellulaires produits. Le SV différencie rapidement des érythroblastes, des macrophages et des mégacaryocytes. Les précurseurs dont ils sont issus n'arborent pas les propriétés des CSH. Ils ont un potentiel de différenciation limité et sont incapables de maintenir, à long terme, la production de cellules sanguines.

Figure 13 : Contribution des différents organes hématopoïétiques au cours de la vie embryonnaire et foetale



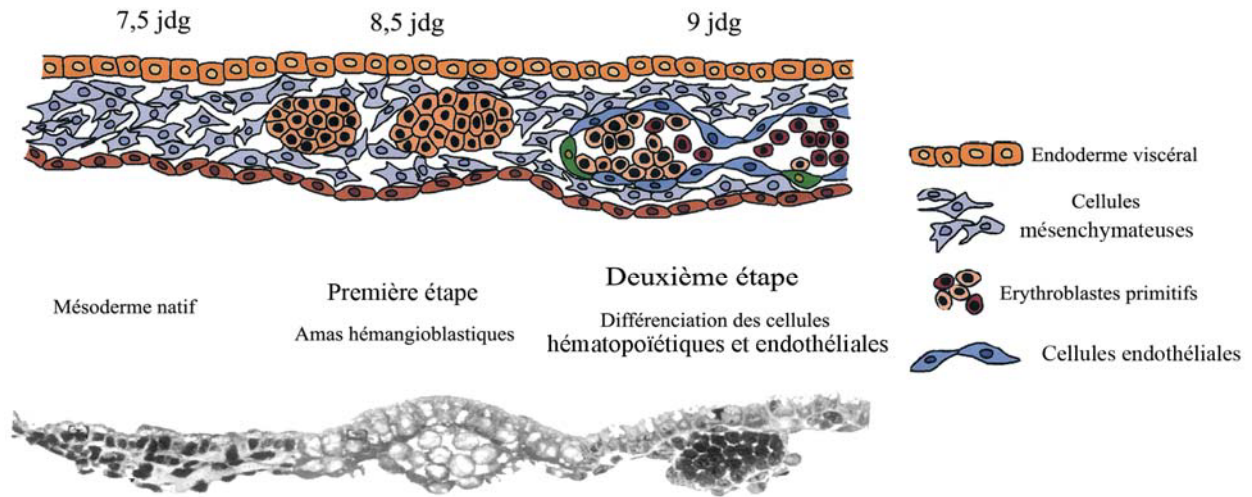
Le sac vitellin est la première source de cellules hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse. Le foie fœtal est le siège de l'hématopoïèse fœtale et contient les premières cellules souches hématopoïétiques de l'embryon. Il est colonisé en même temps que le thymus. Plus tard, la rate fœtale et la moelle osseuse sont colonisées par les CSH, respectivement à 14 jdg et 15 jdg. L'hématopoïèse du foie et de la rate n'est que transitoire, elle assure la production de cellules sanguines durant la période pré et périnatale.

a) Origine des îlots sanguins du Sac Vitellin, l'hématopoïèse primitive :

Le Sac Vitellin est formé de l'association de mésoderme extra-embryonnaire et d'endoderme primitif, constituant un feuillet splanchnopleural (association endoderme/mésoderme). C'est au sein de ce mésoderme qu'apparaissent les premières cellules hématopoïétiques. Chronologiquement, des zones du mésoderme forment dans un premier temps des agrégats de cellules qui ne présentent pas initialement de distinctions morphologiques. Ces « amas hémangioblastiques » se différencient progressivement pour former les îlots sanguins, qui contiennent les premiers érythroblastes de l'embryon (Figure 14) (Sabin, 1920). Les îlots sanguins sont bordés de cellules endothéliales qui sont à l'origine de la formation d'un réseau complexe de vaisseaux qui permettront la connexion sanguine entre le SV et l'embryon, garante des échanges materno-foetaux. Le SV a longtemps été considéré comme la source initiale et unique de CSH dans l'embryon (Metcalf and Moore, 1971; Moore and Metcalf, 1970), d'une part parce que c'est le premier site producteur de cellules sanguines chez l'embryon et, d'autre part, parce que l'observation montre que les PH s'y forment *in situ*, contrairement aux sites ultérieurs de production de cellules sanguines.

Les îlots sanguins et l'hémangioblaste : A l'origine de l'apparition des îlots sanguins se trouvent deux populations qui semblent apparaître simultanément et en étroite association dans l'embryon : les cellules endothéliales et les précurseurs hématopoïétiques. De cette observation est née l'hypothèse selon laquelle les cellules endothéliales et hématopoïétiques extra-embryonnaires dériveraient d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. Dès 1875, c'est sur la base d'observations cytologiques que Ranvier décrivait dans le SV de poulet l'existence de cellules qu'il estimait à l'origine des cellules vasculaires et hématopoïétiques. A l'avantage de cette hypothèse, chez la souris, force est de constater que les CE et les PH partagent l'expression de nombreuses molécules, telles que des protéines de surface (CD31/PECAM-1, CD34, c-kit, AA4.1 et Sca-1) (Baumann et al., 2004; Ma et al., 2002; Matsubara et al., 2005; Petrenko et al., 1999), ou des facteurs de transcription, tels que SCL/Tal-1, lmo2, Gata-2 et Runx-1 (Baron, 2001; Kobayashi-Osaki et al., 2005; Manaia et al., 2000; Visvader et al., 1998). De plus, l'inactivation génique de certains facteurs de transcription (comme flk-1) peut conduire à des défauts de développement affectant à la fois les cellules hématopoïétiques et vasculaires (Shalaby et al., 1995), suggérant une relation de lignage entre les deux types cellulaires (revue : (Godin and Cumano, 2002)). Certains des facteurs co-exprimés par les cellules endothéliales et hématopoïétiques sont également présents dans d'autres tissus, comme par exemple, les facteurs de transcription SCL/Tal-1 et GATA- 2 qui sont exprimés dans le tissu nerveux (Herberth et al., 2005; Nardelli et al., 1999; Smith et al., 2002; van Eekelen et al., 2003).

Figure n°14 : Formation des îlots sanguins chez la souris

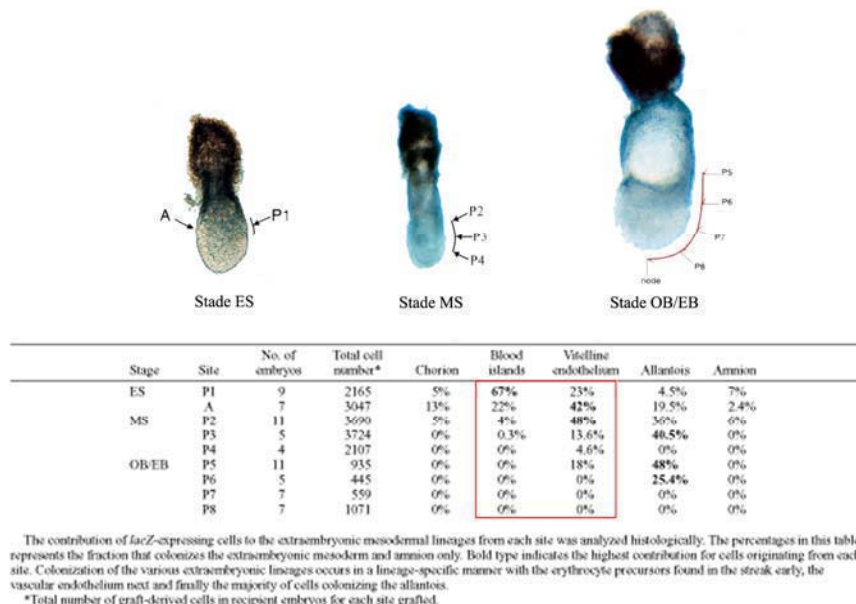


Le sac vitellin est formé de l'association de mésoderme extra-embryonnaire et d'endoderme primitif, constituant un feuillet splanchnopleural. C'est au sein de ce mésoderme qu'apparaissent les premières cellules hématopoïétiques. Chronologiquement, des zones du mésoderme se différencient progressivement pour former les amas hémangioblastiques indifférenciés puis les îlots sanguins qui contiennent les premiers érythroblastes de l'embryon. Les îlots sanguins sont bordés de cellules endothéliales qui sont à l'origine de la formation d'un réseau complexe de vaisseaux qui permettront la connexion sanguine entre le sac vitellin et l'embryon, garante des échanges materno-foetaux.

Ainsi, l'expression commune de facteurs entre les deux lignages endothélial et hématopoïétique pourrait être le reflet d'un lien physiologique plutôt qu'ontogénique. D'autres arguments, qui dérivent de l'analyse des effets d'inactivation géniques chez la souris ont démontré que la majorité des molécules co-exprimées n'intervenaient pas toujours de façon décisive dans la mise en place des deux lignages dans le SV. En fait, plus que l'existence de l'hémangioblaste au cours de l'ontogenèse, c'est sa présence même au sein des îlots en formation qui est très largement contestable. Comme nous allons le voir dans la partie qui suit, des études de cartographie de destinées cellulaires apportent des arguments supplémentaires, qui n'invalident pas directement l'existence de l'hémangioblaste, mais remettent en question les données admises sur sa localisation au sein de l'embryon et en particulier du SV.

Origine embryonnaire des cellules composant les îlots sanguins : Au cours du développement, il est possible de suivre la destinée cellulaire de cellules de l'épiblaste de souris. Ces expériences consistent à effectuer des greffes orthotopiques de portion de l'épiblaste de souris exprimant des marqueurs, tels que la β -galactosidase bactérienne (Souris ROSA 26) ou la protéine fluorescente verte (Souris GFP). Kinder et collaborateurs (Kinder et al., 1999) ont montré en utilisant ces techniques que les cellules qui donnent naissance au érythrocytes du SV sont produites dans les tous premiers stades de la gastrulation (ES : « early streak ») (Downs and Davies, 1993), alors que la contribution de l'épiblaste à la majeure partie des précurseurs endothéliaux a lieu plus tard et se poursuit jusqu'aux stades OB/EB (« Zero Bud » et « Early Bud »). De manière générale, cette étude a montré qu'une contribution simultanée aux deux lignages était extrêmement rare (Figure 15).

Figure 15 : Contribution de l'épiblaste à la formation des cellules endothéliales et hématopoïétiques des îlots sanguins



L'utilisation de greffes orthotopiques chez l'embryon de souris a permis de démontrer que dans les premières étapes de la gastrulation, lors formation du mésoderme extra-embryonnaire et des îlots sanguins, une contribution simultanée aux lignages endothélial et hématopoïétique est extrêmement rare.

Des résultats analogues ont été obtenus très récemment par Ueno et Weissman (Ueno and Weissman, 2006). Dans leur étude, ces auteurs ont injecté dans des blastocystes des cellules ES exprimant, de façon stable, différentes protéines fluorescentes. L'analyse des îlots sanguins des embryons tétrachimériques (EGFP, ECFP, MRFP et WT) a permis de montrer que les îlots n'étaient pas d'origine clonale, mais nécessitaient la participation de plusieurs progéniteurs pour leur formation.

L'utilisation de cellules ES issues de lignées exprimant la CRE-recombinase sous le contrôle du promoteur de *flk-1* couplé aux différents vecteurs fluorescents contenant des sites *loxP* a permis a ces mêmes auteurs (Ueno and Weissman, 2006) de mettre en évidence un point très important. En résumé, *flk-1* a été proposé comme étant le marqueur précoce de l'hémangioblaste (Huber et al., 2004), mais aussi des lignages

hématopoïétiques et endothéliaux (Drake et al., 1997). En effet, l'inactivation génique du gène *flk-1* conduit chez la souris à une létalité embryonnaire due à l'absence de développement hématopoïétique et endothélial dans le SV (Shalaby et al., 1997). Il faut cependant noter que les cellules ES *Flk-1^{-/-}* peuvent produire des CE et des PH. La fonction de *Flk-1* serait en fait de permettre la domiciliation des précurseurs mésodermiques dans le SV (Schuh et al., 1999).

Chez les souris chimériques obtenues, les îlots sanguins contiennent plus de cellules endothéliales fluorescentes que de cellules hématopoïétiques (alors que le pourcentage de cellules de chaque couleur est identique). De ces résultats et d'autres expériences complémentaires, les auteurs ont déduit que dans le SV, il coexiste deux populations de PH distinguables par leur niveau d'expression de *flk-1* (Expression forte/faible ou nulle). Si l'expression de *flk-1* constitue un marqueur d'hémangioblaste, force est de constater que les clones hématopoïétiques dérivés des cellules ES injectées et n'exprimant pas de fluorescence ne peuvent pas être originaire d'un précurseur commun bipotent hémato-endothélial présents dans l'amas hémangioblastique. Ces résultats sont corroborés par ceux de Furuta qui démontrent que dans le SV, il existe deux types de précurseurs endothéliaux précoces (qui apparaissent avant les PH). Les expériences réalisées à l'aide de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur d'*Oct3/4* montrent que les cellules mésodermiques *Oct3/4* sont à l'origine d'angioblastes *CD31⁻* et d'angioblastes et/ou d'hémangioblastes *CD31⁺* (Furuta et al., 2006). De cette étude, il apparaît, qu'il existerait deux voies de production d'angioblastes dans le SV.

Ces données indiquent que les amas hémangioblastiques présents dans les îlots sanguins avant la différenciation en cellules endothéliales et hématopoïétiques ne résultent pas de la multiplication d'un précurseur bipotent. L'existence d'un précurseur commun bipotent hémato-endothélial ne peut pas être exclue, mais il serait alors présent dans le mésoderme des stades antérieurs puisque, *in situ*, la restriction entre les deux lignages a déjà eu lieu au niveau des amas hémangioblastiques.

L'endoderme viscéral est indispensable à l'hématopoïèse primitive : Dans l'embryon, les interactions entre des feuilletts embryonnaires voisins sont indispensables à la mise en place du plan de développement de l'organisme et à la morphogénèse. Dans le SV, l'endoderme viscéral est placé de façon stratégique pour des interactions inductives, en premier lieu avec l'ectoderme du cône extra-placentaire, et plus tard, avec le mésoderme issu de la gastrulation. De nombreux travaux désignent l'endoderme viscéral comme un tissu polarisé le long de l'axe antéropostérieur de l'embryon (Lawson et al., 1986; Lawson and Pedersen, 1987). Par exemple, les gènes Cerberus-like (*Cer-1*) et *Nodal* qui codent pour des protéines exprimées dans la partie antérieure de l'endoderme viscéral sont largement impliqués dans le devenir cellulaire de l'ectoderme adjacent (Belaousoff et al., 1998). Au cours de la gastrulation, le mésoderme natif dérivé de la partie postérieure de la ligne primitive est en étroite association avec l'endoderme viscéral dans la région où se forment les îlots sanguins. La juxtaposition à cet endroit de l'endoderme et du mésoderme laisse penser que cette interaction pourrait jouer un rôle important dans la formation des îlots, comme cela a été clairement

démontré chez le poulet (Wilt, 1965). Cette hypothèse a d'ailleurs été testée en effectuant des greffes orthotopiques d'endoderme issu de souris sauvage dans des embryons exprimant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur de la ϵ globine (comme marqueur de l'apparition des cellules érythroïdes). Ces expériences ont démontré que l'épiblaste seul est incapable de former des cellules sanguines ou d'activer l'érythropoïèse en culture. L'association des deux feuilletts est indispensable à l'apparition de l'érythropoïèse et donc à l'émergence de l'hématopoïèse primitive. L'endoderme viscéral a un effet instructif sur l'épiblaste qu'il spécifie pour former du mésoderme hématopoïétique. Ce rôle est médié pour la majeure partie par les acteurs de la voie wnt et BMP4 (Gadue et al., 2005). Après cette étape d'induction, le mésoderme du SV est capable de former des PH en l'absence d'endoderme viscéral (Palis et al., 1995).

b) Propriétés et potentiel de différenciation des précurseurs du SV

Erythropoïèse primitive versus définitive : Au cours de la vie embryonnaire les cellules rouges sont les premières cellules sanguines produites par le SV. L'une des particularités de l'hématopoïèse du SV repose sur le fait que ces cellules sont nucléées (érythroblastes) est qu'elles expriment des hémoglobines dites fœtales (β H1, ζ et ϵ), différentes des hémoglobines adultes ou définitives (β -major) (Craig and Russell, 1964) (Figure 16). L'affinité des globines embryonnaires pour l'oxygène est plus élevée que celle de leurs homologues adultes, ce qui a pour conséquence de favoriser les échanges gazeux de la mère vers l'embryon, via le placenta. Après sa colonisation à 10 jdg, le foie devient l'organe hématopoïétique majeur du fœtus et est le siège d'une érythropoïèse très active qui produit les premiers globules rouges anucléés exprimant alors les hémoglobines adultes (β -major et α) (Craig and Russell, 1964).

C'est sur la base de la nature des cellules rouges qu'il est courant de faire la distinction entre l'hématopoïèse du SV dite « primitive », de celle dite « définitive ». Néanmoins, ces critères sont abusifs ou tout au moins mal interprétés, et il conviendrait plutôt de parler d'érythropoïèse primitive ou définitive. Il faut noter que les érythroblastes du SV (hématopoïèse primitive) sont capables d'énucléer (propriété des cellules érythroïdes définitives) (Kingsley et al., 2006). La distinction entre hématopoïèse définitive ou primitive repose donc plutôt sur la nature et le potentiel des précurseurs à l'origine des cellules différenciées et non sur des propriétés différentes, liées au stade de développement, de cellules d'un lignage donné. Le SV produit des précurseurs au potentiel limité, et l'hématopoïèse définitive résulte de la production de CSH, caractérisée à la fois par l'activité RLT et par une progénie incluant des dérivés lymphoïdes. La différence entre hématopoïèse primitive et définitive repose également sur les processus moléculaires qui sous-tendent la génération des deux types de précurseurs. Ainsi, l'étude de souris invalidées pour différents facteurs de transcription a montré que l'inactivation de certains gènes, tels que LMO2 ou SCL/Tal-1, affectent à la fois la détermination des précurseurs définitifs et primitifs, alors que celle d'autres gènes, comme GATA-2 et Runx1, n'affecte que l'un ou l'autre des précurseurs. Ce sujet sera développé ultérieurement (Chapitre 4).

Myélopoïèse primitive versus définitive : Le SV est également capable de produire des précurseurs érythro-myéloïdes, ainsi que des macrophages et des mégacaryocytes. En ce qui concerne la production des macrophages, Naito et Takahashi ont initialement proposé un modèle dans lequel coexistent, dans le SV, deux types de macrophages, issus respectivement de lignages de type primitif ou définitif. Les deux types de macrophages seraient issus d'un précurseur érythro-myéloïde, mais leur mode de différenciation différerait (Naito et al., 1996). Très récemment, une étude sur les relations de lignage entre les précurseurs de macrophages et les précurseurs érythro-myéloïdes a été effectuée, en utilisant des embryons chez lesquels le gène codant la GFP a été placé sous le contrôle des séquences régulatrices du gène CX3CR1 qui est exprimé dans le lignage monocyte/macrophage (Bertrand et al., 2005c). L'analyse de ces embryons a permis de démontrer l'existence de plusieurs vagues successives de précurseurs myéloïdes dans le SV. En réalité, les premiers précurseurs de macrophages sont présents dans le SV avant les tous premiers précurseurs érythro-myéloïdes (Bertrand et al., 2005c; Palis et al., 1999). Les macrophages issus de précurseurs monopotents et de précurseurs érythro-myéloïdes se différencient indépendamment à partir du mésoderme ($c\text{-kit}^+ \text{CD45}^- \text{CD31}^+$), suivant une cinétique identique (acquisition des marqueurs CD45 et Mac-1, puis perte des marqueurs c-kit et CD31 avant l'acquisition des marqueurs de différenciation terminale F4/80 et CX3CR1/GFP). La distinction essentielle entre les deux vagues de macrophages produites dans le SV provient donc du type de précurseur dont ils dérivent, monopotents macrophagiques pour les premiers, qui apparaissent dès 7,5 jdg, et érythro-myéloïdes pour ceux de la seconde vague qui débute après le stade de 2 somites (Bertrand et al., 2005c).

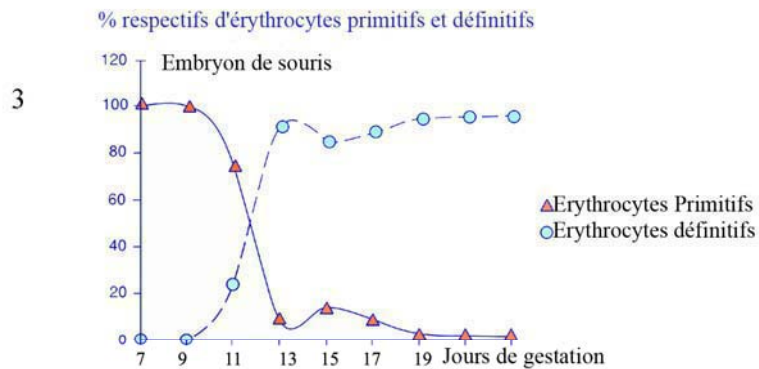
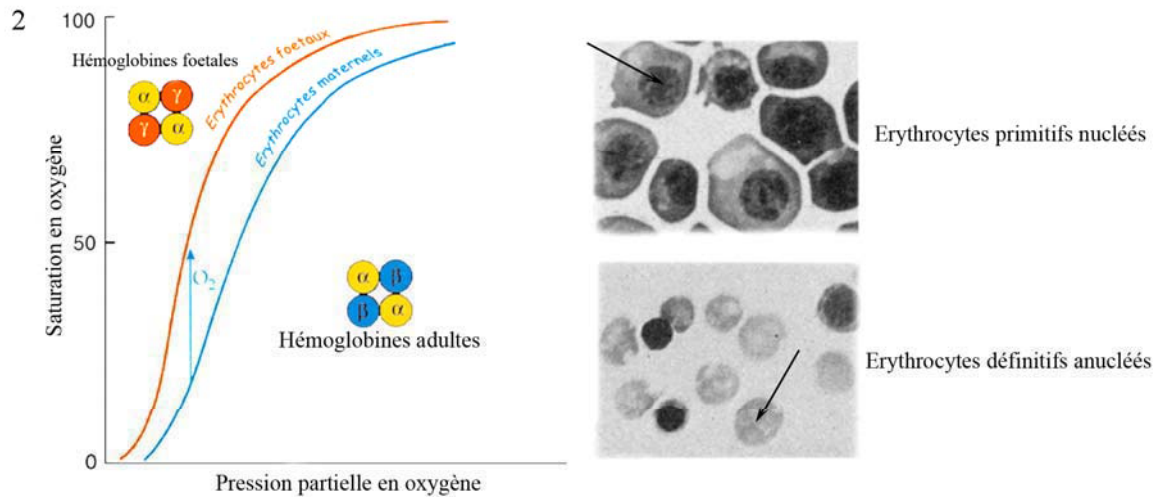
Caractérisation phénotypique des précurseurs hématopoïétiques du SV : Les études pratiquées en parallèle, au cours de la différenciation des cellules ES et lors de la formation des îlots sanguins ont permis de décrire l'évolution du mésoderme natif vers les précurseurs hématopoïétiques. Le mésoderme natif exprime CD31 et Flk-1 (Dumont et al., 1995; Redick and Bautch, 1999). Dans cette population, les précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux sont présents, en majorité dans la sous-population $\text{Flk1}^+ \text{VE-cadherin}^+ \text{CD45}^-$, même si des cellules de ces deux lignages peuvent être aussi obtenues à partir de cellules $\text{Flk1}^+ \text{VE-cadherin}^- \text{CD45}^-$ (Nishikawa et al., 1998a; Nishikawa et al., 1998b). Au sein de ces deux sous-populations triées, soit à partir de cellules ES, soit à partir du SV, la capacité à produire *in vitro* une progénie érythro-myéloïde est strictement corrélée à l'expression de l'intégrine $\alpha 4$ (Ogawa et al., 1999).

CD41 constitue le premier marqueur indiscutablement hématopoïétique lors de la différenciation du mésoderme vers la voie hématopoïétique, puisqu'il ne marque pas les cellules endothéliales (Ferkowicz et al., 2003; Li et al., 2003; Mikkola et al., 2003). De façon intéressante, l'expression de ce marqueur par les précurseurs hématopoïétiques du SV précède celle de CD45 (Mikkola et al., 2003), suivant une séquence qui est retrouvée lors de l'émergence des CSH de l'AGM (Bertrand et al., 2005b).

Figure 16 : Erythropoïèse primitive et définitive

1

Lignage érythroïde	Ontogénèse	Organisme adulte
	Erythrocytes primitifs	Erythrocytes définitifs
Caractéristiques	-Nuclées - Synthétisent des globines de type embryonnaire (ζ , $\beta H1$ et ϵ)	-Anucléés - Synthétisent des globines de type adulte (α , β maj et β min)



1) Au cours de la vie embryonnaire, les cellules rouges sont les premières cellules sanguines produites par le sac vitellin.

2) Ces cellules sont nucléées (érythroblastes) et expriment des hémoglobines dites foetales ($\beta H1$, ζ et ϵ), différentes des hémoglobines adultes ou définitives (β -major). L'affinité des globines embryonnaires pour l'oxygène est plus élevée que leurs homologues adultes et ceci a pour conséquence de favoriser les échanges gazeux avec la mère de l'embryon, via le placenta.

3) La colonisation du foie foetal débute aux alentours de 10-11 jdg. Le foie devient alors l'organe hématopoïétique majeur du foetus et est le siège d'une érythropoïèse très active qui produit les premières globules rouges anucléés exprimant les hémoglobines adultes (β -major et α).

II/ Les premières CSH de l'embryon: contributions du modèle aviaire

Après le début de la fonction du SV dans la production des cellules sanguines, plusieurs organes prennent en charge tour à tour la production de cellules hématopoïétiques (le SV, le foie et le Thymus, la rate et finalement la MO). Comme nous l'avons vu ci-dessus, les îlots sanguins du SV se différencient en CE et CH, puis les cellules endothéliales d'origine intra- et extra-embryonnaires se rencontrent pour effectuer la connexion vasculaire entre l'embryon et le SV. A partir de ce moment, dans l'éventualité d'une production *de novo* de cellules hématopoïétiques par l'embryon ou le SV, l'unité du réseau vasculaire de l'embryon rend impossible toute analyse de l'origine intra- ou extra-embryonnaire des précurseurs qui colonisent les différents organes hématopoïétiques. De ce fait, l'origine exacte des PH donnant naissance aux cellules hématopoïétiques dans chacun de ces organes a historiquement constitué un sujet à polémique. La possibilité d'une production intrinsèque de PH dans les organes pratiquant la production de cellules sanguines, indépendante d'une colonisation à partir du SV, ne pouvait pas être complètement exclue.

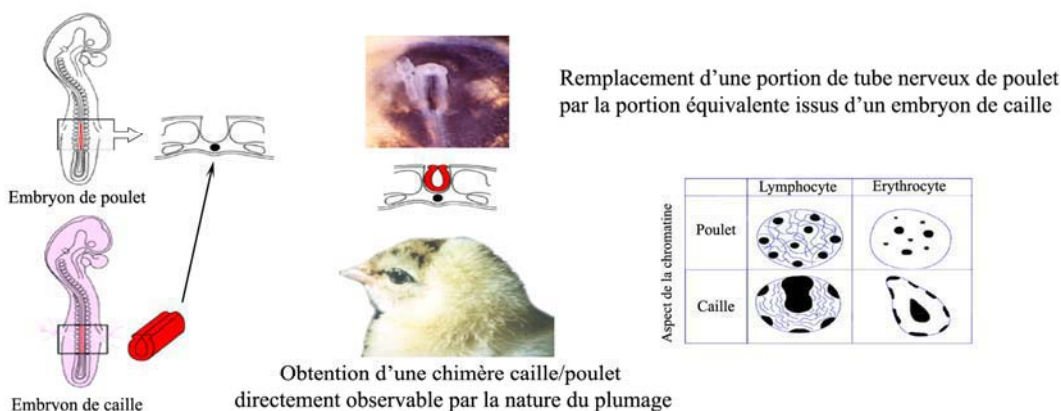
a) Précurseurs intrinsèques et extrinsèques

Afin de tenter de clarifier l'origine des PH présents dans les différents organes hématopoïétiques au cours du développement, des expériences de parabioses entre embryons de sexes différents ont été réalisées chez le poulet. Suite aux connexions par anastomoses vasculaires avec le SV ou la membrane chorioallantoïdienne (MCA), les organes hématopoïétiques devenaient chimériques (contenant des cellules des deux sexes), démontrant la possibilité d'une colonisation par des cellules circulantes d'origine extrinsèque et suggérant ainsi que le SV constituait la seule source de CSH de l'embryon (Moore and Owen, 1965; Moore and Owen, 1967). Cette hypothèse était d'autant plus plausible que des SV de poulets marqués à la thymidine tritiée et injectés dans l'embryon étaient capables de se différencier en cellules myéloïdes et en lymphocytes en fonction des organes colonisés (Moore and Owen, 1967). Néanmoins, dans la plupart des cas, ces expériences n'ont pas été réalisées au bon moment! En tout cas, même si les conclusions tirées sont les bonnes, force est de constater qu'il est difficile de prédire le site d'origine d'un PH lorsque la connexion entre le SV et le corps embryonnaire est accomplie.

Les chimères caille-poulet : C'est en 1969 que Nicole le Douarin décrit pour la première fois l'intérêt des chimères caille-poulet dans l'analyse du développement embryonnaire (Le Douarin, 1969). La distribution différente de l'hétérochromatine dans les nucléoles des noyaux des cellules de poulet et de caille permet de distinguer les cellules des deux espèces (Figure 17). Cette propriété peut être utilisée comme marqueur biologique d'origine et permettre l'association hétérospécifique (par greffe) de territoires embryonnaires de caille et de poulet. Cette technique s'est rapidement imposée et a permis de démontrer

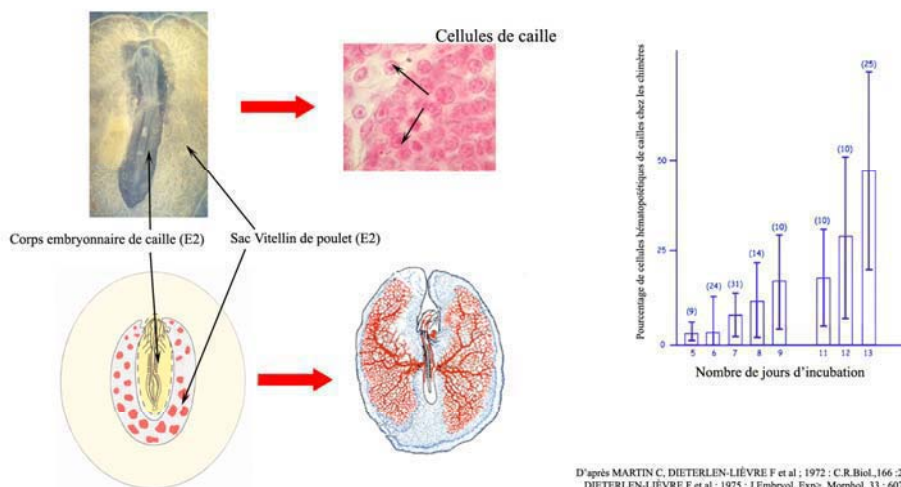
l'origine extrinsèque des précurseurs thymiques (Le Douarin et al., 1984), mais aussi d'élucider en grande partie les mécanismes d'émergence des CSH de l'embryon de poulet.

Figure 17 : Les chimères caille-poulet



A/ Principes des chimères caille-poulet :

Dans les chimères caille-poulet, la distribution différente de l'hétérochromatine dans les nucléoles des noyaux des cellules de poulet et de caille permet de distinguer les cellules des deux espèces . Cette propriété peut être utilisée comme marqueur biologique d'origine et permettre l'association hétérosécifique (par greffe) de territoires embryonnaires de caille et de poulet.



B/ Les chimères de sacs vitellins :

Au moment de l'apparition des premiers PH de l'embryon, il n'existe pas de connexions vasculaires entre le SV et le corps embryonnaire. Les greffes de corps embryonnaire de caille sur un SV de poulet réalisées, avant l'établissement de la circulation, ont démontré que les PH générés par le SV n'étaient pas des CSH, puisque les cellules issues de leur différenciation disparaissaient progressivement pour être remplacées par des cellules de caille. Ces études permettaient d'affirmer que, dans le modèle aviaire, deux vagues hématopoïétiques indépendantes se relayent : la première est issue du SV et produit essentiellement des globules rouges, la seconde, intraembryonnaire, produit *de novo* les CSH définitives capables de coloniser les organes hématopoïétiques.

Les chimères de SV, un tournant décisif : Au moment de l'apparition des premiers PH, il n'existe pas de connexions vasculaires entre le SV et le corps embryonnaire. L'utilisation des chimères caille-poulet pour

l'analyse de l'origine des PH de l'embryon devenait alors une évidence. Des greffes de corps embryonnaire de caille sur un SV de poulet ont été réalisées avant l'établissement de la circulation (Dieterlen-Lièvre, 1975). Pré-requis nécessaire pour la suite de l'étude, la capacité des PH du poulet à coloniser les organes hématopoïétiques de caille avait tout d'abord été confirmée. L'analyse des résultats de ces expériences aura des répercussions fondamentales sur les connaissances des mécanismes d'émergence des CSH dans l'embryon.

Sur 17 chimères étudiées, 16 embryons de caille montraient une colonisation des organes hématopoïétiques exclusivement par des cellules de caille (Figure 17). Au niveau d'un embryon, seulement deux clones de cellules d'origine poulet ont été détectés au niveau de la rate. Pour la première fois, ces expériences démontraient que les PH générées par le SV n'étaient pas des CSH puisque les cellules issues de leur différenciation disparaissaient progressivement pour être remplacées par des cellules de cailles. Ces études permettaient d'affirmer que, dans le modèle aviaire, au moins deux vagues hématopoïétiques indépendantes se relayent : la première, issue du SV, produit essentiellement des globules rouges, la seconde, intra-embryonnaire, produit *de novo* les CSH définitives capables de coloniser les organes hématopoïétiques de l'embryon (Dieterlen-Lièvre, 1975).

b) L'aorte dorsale comme source de cellules souches hématopoïétiques :

Pour déterminer dans l'embryon la région à l'origine de l'émergence des CSH, des analyses systématiques de coupes d'embryons aux stades précédant la formation des premiers organes hématopoïétiques ont été effectuées. Ces études ont permis de décrire des grappes de cellules, appelées « clusters » intra-aortiques, dans la région ventrale de l'aorte dorsale, au jour de développement embryonnaire (E) 2-3, puis dans le mésentère (foyers para-aortiques) à E6-7 (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981). La description de grappes de cellules sur l'aorte dorsale avait déjà été rapportée en 1916 par Emmel (Emmel, 1916). Ces structures particulières étroitement associées à l'endothélium constituaient donc un point de départ pour déterminer la région de l'embryon où étaient fabriquées les CSH.

L'analyse des potentialités *in vitro* des cellules isolées à partir de l'aorte et du mésentère à des stades plus tardifs, et les résultats de greffes d'aortes de caille dans des embryons de poulet ont permis de démontrer que les cellules des « clusters » aortiques, puis celles des foyers para-aortiques, étaient capables de coloniser et de reconstituer l'hématopoïèse dans les organes hématopoïétiques d'hôtes irradiés (Lassila et al., 1978; Lassila et al., 1980). L'analyse clonogénique (par culture en milieu semi-solide) a montré la présence, dans les suspensions d'aortes, de progéniteurs ayant les mêmes caractéristiques que ceux de la MO (Cormier and Dieterlen-Lièvre, 1988).

Ces expériences ont montré que, chez l'embryon de poulet, le SV ne contribue que de façon transitoire à l'hématopoïèse, il ne contient pas de CSH et il produit essentiellement des érythrocytes indispensables à la survie de l'embryon (Beaupain et al., 1979). Les « clusters » intra-aortiques contiennent les CSH qui

colonisent les organes hématopoïétiques de l'embryon, dont les foyers para-aortiques qui pourrait constituer un site « intermédiaire » de différenciation des CSH, homologue du foie fœtal des autres vertébrés.

c) Conclusion : Deux vagues successives de précurseurs hématopoïétiques

Les greffes de corps embryonnaire de caille sur des SV de poulet ont montré que les ébauches d'organes hématopoïétiques étaient entièrement composées de cellules de caille. Ainsi, les précurseurs du SV ont une durée de vie courte et seules les CSH du site intra-embryonnaire colonisent les organes hématopoïétiques définitifs. Les analyses cytologiques ont montré que la production de CSH intra-embryonnaires se faisait au niveau de l'aorte.

L'ontogenèse du système hématopoïétique est un processus remarquablement conservé chez les vertébrés (Galloway and Zon, 2003). L'hématopoïèse s'initie le plus souvent dans une structure équivalente au SV et assure la production transitoire des cellules hématopoïétiques de l'embryon (hématopoïèse primitive). Une seconde vague de précurseurs à l'origine des CSH de l'adulte prend alors place dans le compartiment intra-embryonnaire, dans la région aortique.

III) Origine intra-embryonnaire des CSH de l'embryon de souris

Dans la partie ci-dessous, nous allons voir que, comme chez l'oiseau, la région aortique chez la souris est le siège d'une activité hématogène. Comme pour la description du site hématogène extra-embryonnaire, je décrirais dans un premier temps l'origine embryologique de la région Aorte/Gonade/Mésonephros (AGM). La formation du site hématogène intra-embryonnaire apparaît plus complexe que celle du SV. C'est pourquoi, il est indispensable de définir plusieurs dates clef de l'hématopoïèse intra-embryonnaire. Ces repères temporels nous permettront alors de développer les différentes approches qui ont permis de caractériser la séquence d'apparition des CSH dans l'embryon

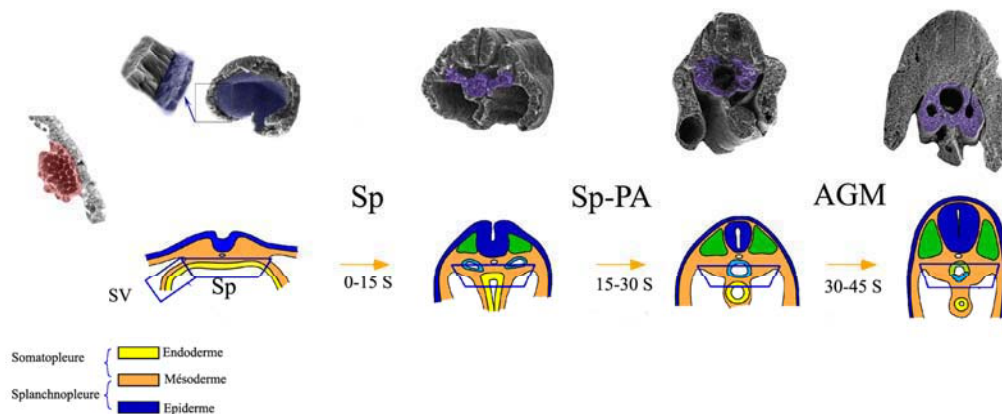
a) De la splanchnopleure intra-embryonnaire à la région AGM :

Le mésoderme intra-embryonnaire est compartimenté dans l'embryon : Dès le stade gastrula, il est possible de définir cinq régions du mésoderme en fonction de leur participation aux différentes parties de l'embryon. 1) *Le chordomésoderme* forme la chorde, indispensable à l'induction des structures neurales et à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. 2) *Le mésoderme somitique dorsal* forme les somites, situés de part et d'autre du tube neural et qui participeront à la formation des tissus conjonctifs du dos de l'embryon (Tissu osseux, muscle, cartilage et derme). 3) *Le mésoderme intermédiaire* qui forme le système urinaire et les conduits génitaux. 4) *Le mésenchyme céphalique* forme les tissus conjonctifs et la musculature de la face. Et enfin, le plus important en ce qui concerne l'hématopoïèse, 5) *Le mésoderme des lames latérales* qui

forme le cœur, les vaisseaux sanguins, les cellules du sang, les parois coelomiques, et tous les composants mésodermiques des membres, à l'exception des muscles. Le mésoderme de la lame latérale est sous-divisé en deux territoires par la cavité coelomique, le mésoderme dorsal ou somatopleural et le mésoderme ventral ou splanchnopleural, ce dernier donnant naissance aux cellules endothéliales et hématopoïétiques, ainsi qu'à l'endocarde (Figure 7). C'est à partir du mésoderme splanchnopleural (mésoderme associé à l'endoderme définitif) que s'initie la formation du site hématogène intra-embryonnaire.

Chronologiquement, dans la partie suivante, nous considérerons trois étapes dans l'émergence des CSH de l'embryon, durant lesquelles le site hématogène intra-embryonnaire porte différents noms (Figure 18). A 8-8,5 jdg, **la splanchnopleure intra-embryonnaire ou Sp** est composée de la globalité du mésoderme au contact de l'endoderme définitif. C'est à partir du mésoderme splanchnopleural qu'apparaissent les premiers vaisseaux intra-embryonnaires : les aortes dorsales qui sont initialement doubles et fusionnées uniquement à la base de l'allantoïde où se forme également l'artère ombilicale. Plus tard, entre 9,5 et 10 jdg (25-30 S), cette région est appelée **Splanchnopleure para-aortique ou Sp-PA**. Elle contient les aortes dorsales (qui commencent à fusionner au niveau troncal), ainsi que le mésenchyme qui participe à la formation de l'appareil urogénital. La région **Aorte/Gonades/Mésonéphros ou AGM**, est totalement mise en place aux alentours de 10,5-11 jdg. Elle est composée de l'aorte dorsale, issue de la fusion des aortes doubles de la Sp-PA, ainsi que du mésenchyme ventral incluant les futures gonades et les reins en voie de différenciation fonctionnelle.

Figure n°18 : Structure et évolution du site hématogène intra-embryonnaire



La **splanchnopleure intra-embryonnaire ou Sp**, apparaît à 8-8,5 jdg. Plus tard, entre 9,5 et 10 jdg (25-30S), la région dérivée de la Sp est appelée **splanchnopleure para-aortique ou Sp-PA**. Cette structure contient les aortes dorsales (doubles à ce stade) ainsi que le mésenchyme environnant qui participe en partie à la formation de l'appareil urogénital. La région **Aorte/Gonades/Mésonéphros ou AGM**, est totalement "différenciée" aux alentours de 10,5-11 jdg. Elle est composée de l'aorte dorsale, issue de la fusion des aortes doubles de la Sp-PA, ainsi que du mésenchyme ventral incluant les futures gonades et les reins en voie de différenciation.

b) Les CSH de l'embryon sont produites dans la région Sp-PA/AGM

Origine des premiers précurseurs multipotents : Premières informations : Dans l'embryon de souris, avant la colonisation du FF, des précurseurs de cellules B de phénotype AA4.1⁺Scal⁻ sont détectables dès le stade 10-12 somites (8,5-9 jdg) (Cumano et al., 1993). Ces résultats, basés sur l'analyse de culture en dilution limite, ont également montré qu'à ce stade, ces PH sont détectables à la fois dans les compartiments intra- et extra-embryonnaires. Sur la base des données obtenues chez le poulet, il n'était pas totalement étonnant de détecter des précurseurs B dans ces deux compartiments, en considérant qu'une mise en circulation des CSH de la région aortique existe aussi chez la souris. La même année, Godin et collaborateurs permettent de préciser la localisation de ce potentiel. En analysant la reconstitution de souris receveuses SCID (alymphoïdes), greffées sous la capsule rénale avec des explants de Sp-PA, ils détectent des cellules de phénotype B-1a originaires du greffon au niveau de la cavité péritonéale. Les mêmes expériences réalisées avec du SV de même stade n'ont néanmoins pas permis de trouver un potentiel équivalent. Ces expériences démontraient pour la première fois, que les précurseurs hématopoïétiques au potentiel lymphoïde B, détectés à la fois dans le SV et le corps embryonnaire à 9,5 jdg, étaient présents dans la Sp-PA, sans toutefois apporter des précisions sur la nature exacte de ce précurseur (Godin et al., 1993).

Dans le même temps, les travaux réalisés par Medvinsky et Dzierzak confirment l'existence de cellules multipotentes dans l'embryon (Medvinsky et al., 1993). L'injection de fraction cellulaire d'AGM à des souris receveuses permet la détection d'une activité CFU-S dans cette région de l'embryon à partir de 10 jdg, puis dans le SV et finalement le FF. Dans ces expériences, c'est la détection de CFU-S de jour 11 à partir des cellules de l'AGM qui permettait d'émettre l'hypothèse d'une origine intra-embryonnaire des CSH dans l'embryon de souris, et d'établir un parallèle avec les données obtenues dans le modèle aviaire. Par contre, elles ne permettaient pas d'exclure de façon catégorique une éventuelle contribution du SV. Peu de temps après, Muller et Dzierzak démontraient de façon incontestable que les PH contenus dans ce site intra-embryonnaire sont bien des CSH, puisque l'injection de cellules issues de l'AGM permet la reconstitution de l'hématopoïèse de souris létalement irradiées, caractéristique première des CSH (Muller et al., 1994).

Les CSH sont produites de novo dans la région Sp-PA/AGM : Comme précédemment chez le poulet, toute l'ambiguïté sur l'origine exacte des CSH de l'embryon et la participation éventuelle du SV à cette génération, repose sur le fait qu'au moment des différentes analyses, la circulation sanguine est établie entre le SV et le corps embryonnaire. Les modalités de développement de l'embryon de souris ne permettent pas d'explorer l'ontogenèse par l'utilisation de chimères. Afin de s'affranchir de ce problème, Cumano et collaborateurs (Cumano et al., 1996) ont explantés des SV ou des Sp avant le stade 4-5 somites (S), c'est-à-dire avant l'établissement de la circulation (Bertrand et al., 2006a; McGrath et al., 2003). Après une étape de culture organotypique de 2 à 3 jours, seule la Sp est capable de générer des précurseurs lymphoïdes *in situ*. Ces expériences montrent, d'une part que la production de PH dans les compartiments extra- et intra-

embryonnaire résulte de deux évènements de génération distinct, et, d'autre part, que le potentiel de différenciation des PH du SV est réduit par rapport à celui des PH intra-embryonnaires, qui est conforme à celui des CSH (Cumano et al., 1996).

La même année, ces expériences sont complétées par les travaux de Medvinsky et Dzierzak: le protocole suivi comporte lui aussi des cultures organotypiques, au détail près que les SV ou les AGM sont explantés à 10 jdg. Dans ces conditions, seule l'AGM contient des PH capables de reconstituer à long terme des souris létalement irradiées. Ils constatent également que la reconstitution est beaucoup moins efficace, voire nulle, lorsque les AGM fraîchement disséquées sont injectées directement, sans l'étape de culture organotypique et se basent sur cette amplification pour conclure que les CSH se forment *in situ* dans l'AGM (Medvinsky and Dzierzak, 1996).

Dans leurs travaux réalisés en 2001, Cumano et Godin avancent l'hypothèse que les cellules de l'embryon qui n'expriment pas encore les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Jaffe et al., 1990) sont potentiellement les cibles de cellules NK du receveur (Cumano et al., 2001). Elles réalisent alors des expériences dans lesquelles des SV et Sp sont prélevés avant établissement de la circulation et cultivés *in toto* pendant 4 jours. Pour s'affranchir d'un éventuel rejet du greffon, les cellules sont injectées dans des receveurs irradiés Rag2^{-/-} γ c^{-/-} dépourvues de cellules NK endogènes (Colucci et al., 1999). L'analyse de l'activité *in vivo* de ces cellules permet alors de démontrer que seule la Sp est capable de reconstituer les souris à long terme. Les cellules issues du SV sont bien capables de s'implanter chez les receveurs, mais ne contribuent qu'au lignage érythromyéloïdes à courte échéance (moins de 3 mois) (Cumano et al., 2001).

Au regard des expériences réalisées avant circulation, à 8,5 jdg (stade 5S), la Sp est capable de générer *de novo* des CSH multipotentes et capable de RLT, alors que le SV ne l'est pas. De même, à partir de 10 jdg, seule l'AGM qui dérive de la splanchnopleure intra-embryonnaire est capable d'une activité RLT. Au stade 5 somites, la Sp ne contient pas encore de PH, les CSH apparaissent au cours de la culture organotypique. La Sp-PA/AGM est la seule source de CSH-RLT dans l'embryon, et le SV produit des PH au potentiel restreint à la lignée érythro-myéloïde (Cumano et al., 2001).

L'ensemble de ces résultats démontre que, comme chez l'embryon de poulet, le développement hématopoïétique de la souris résulte de deux vagues successives de génération de précurseurs qui n'arborent pas les mêmes potentiels de différenciation et de maintenance.

Pourquoi le SV à 9,5 jdg contient-il des précurseurs B : Plusieurs publications ont montré que des précurseurs isolés à partir de SV après mise en place de la circulation étaient capables de RLT (Kumaravelu et al., 2002; Weissman et al., 1978; Yoder et al., 1997). Au regard des résultats obtenus quant à l'origine des CSH dans l'embryon, il apparaît que des PH multipotents sont capables de circuler dans l'embryon avant le stade de l'AGM. Toles et collaborateurs ont d'ailleurs démontré que l'injection trans-placentaire de sang embryonnaire (prélevé dès 9 à 10 jdg) dans une souris déficiente pour l'érythropoïèse (W/W, déficiente en c-

kit), permet de détecter plusieurs semaines après l'injection une descendance hématopoïétique multilignage (Toles et al., 1989). De façon similaire, les cellules à potentiel B contenues dans le sang d'embryons de 10 jdg (Delassus and Cumano, 1996) dérivent de précurseurs multipotents au niveau clonal et sont donc originaires de l'AGM (Godin et al., 1995; Godin et al., 1999).

Ces analyses démontrent que les cellules qui montrent un potentiel B, retrouvées dans le SV (Yoder et al., 1997), se sont différenciées à partir des précurseurs multipotents capables de RLT, générés au niveau de la Sp-PA (9-9,5 jdg) et relargués dans la circulation de l'embryon. C'est sur la base de cette observation, mais aussi sur le fait qu'il est parfois considéré que l'embryon ne produit des CSH qu'au stade de l'AGM (30-35S, 10,5 jdg), puisque capacité de reconstituer des receveurs « conventionnels » irradiés apparaît à ce stade, qu'il est possible d'entendre dire que le SV produit des CSH.

c) Structure de l'AGM et localisation des CSH embryonnaires :

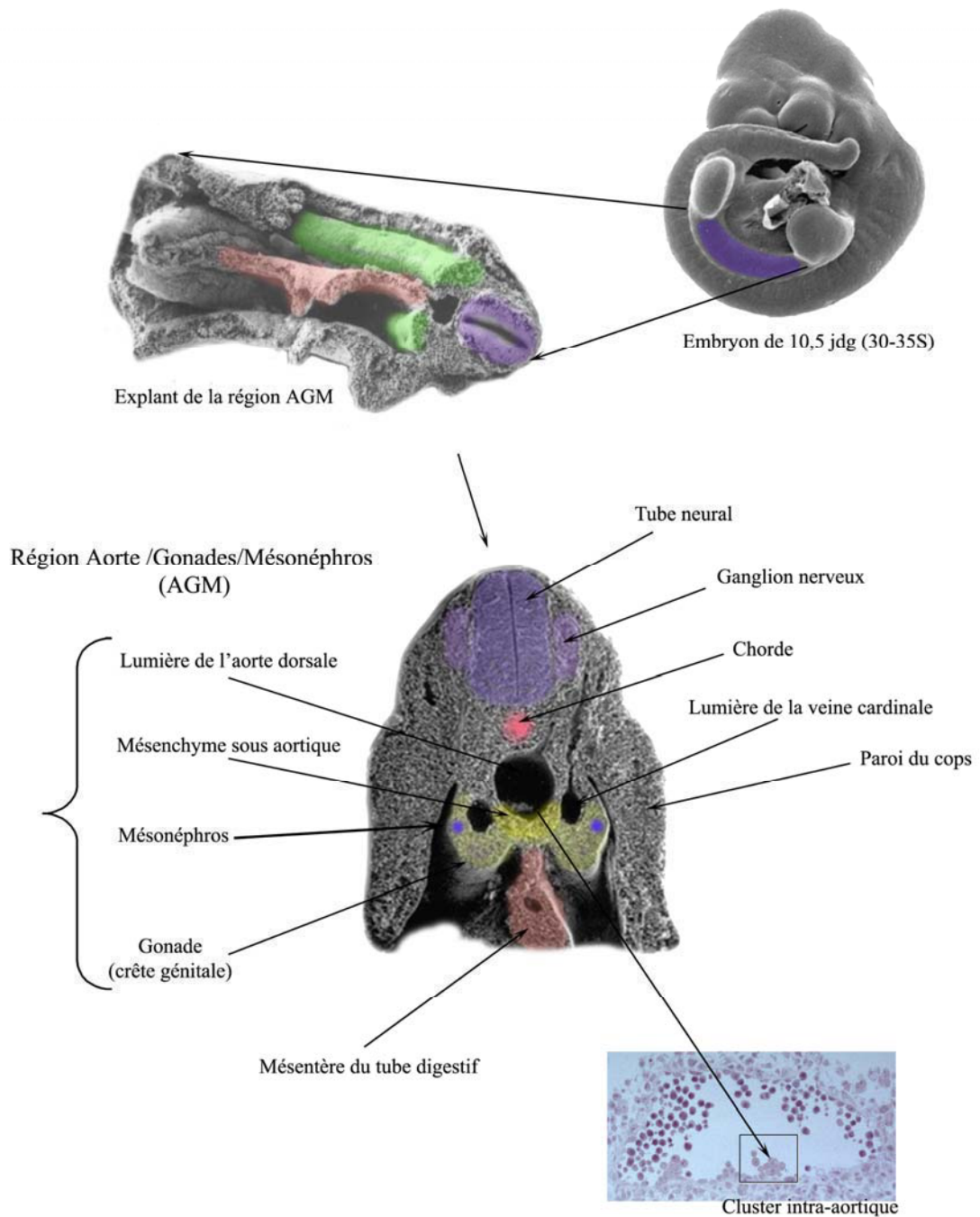
Comme nous l'avons décrit précédemment, l'AGM est dérivée de la splanchnopleure intra-embryonnaire à 8,5 jdg, et regroupe, à 10 jdg, l'aorte dorsale (résultant de la fusion des aortes paires), les gonades et le mésonéphros (rein intermédiaire). Il s'agit donc d'une structure complexe qui s'articule autour de l'axe de l'aorte dorsale et de ses ramifications (artère omphalo-mésentérique). Cette région est impliquée dans la génération des CSH chez tous les vertébrés, embryons de poisson, de Xénope, de poulet, de souris (Galloway and Zon, 2003), ainsi que chez l'embryon humain (Peault and Taviani, 2003).

L'utilisation du terme AGM pour définir le site intra-embryonnaire de localisation des CSH est très vaste. L'apparition des CSH dans cette structure se matérialise par la présence, sur la paroi ventrale de l'aorte, des « clusters » intra-aortiques. Néanmoins, il est très facile de comprendre que l'isolation de ces « clusters » est délicate, voire irréalisable. Plusieurs données montrent que les CSH sont contenues dans un espace contenant l'aorte et son environnement immédiat. La quantification des précurseurs multipotents dans les différents constituants de l'AGM a démontré que la fraction uro-génitale ne contenait pas de CSH (Godin et al., 1999). De même, des expériences de RLT ont montré que cette activité était restreinte à la région aortique (de Bruijn et al., 2000). En conclusion, le site hématogène intra-embryonnaire se limite à l'aorte (sur sa partie ventrale) et au mésenchyme sous-jacent (Figure 19).

La réalisation de chimères caille-poulet a permis de montrer que l'origine de l'endothélium aortique est double (Pardanaud et al., 1996). Les parties dorsales et latérales de l'aorte ont une origine somitique, alors que le plancher aortique a une origine splanchnopleurale. La Sp, par opposition à toutes les autres sources mésodermiques greffées de l'embryon (mésoderme axial et mésoderme somatopleural), est la seule à contribuer à la formation des « clusters » hématopoïétiques. Plus récemment, toujours en utilisant le système de chimères caille-poulet, des auteurs ont confirmé l'origine splanchnopleurale de la partie ventrale de l'aorte, précisant que cette structure était progressivement remplacée par une seconde vague de cellules endothéliales issues des somites (Pouget et al., 2006). L'observation au microscope électronique de la partie ventrale de l'aorte chez le poulet, la souris et l'homme a montré que l'endothélium et sa membrane basale

sont localement désorganisés sous les « clusters » hématopoïétiques (Garcia-Porrero et al., 1995; Jaffredo et al., 1998; Tavian et al., 1999) (Figure 19).

Figure 19 : Structure de la région Aorte/Gonades/Mésonephros



L'AGM est la région qui dérive de la splanchnopleure intra-embryonnaire et qui regroupe, à 10-10,5 jdg, l'aorte dorsale, les gonades et le mésonephros (rein intermédiaire). Il s'agit donc d'une structure complexe qui s'articule autour de l'axe de l'aorte dorsale et de ses ramifications (artère omphalo-mésentérique). C'est sur la paroi ventrale de l'aorte dorsale qu'il est possible de détecter la présence de grappe de cellules correspondant à la production des CSh dans l'embryon.

d) Phénotype des CSH produites dans la région Sp-P/AGM :

Comme nous l'avons vu, dans la partie sur l'hématopoïèse adulte, le phénotype des CSH de la MO, ainsi que celui des progéniteurs et précurseurs intermédiaires, est relativement bien connu. Dans l'embryon, les CSH ne répondent pas au même phénotype. Il faut attendre le stade du FF (13,5-14 jdg) pour voir apparaître les premières cellules souches LSK. Dans la région Sp-PA/AGM, contrairement au SV ou au FF, il n'y a pas de différenciation *in situ* (Godin et al., 1999). Les « clusters » intra-aortiques sont considérés comme la manifestation cytologique de la production des CSH dans l'embryon, et c'est donc initialement sur la base de la caractérisation phénotypique de ces structures que les premiers marqueurs de CSH embryonnaires ont été définis.

Chez le poulet, la souris et l'homme, les « clusters » expriment, entre autres (voir (Godin and Cumano, 2002) pour une revue exhaustive), le marqueur pan-leucocytaire CD45, à des niveaux variables, (Jaffredo et al., 1998; Manaia et al., 2000; Tavian et al., 1996) et CD34 (Garcia-Porrero et al., 1998; Marshall et al., 1999; Tavian et al., 1996). A 11 jdg, les cellules capables de RLT répondent au phénotype c-Kit⁺, CD34⁺, Mac-1⁻ (Delassus et al., 1999; Sanchez et al., 1996) (Figure 20). Plus tôt, à 10 jdg, Ohmura et collaborateurs décrivent une population Ter119⁺, CD45⁺, c-Kit⁺, LFA-1⁻ enrichie en précurseurs multipotents (1:9) (Ohmura et al., 2001). En se basant sur la fréquence des précurseurs multipotents dans cette fraction, le nombre de CSH dans l'embryon à ce stade est compris entre 1 et 2. Pourtant, au même stade, Godin et collaborateurs quantifient en dilution limite environ 60 à 100 précurseurs multipotents par AGM (Godin et al., 1999). Dans cette même étude, l'analyse de la fréquence de précurseurs multipotents dans la fraction cellulaire AA4.1⁺ (1:4) correspond approximativement au nombre de précurseurs multipotents quantifiés dans l'AGM totale. Le marqueur AA4.1⁺ apparaît donc comme un excellent marqueur pour purifier la population des précurseurs multipotents à ce stade de développement. Néanmoins, lors de ces expériences, la capacité des cellules AA4.1⁺ à reconstituer des receveurs irradiés n'a pas été testée.

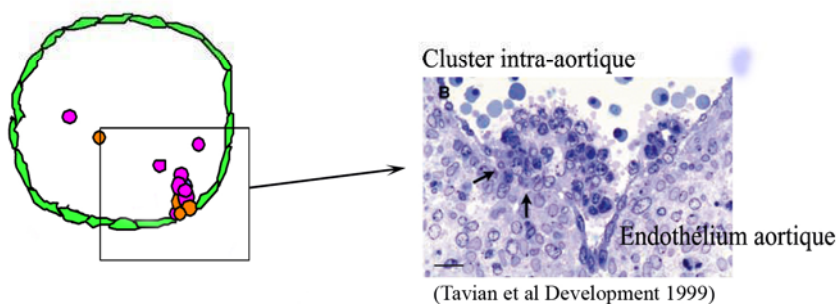
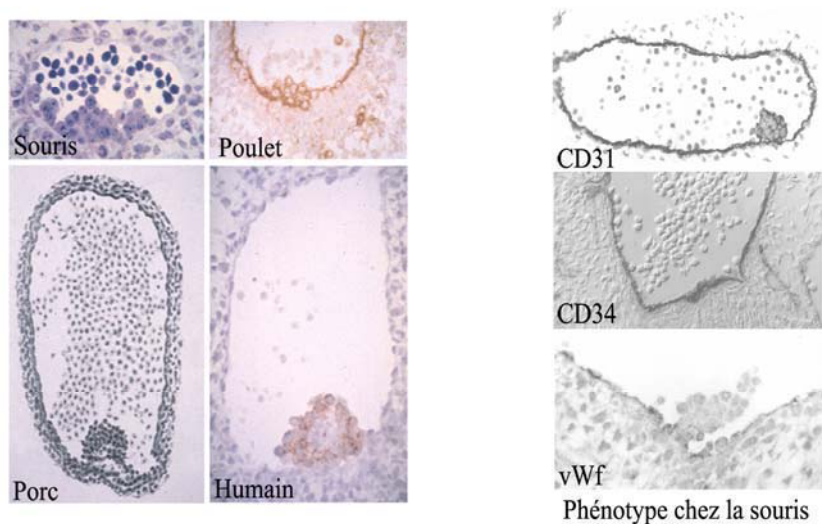
Les différentes études, menées à la fois dans les modèles murin et humain, tendent donc à montrer que les CSH de l'embryon sont contenues dans la fraction c-Kit⁺ de l'AGM. Nous reviendrons plus en détails sur le phénotype des CSH de l'AGM chez la souris lors de la présentation en annexe, de l'article réalisé en collaboration avec l'équipe d'Ana Cumano à l'Institut Pasteur.

e) Mode de formation des CSH de la Sp-PA/AGM

Hémangioblaste « Vitellin » et « Aortique », endothélium hématogène ? Etat de la question : Dans l'AGM, les « clusters », qui apparaissent transitoirement lorsque la génération des CSH atteint son niveau maximum (Godin et al., 1999; Manaia et al., 2000), sont intimement liés à l'endothélium du plancher aortique. Que ce soit au niveau du SV (îlots sanguins) ou de la Sp-PA/AGM (« clusters » hématopoïétiques intra-aortiques), les CE et PH se développent donc toujours en étroite association. L'origine embryologique de ces CE et PH au niveau des sites hématogènes est commune puisque ces deux lignages dérivent du

mésoderme splanchnique. Cette appartenance ne constitue pas en soit un argument suffisant pour postuler de l'existence d'un précurseur commun aux deux lignées. Néanmoins, il a été postulé que les CSH de l'embryon pouvaient provenir d'un précurseur appelé, par référence au SV, hémangioblaste aortique (Jaffredo et al., 2000; Marshall et al., 2000). Dans l'hypothèse de l'existence d'un hémangioblaste aortique, celui-ci peut occuper plusieurs positions dans l'AGM. Il pourrait, soit être niché au sein même de l'endothélium, dans un état quiescent, attendant patiemment son tour pour exprimer toutes ces capacités de différenciation, soit occuper une position plus ventrale, dans le mésenchyme sous-jacent à l'aorte. Ces deux arguments sont tout à fait recevables et nous les discuterons ultérieurement (figure 21).

Figure n°20 : L'aorte dorsale comme site de production des CSH de l'embryon

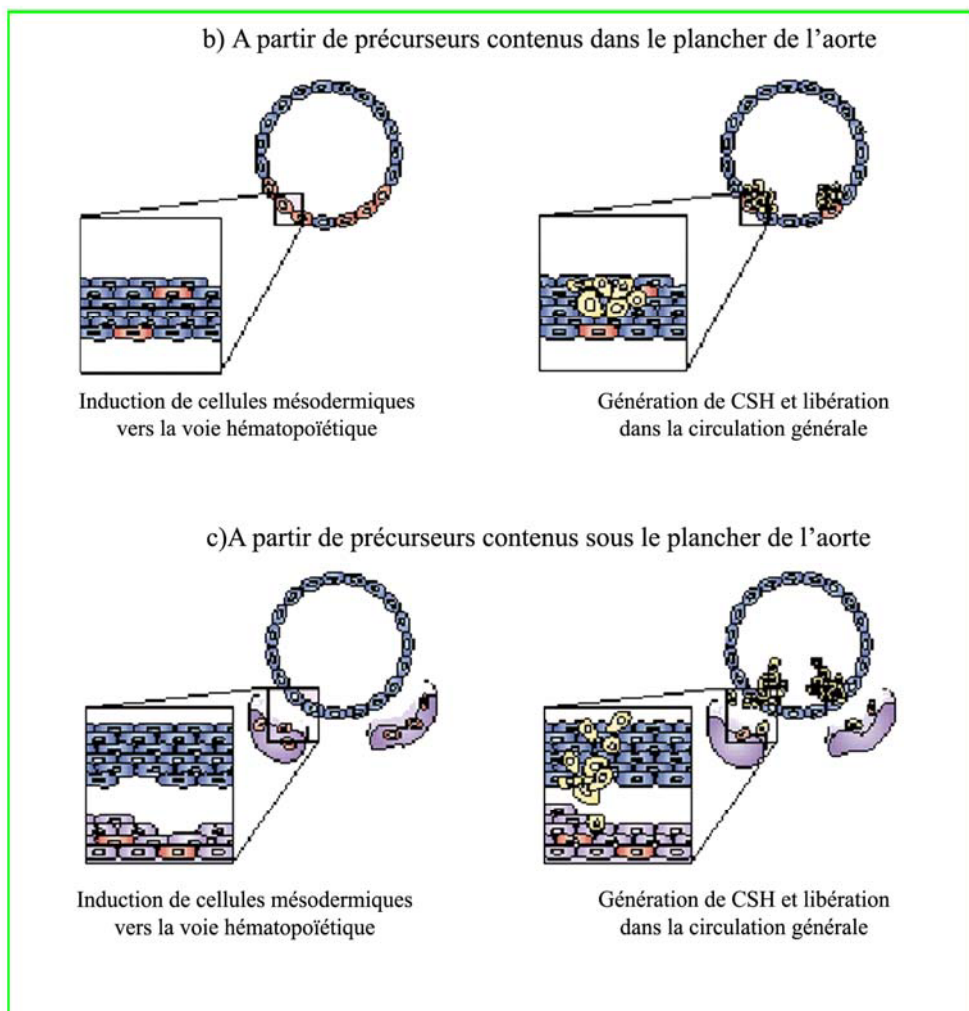
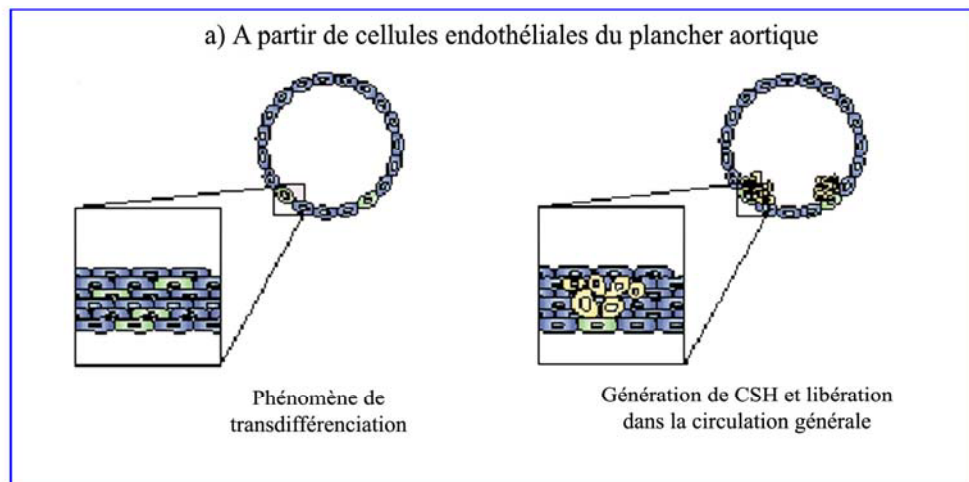


- 1) Les clusters intra-aortiques sont présents chez le poulet, la souris, le porc et l'humain.
- 2) Chez la souris, les clusters expriment entre autre les marqueurs endothéliaux : CD34, CD31 et le facteur de Von Willebrandt.
- 3) Chez le poulet, en microscopie électronique, l'endothélium et la membrane basale apparaissent désorganisés sous les clusters.

Initialement, il était admis que l'hémangioblaste aortique avait un phénotype de type endothélial. Mais, dans la mesure où la différenciation de l'endothélium aortique est manifeste depuis longtemps, certains auteurs ont considéré une hypothèse alternative aujourd'hui largement généralisée. Dans ce cas, l'association CE et PH n'est plus basée sur l'existence d'un précurseur bipotent, mais ferait appel à des cellules spécialisées de la partie ventrale de l'aorte, capables de se transdifférencier pour donner des cellules hématopoïétiques, et, qui plus est, des CSH. A la faveur de cette hypothèse, des études menées chez le poulet tendent à démontrer que les « clusters » intra-aortiques auraient pour origine l'endothélium de l'aorte (Jaffredo et al., 1998). De l'acétyl-LDL couplé au fluorochrome DiI est injecté *in ovo* dans la circulation générale d'embryons à des stades précédant l'apparition des premiers « clusters ». Dans ces expériences, l'analyse des embryons marqués après 12 à 18 heures, révèle la présence de « clusters » CD45⁺ marqués au DiI, apportant de fait un argument de poids en faveur de l'origine endothéliale de ces cellules. L'acétyl-LDL est une molécule qui est, en théorie, uniquement incorporée par les cellules endothéliales (Jaffredo et al., 1998). Néanmoins, il faut noter que l'acétyl-LDL, n'est pas un marqueur endothélial strict. Certaines cellules du système hématopoïétique comme les macrophages, peuvent également l'incorporer. De plus, dans l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle de la paroi de l'aorte, des cellules hématopoïétiques enchâssées dans l'endothélium au moment de l'injection pourraient théoriquement avoir été marquées au cours de l'injection et de ce fait être à l'origine des « clusters » détectés dans cette étude.

Des analyses similaires ont été réalisées dans un modèle murin transgénique. L'utilisation d'une lignée de souris où le gène rapporteur de la GFP est sous contrôle du promoteur du gène codant la protéine Sca-1 (marqueur des CSH de la MO adulte) a permis de montrer que toutes les CSH étaient contenues dans la fraction Sca-1⁺, GFP⁺ de l'AGM à 11 jdg (de Bruijn et al., 2002). De plus, l'observation sur coupes d'AGM au même stade permet de mettre en évidence au niveau de l'endothélium aortique ventral des cellules Sca-1⁺, GFP⁺ exprimant le marqueur CD31⁺, présent sur les CE et les PH (Baumann et al., 2004). Toujours chez la souris, des analyses du potentiel de différenciation de cellules isolées de SV et d'AGM en fonction de l'expression de marqueurs spécifiques ont montré que le potentiel lymphoïde (B et T) semblait enrichi dans la fraction cellulaire VE-cadhérine⁺CD45⁻ (Nishikawa et al., 1998b). Cette fraction correspond, d'après les auteurs, à un phénotype endothélial, la fraction hématopoïétique étant caractérisée par le phénotype CD45⁺ Ter119⁻ (Nishikawa et al., 1998a). Nishikawa et collaborateurs concluent de cette étude qu'il existe des CE aux potentialités hématopoïétiques comparables à celles décrites chez le poulet. En parallèle, des auteurs travaillant à partir d'embryons humains ont caractérisé la fraction cellulaire CD45⁻CD31⁺ de l'AGM comme la seule possédant un potentiel de différenciation hématopoïétique. Toujours d'après leur phénotype, mais aussi en fonction de leur capacité à se différencier et à proliférer en condition « endothéliale », cette population cellulaire a été assimilée aux cellules endothéliales hématogènes du plancher aortique (Oberlin et al., 2002). En conclusion, l'argument majeur permettant de considérer l'endothélium aortique comme source des CSH repose sur l'absence d'expression de CD45 par les cellules de l'AGM capables de donner une progénie hématopoïétique, les autres marqueurs utilisés étant partagés par les CE et PH.

Figure 21: Modèles de génération des CSH de l'AGM



Un parfum de polémique... Avant de développer la partie suivante, il me semble nécessaire de revenir sur les nombreuses controverses ou divergences concernant les modalités de génération des CSH dans l'embryon ou encore l'éventuelle capacité du SV à générer des CSH. Comme j'ai pu le dire précédemment, il reste aujourd'hui un doute dans l'esprit de certains sur l'éventuelle capacité du SV à générer des CSH *de novo*. Des études rapportent effectivement la présence de CSH dans le SV (Kumaravelu et al., 2002; Weissman et al., 1978; Yoder et al., 1997). Dès le départ, lorsque j'ai débuté l'écriture de cette introduction, il me semblait nécessaire de trouver une façon de présenter l'ontogenèse du système hématopoïétique qui me permettrait, autant que faire ce peut, de lever toutes les ambiguïtés précédemment énoncées. Pour cela, il me semblait raisonnable de présenter le SV, puis le site intra-embryonnaire, afin de souligner que, dans ces deux sites, la génération des PH s'effectue de façon indépendante.

Toujours dans le souci de clarifier l'origine spatiale des CSH, j'ai débuté la description du site intra-embryonnaire par les stades les plus précoces. La Sp puis la Sp-PA, afin d'amener le lecteur à constater qu'effectivement le SV contient des CSH. Mais dans tous les cas, les études ayant permis de les caractériser ont été réalisées après l'établissement de la circulation entre le SV et corps embryonnaire. Il est effectivement impossible d'exclure catégoriquement la possibilité d'une production *in situ* de CSH dans le SV. Néanmoins, les données acquises du modèle aviaire et, plus récemment chez la souris, conduisent raisonnablement à penser que ces cellules transitent dans le SV, via la circulation, et qu'elles sont originaires de la Sp-PA/AGM. Puis, je me suis attaqué à une autre controverse de l'hématopoïèse embryonnaire, qui concerne la nature même du précurseur dont dérivent les CSH de l'embryon. Comme pour le SV (Choi et al., 1998; Fehling et al., 2003), le consensus actuel consiste à considérer l'existence d'un précurseur commun bipotent, au potentiel hémato-endothélial ou même d'un endothélium hémotogène; (de Bruijn et al., 2002; Jaffredo et al., 1998; Nishikawa et al., 1998b; Oberlin et al., 2002).

A mon sens, ce serait faire preuve de mauvaise foi de ne pas constater l'étroite relation de lignage entre CE et PH tant au niveau du SV que de la région ventrale de l'aorte. Néanmoins, pour être le plus objectif possible, il est également indiscutable que la caractérisation des CSH de l'AGM s'appuie le plus souvent sur l'utilisation de marqueurs de surface considérés comme spécifique de lignage. Pourtant, le marqueur CD31 considéré comme un marqueur de CE, est exprimé sur les cellules hématopoïétiques (Baumann et al., 2004), tout comme la VE-cadhérine (Nishikawa et al., 1998a). Récemment, comme nous l'avons vu dans la partie sur le phénotype des PH du SV, le marqueur CD41 est apparu comme le premier marqueur membranaire identifiable lors de la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique, avant même l'apparition du marqueur pan-leucocytaire CD45 (Mikkola et al., 2003). La liste est longue et je pense avoir fait passer le message.

Cet interlude critique me permet d'introduire une dernière hypothèse sur le mode de génération des CSH dans L'AGM. Cette hypothèse trouve naturellement sa place à la fin de cette partie, non pas parce qu'elle est à contre-courant des postulats existants, mais plutôt parce qu'elle est la synthèse des deux types

d'approches qui ont jusqu'à présent permis de caractériser soit le phénotype, soit la localisation des CSH dans l'AGM.

Origine sous-aortique des CSH de l'embryon : Les principales analyses réalisées jusqu'à présent se sont basées sur des études fonctionnelles ou phénotypiques des PH produits dans la région aortique. En 2005, une étude basée sur une approche mixte, utilisant le phénotype des CSH intra-embryonnaires pour les localiser dans l'embryon a été effectuée. Ce travail s'appuie sur la constatation que parallèlement et durant toute la phase de production des CSH, on peut observer dans le mésenchyme sous jacent à l'aorte des structures localisées sous les clusters, appelées plages sous-aortiques (SAP pour « sub-aortic patches »). Ces régions particulières du mésenchyme expriment des facteurs impliqués dans l'hématopoïèse et pourraient correspondre au site d'émergence des précurseurs des CSH (Manaiia et al., 2000). Dans ce travail effectué en collaboration avec l'équipe d'Ana Cumano à l'Institut Pasteur (Bertrand et al., 2005b), l'objectif était de corréler des études phénotypiques, de potentiel de différenciation *in vitro* et de reconstitution *in vivo*, avec des analyses d'expression génique *in situ* (Figure 22).

Les précurseurs multipotents ont d'abord été caractérisés phénotypiquement. Ils sont enrichis à raison 1:1,7 dans la fraction cellulaire $CD45^{-low}c\text{-Kit}^+ AA4.1^+CD31^+CD41^+$ (Appelée Fraction E). Fonctionnellement, cette population est la seule à posséder une capacité de RLT dans des receveurs $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ irradiés sub-létalement. Dans un second temps, des études de RT-PCR quantitatives réalisées sur cette fraction enrichie en CSH ont permis de définir le patron d'expression génique de cette population en se basant sur l'analyse spécifique de gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique (EBF, Pax-5, Notch-1, EPO-R), ou plus généralement exprimés dans le développement des CSH. En conclusion de cette étude, il est apparu que la fraction E, enrichie en CSH, exprime les facteurs $lmo2$, $GATA-2$ et $GATA-3$. Ceci a permis de définir, en quelque sorte, la signature moléculaire des CSH de l'AGM qui correspond au phénotype suivant : $CD45^{-low} AA4.1^+ CD31^+ CD41^+ Flk-1^{-low} LMO2^+ GATA-2^+ GATA-3^+$. L'intérêt de cette approche est qu'elle permet de distinguer la fraction endothéliale ($CD45^- AA4.1^+ CD31^+ CD41^- Flk-1^+ GATA-2^+ GATA-3^-$) de la fraction hématopoïétique précédemment décrite. L'analyse par immunohistochimie et hybridation *in situ* de l'AGM a permis de localiser les cellules répondant au phénotype des CSH au niveau des « clusters » intra-aortiques et des plages sous-aortiques.

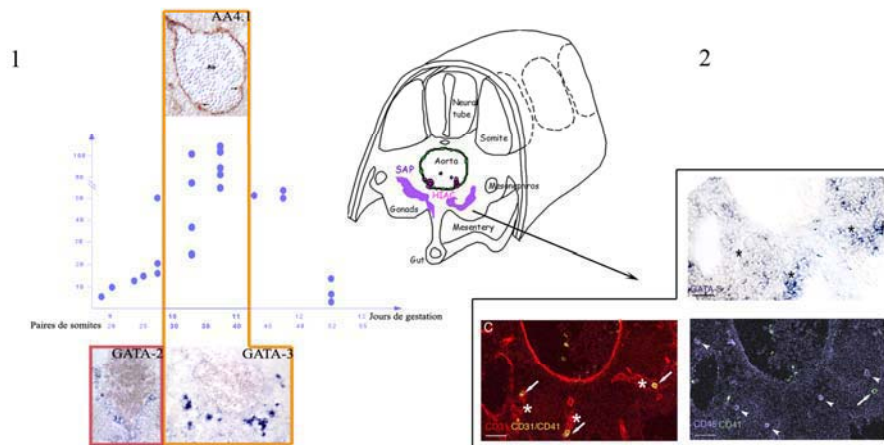
De l'ensemble de ces observations, un nouveau modèle de génération des CSH de l'AGM pouvait être proposé (Figure 21 et 22). Dans l'AGM, les CSH $CD45^{-low} CD31^+ AA4.1^+ CD41^+ GATA-2^+ GATA-3^+$ proviendraient d'un précurseur localisé dans les plages sous-aortiques. Elles migreraient alors au travers de l'endothélium aortique, ce qui aurait pour conséquence de former les clusters intra-aortiques, avant de se disséminer dans l'embryon et par là même de coloniser le FF (Bertrand et al., 2005b).

Dans l'AGM, contrairement au SV et au FF, les PH ne se différencient pas sur place. Comme nous l'avons décrit dans la partie sur les CSH de l'adulte, le microenvironnement cellulaire est crucial pour le maintien des capacités d'autorenouvellement et de différenciation des CSH. Dans cette mesure, nous sommes

en droit de penser que cette région particulière du mésenchyme sous-aortique pourrait jouer un rôle dans l'embryon. Reste à définir quel est le rôle exact de cette structure dans la détermination, la génération ou (mais ceci est moins probable) dans l'amplification du contingent de CSH.

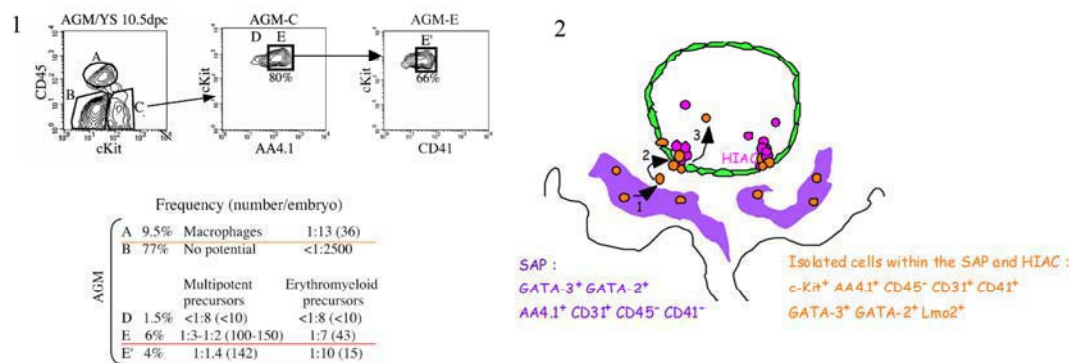
Ces chapitres nous ont permis de définir le lieu et les modalités d'apparition des CSH dans l'embryon, mais l'histoire ne s'arrête pas là. Ces cellules vont entamer un long périple dans l'embryon, puis le fœtus avant de coloniser les organes hématopoïétiques dit définitifs.

Figure n° 22 : Origine sous aortique des CSH de l'embryon



A/ Localisation des plages sous aortique (SAP) :

- 1) Durant toute la phase de production des CSH, on peut observer dans le mésenchyme sous-jacent à l'aorte des structures localisées sous les clusters.
- 2) Ces plages expriment des facteurs impliqués dans l'hématopoïèse (GATA-2 et GATA-3). Les CSH présentes dans les "clusters" et les SAP sont également CD31 et CD41 positives et CD45 faibles ou négatives.



B/ Un nouveau modèle de génération des CSH dans l'embryon :

- 1) Les cellules de la fraction E sont enrichie en précurseurs multipotents et sont capablent de reconstituer l'hématopoïèse de souris léthalement irradiier. Dans l'AGM, les cellules de la fraction E sont retrouvées dans les plages sous aortiques et les clusters intra-aortiques (2)
- 2) Un nouveau modèle de génération des CSH dans l'AGM est proposé : dans l'AGM, les CSH se différencient à partir d'un précurseur localisé dans des plages sous-aortiques et contenu dans la fraction E. Les CSH migrent alors au travers de l'endothélium aortique pour former les clusters intra-aortiques qui finalement permettront la dissémination des CSH dans l'embryon et par là même la colonisation du FF.

IV/ Les organes hématopoïétiques au cours du développement

Jusqu'à présent, les parties précédentes ont consisté à décrire les sites de génération des PH de l'embryon. Comme nous l'avons vu, contrairement au SV, où les PH effectuent une différenciation *in situ*, les CSH de l'AGM ont besoin de coloniser les organes hématopoïétiques de l'embryon, puis du fœtus pour effectuer leur différenciation. Depuis leur génération dans l'AGM, nous allons maintenant décrire la migration et la différenciation des CSH. Ce périple nous ramènera à la première structure hématopoïétique décrite dans la deuxième partie de cette introduction : la moelle osseuse (Figure 23).

Le foie, organe majeur de l'hématopoïèse fœtale : Dans l'embryon, l'endoderme définitif produit les organes digestifs, mais aussi les tissus qui se forment caudalement par rapport à l'estomac : le foie, le pancréas et la vésicule biliaire. L'organogenèse du FF débute aux alentours de 9-10 jdg. Le rudiment hépatique se forme à partir d'un diverticule endodermique de l'intestin associé au mésenchyme du septum transversum. L'interaction du mésenchyme avec la partie endodermique induit la prolifération de l'endoderme et sa ramification, pour former l'épithélium glandulaire du foie. Les résultats obtenus par Houssaint en 1981 ont démontré l'origine extrinsèque des PH colonisant le FF : l'activité hématopoïétique du rudiment hépatique dépend de l'apport de PH, qui débute au dixième jour de gestation (28-30 S) (Houssaint, 1981; Johnson and Moore, 1975).

L'hématopoïèse du foie fœtal ne résulte pas exclusivement de la différenciation des CSH de l'AGM. En effet, les PH du SV colonisent également cette ébauche et y effectue une différenciation érythromyéloïde transitoire (Palis et al., 2001). Le FF assure l'expansion des CSH issues de l'AGM (Kumaravelu et al., 2002), mais également leur différenciation dans tous les lignages hématopoïétiques : érythroïde, lymphoïde et myéloïde (Traver et al., 2001), à l'exception du lignage lymphoïde T. Le FF est principalement érythropoïétique et différencie des globules rouges de type définitif exprimant des hémoglobines adultes. On peut noter que dans le FF, la séquence de différenciation des lymphocytes B s'effectue de façon très analogue à celle de l'adulte. Le FF ne participe pas à la différenciation des lymphocytes T, mais il produit les premiers précurseurs engagés vers ce type de lignage et qui migreront ensuite vers le thymus fœtal pour réaliser leur différenciation terminale.

Le thymus fœtal : Le thymus foetal se développe, à 10 jdg, à partir de l'ectoderme des troisième et quatrième poches branchiales, de l'endoderme pharyngien et du mésenchyme des arcs pharyngiens, issus de la crête neurale. Il est composé d'un ensemble de cellules épithéliales homogènes entourées de cellules mésenchymateuses. La différenciation de l'épithélium commence à devenir évidente dès 12 jdg, avec la différenciation de cellules épithéliales médullaires situées au centre de l'ébauche. Il faut attendre le quatorzième jour de gestation pour voir apparaître les régions corticale et médullaire.

Le thymus fœtal acquiert rapidement sa compétence à soutenir la lymphopoïèse T. Les rudiments thymiques d'embryon de souris de 11 jdg, contiennent des PH, ce qui n'est pas le cas à 10 jdg (Kondo et al., 1997). La colonisation du thymus semble s'effectuer en 2 vagues successives (Douagi et al., 2000). La première donne lieu à un contingent de cellules T qui se différencient rapidement entre 11 et 12 jdg. Entre 14 et 16 jdg, la seconde vague de colonisation est à l'origine de lymphocytes T qui passent par une étape de prolifération intense, avant de se différencier. Il faut noter que certains auteurs ont suggéré une colonisation continue du thymus à partir de précurseurs du FF (Douagi et al., 2002).

L'omentum et la rate fœtale : Comme les ganglions lymphatiques, la rate est le siège de prolifération de lymphocytes et d'élaboration de la réaction immunitaire. Elle a aussi pour fonction chez l'adulte de purifier le sang des globules rouges et des plaquettes détériorées et d'éliminer, à travers ses sinus, les débris, les bactéries, les virus et les toxines. A 10,5 jdg, le rudiment de l'omentum se définit comme une couche cellulaire qui recouvre l'élargissement du tube digestif, qui correspond au futur estomac. Au cours du développement, cette couche s'aplatit et se vascularise. La rate acquiert sa forme caractéristique à 13,5 jdg. Elle se développe à l'intérieur de l'omentum par des épaissements qui progressent simultanément en diagonale depuis les extrémités externes pour se réunir au milieu de l'estomac (Sty and Conway, 1985). La rate fœtale (RF) est le siège de l'érythropoïèse chez le fœtus. Contrairement à la souris, chez l'humain, cette fonction cesse à la naissance, avec malgré tout, la possibilité d'être réactivée en cas de déficit grave en globules rouges.

La démonstration d'une colonisation extrinsèque pour la rate et l'omentum est récente (Godin et al., 1999). Avant 12,5 jdg, aucun précurseur n'a pu être détecté dans la région omentum-rate, excluant la possibilité d'une génération *in situ* de PH. Les premiers précurseurs lympho/myéloïdes sont détectés dans la rate à 12,5 jdg et l'activité hématopoïétique débute à 14,5 jdg. Des expériences complémentaires ont également permis de montrer qu'entre 12,5 et 15,5 jdg, l'omentum contient une quantité faible et constante de précurseurs B et T et que les précurseurs érythromyéloïdes sont absents. L'omentum est colonisé à partir de 14-15 jdg par des précurseurs engagés dans la voie lymphoïde et ne permet pas leur expansion. Contrairement à la rate, l'omentum n'est donc pas un organe lymphoïde primaire (Godin et al., 1999).

La RF est rapidement colonisée par des PH qui sont capables en cultures organotypiques de se différencier *in situ* en cellule B et la présence de CSH est détectée à partir de 14,5 jdg. L'analyse du potentiel de différenciation des CSH de l'AGM dans l'environnement splénique a permis par l'utilisation de cultures organotypiques de RF d'étudier le rôle du microenvironnement. Le stroma de la RF ne constitue pas, au même titre que celui de la moelle osseuse, une niche permettant l'autorenouvellement des CSH. Il est capable d'assurer la différenciation à partir de précurseurs B déjà engagés, mais n'est pas permissif à l'engagement des précurseurs multipotents vers ce lignage (Bertrand et al., 2006b).

Le placenta : Récemment, deux équipes indépendantes ont décrit le placenta comme un site enrichi en CSH, à partir de 11 jdg (Gekas et al., 2005; Ottersbach and Dzierzak, 2005). Dans le placenta, les CSH capables d'une activité RLT expriment les marqueurs c-Kit, CD34, CD31, CD41 et CD45. La présence de CSH dans le placenta, qui constitue une véritable « éponge sanguine » pourrait être le fait de l'accumulation de CSH présentes dans la circulation systémique. D'un autre point de vue, le placenta pourrait jouer le rôle de niche pour les CSH, au même titre que la MO. En tout cas, l'existence d'une production *de novo* dans cette structure semble à priori exclue.

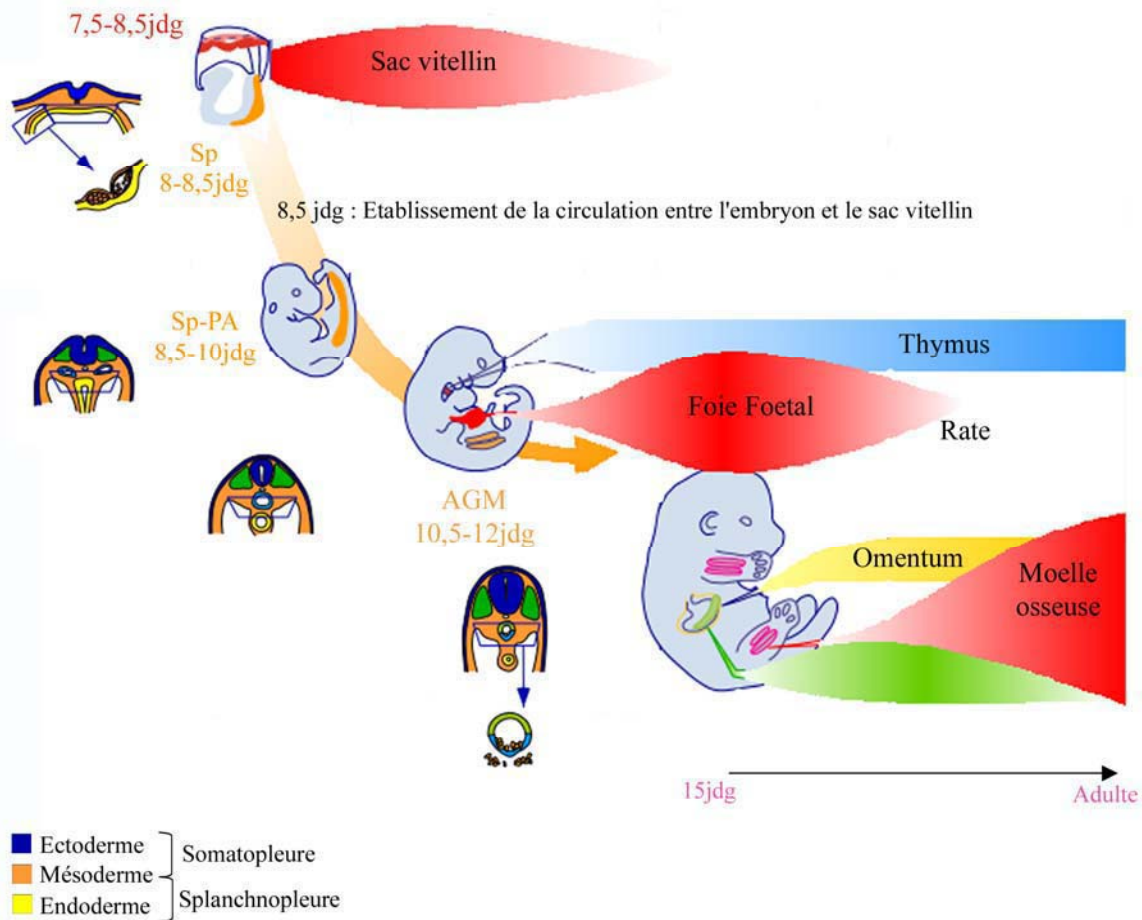
V/ Conclusion

Au cours de l'ontogenèse, le Sac Vitellin est le premier site de l'embryon doté d'un potentiel hématopoïétique. De plus, il est capable de générer et de différencier des précurseurs hématopoïétiques *in situ*. Il est alors facile de comprendre pourquoi il a longtemps été considéré comme le site unique de production de CSH capables de coloniser les organes hématopoïétiques au fur et à mesure de leur apparition. Cette hypothèse, formulée par Moore, Owen et Metcalf (Moore and Metcalf, 1970), a été acceptée par la communauté scientifique jusqu'à ce qu'elle soit remise en cause par la démonstration chez les oiseaux de l'existence d'une seconde source, intra-embryonnaire de cellules à potentiel colonisateur, « progéniteurs » des CSH définitives.

Les PH du SV apparaissent avant l'établissement de la circulation avec le corps embryonnaire, et ce sont les expériences basées sur l'analyse des potentiels avant cette étape qui

ont permis, chez le poulet (chimère de SV) et chez la souris (culture organotypique), de définir l'existence, dans l'embryon, d'un site indépendant de production de PH. Ainsi, l'analyse indépendante du potentiel de différenciation des PH issus de ces deux sites a permis de définir l'AGM comme le site unique de production de CSH dans l'embryon (Figure 23). L'existence d'une source intra-embryonnaire de CSH responsables de l'hématopoïèse définitive a elle aussi été démontrée chez l'ensemble des Mammifères, y compris chez l'homme.

Figure 23 : Localisation et origine des cellules hématopoïétiques de l'embryon de souris



Dans l'embryon, deux vagues de précurseurs hématopoïétiques se succèdent. Ces précurseurs sont générés de façon indépendante dans deux sites distincts de l'embryon. De plus, leurs potentialités de différenciation et de maintien n'est pas identique.

Les premiers apparaissent entre 7,5 et 8,5 jdg dans le sac vitellin. Vers 8 jdg, un second événement de détermination de précurseurs hématopoïétiques a lieu dans le site intra-embryonnaire de la Sp. La Sp évolue en Sp-PA, puis en AGM entre 8,5 et 11,5 jdg. A ces stades, le site intra-embryonnaire produit des CSH. A partir de 11 jdg, le foie foetal assure la production des cellules hématopoïétiques et le maintien des CSH. Après 15 jdg, la moelle osseuse devient l'organe majeur de l'hématopoïèse.

Quatrième Partie

Bases moléculaires de l'hématopoïèse
embryonnaire

L'objectif de cette dernière partie est de caractériser les facteurs indispensables ou importants pour l'émergence des précurseurs hématopoïétiques de l'embryon (la liste ne sera pas exhaustive), et donc des futures CSH de l'adulte. Dans l'embryon, deux vagues de PH apparaissent séquentiellement au cours du développement. Dans les deux cas, les PH apparaissent au niveau du mésoderme splanchnique dont l'origine diffère dans les sites extra- et intra-embryonnaires. C'est pourquoi, nous nous interrogerons tout d'abord sur l'existence d'une éventuelle unité dans les mécanismes responsables de l'induction du mésoderme vers la voie hématopoïétique. Je tiens dès lors à préciser que l'argumentation sera essentiellement basée sur les résultats acquis lors de l'inactivation, chez la souris, de facteurs impliqués dans l'hématopoïèse adulte, mais utilisera aussi les apports de modèles comme le poisson zèbre ou le xénope.

Au cours de ma thèse, j'ai mis au point un protocole permettant de transduire les PH du SV de l'embryon de souris, et mon travail consistait plus particulièrement à évaluer le rôle du facteur de transcription GATA-3 sur les PH dans ce site hématogène. Nous n'échapperons pas aux facteurs GATA dans cette partie, mais nous reviendrons plus en détails sur leurs caractéristiques dans l'introduction du travail sur la surexpression de GATA-3 dans le SV (Résultats, Partie II, Article n°2).

I/ Hématopoïèse « primitive » versus « définitive », similitudes et divergences

a) Du mésoderme vers la voie hématopoïétique

L'analyse des mécanismes et des gènes impliqués dans la spécification des précurseurs hématopoïétiques à partir du mésoderme conduit à se poser une première question : Les PH des deux sites hématogènes de l'embryon sont-ils initialement identiques ou distincts ?

Pour répondre à cette question, deux points de vue sont possibles : Si pendant les phases précoces du développement, les mécanismes à l'origine de leur apparition dans l'embryon sont initialement identiques, la détermination du mésoderme vers une voie hématopoïétique conduira à la génération de CSH dans le SV et la Sp-PA/AGM. Dans ce cas, les potentialités de cette CSH sont restreintes dans le SV pendant le développement (induction différentielle, rôle du microenvironnement). Dans le cas contraire, les PH seront générés à partir de deux séquences de développement différentes, avec pour conséquence que les propriétés intrinsèques à chaque précurseur seront initialement distinctes.

L'analyse chez l'embryon des effets de certaines inactivations géniques permet de distinguer deux groupes de gènes qui pourraient être impliqués dans la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique. L'un regroupe des gènes dont l'inactivation produit un effet délétère à la fois sur la mise en place de l'hématopoïèse primitive (du SV) et définitive (CSH de l'AGM). Le second inclut des gènes dont l'inactivation ne perturbe que l'hématopoïèse définitive

BMP4 est responsable de la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique : BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) est un membre de la famille TGF- β dont la fonction dans le développement hématopoïétique a été étudiée en profondeur dans le modèle Xénope. Pour comprendre la fonction de BMP4, il est donc nécessaire de décrire brièvement le développement hématopoïétique dans ce modèle.

L'embryon de Xénope possède, comme les autres vertébrés, deux sites de génération indépendants des PH (Ciau-Uitz et al., 2000), l'îlot sanguin ventral (ou VBI pour « ventral blood islands ») et un territoire dorsal proche du pronéphros analogue à la Sp-Pa/AGM et appelé lame latérale dorsale (ou DLP pour « dorso lateral plate ») (Chen and Turpen, 1995). L'îlot sanguin ventral contribue à l'hématopoïèse primitive, tandis que les cellules issues de la lame latérale dorsale contribuent exclusivement à l'hématopoïèse définitive (Lane and Smith, 1999; Tracey et al., 1998; Turpen et al., 1997). Comme chez l'embryon de souris, le VBI assure essentiellement la production d'érythrocytes embryonnaires et lame latérale dorsale (« AGM »), celle des CSH définitives. Néanmoins, il semblerait que les îlots sanguins ventraux pourraient contribuer à la fois à l'hématopoïèse primitive et définitive, comme le montre la persistance de lymphocytes T dérivés du VBI (Smith et al., 1989).

La détermination vers la voie hématopoïétique s'effectue pendant la segmentation suite à l'induction du mésoderme des zones marginales ventrale et latérale, qui expriment le facteur BMP-4. Plusieurs données indiquent une fonction majeure de BMP-4 dans la détermination vers la voie hématopoïétique : 1) l'injection de molécules d'ADNc codant pour BMP4 au stade 2 cellules conduit à la formation exagérée de cellules sanguines (Jones et al., 1996; Maeno et al., 1994) ; 2) l'injection de constructions dominantes négatives pour les récepteurs aux BMP4 conduit à l'absence de cellules sanguines (Maeno et al., 1994; Suzuki et al., 1994).

Le plus intéressant avec la protéine BMP-4 tient sans doute à son rôle dans la « respécification de lignage ». Nous avons vu dans la partie sur le rôle de l'endoderme dans la spécification des cellules de l'épiblaste, que l'induction de l'hématopoïèse était largement liée à des facteurs diffusibles, dont BMP-4 (Gadue et al., 2005). Chez le Xénope, l'injection de BMP-4 dans un territoire embryonnaire d'origine ectodermique induit ce feuillet à exprimer le gène codant pour la globine (Huber et al., 1998; Mead et al., 1998). De façon similaire, chez la souris, le traitement par du BMP-4 de fragments antérieurs d'épiblaste, normalement destinés à produire des dérivés neuraux, induire la production de cellules érythroïdes (Kanatsu and Nishikawa, 1996).

Tous ces arguments permettent de situer BMP-4 à la base de la hiérarchie des gènes nécessaires à l'émergence des précurseurs hématopoïétiques.

Le facteur de transcription SCL/Tal-1 est indispensable à l'émergence des cellules hématopoïétiques de l'embryon : Le facteur de transcription à motif bHLH SCL/Tal-1 a été identifié par des translocations chromosomiques associées aux leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) (Visvader and Begley, 1991). Les études d'expression de SCL/Tal-1 réalisées chez la souris adulte par Northern Blot (Green and Begley, 1992), hybridation *in situ*, PCR (Mouthon and Mathieu, 1993), immunohistochimie (Pulford et al., 1995),

ainsi que par l'analyse de souris transgéniques exprimant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur de SCL/Tal-1 (Elefanty et al., 1998), ont montré que ce facteur était exprimé, d'une part, par les précurseurs immatures et, d'autre part, par les cellules des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires.

Au cours du développement SCL/Tal-1 est exprimé depuis les stades les plus précoces (au niveau du mésoderme) dans les deux sites hématogènes de l'embryon, à la fois au niveau des cellules endothéliales et hématopoïétiques, aussi bien au niveau du Sac Vitellin que de l'AGM (Elefanty et al., 1999; Silver and Palis, 1997) (voir aussi Résultats, Partie I, Article n°1), mais également au niveau de certains neurones du système nerveux central (van Eekelen et al., 2003). Le même type de patron d'expression, hématopoïétique et endothélial, a été obtenu dans d'autres modèles comme le poisson zèbre (Gering et al., 1998), le Xénope DLP (Ciau-Uitz et al., 2000; Mead et al., 1998; Turpen et al., 1997) et le poulet (Minko et al., 2003), mais aussi chez l'embryon humain (Labastie et al., 1998). Chez le Xénope, SCL/Tal-1 est essentiellement exprimé dans le mésoderme ventral (Mead et al., 1998). De l'ensemble de ces observations, il apparaît que ce facteur pourrait jouer un rôle crucial dans la spécification du mésoderme « hémangioblastique ».

L'invalidation génique de SCL/Tal-1 a pour principale conséquence une létalité embryonnaire aux alentours de 8,5 jdg, avec un rôle délétaire sur l'hématopoïèse primitive (Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995). En conséquence de cette morbidité précoce, la possible implication de l'absence de ce facteur dans les étapes plus tardives de l'hématopoïèse définitive ne pouvait être analysée. L'analyse de la contribution de cellules ES *scl*^{-/-} injectées dans des blastocystes sauvages a permis de préciser le rôle de ce facteur dans l'hématopoïèse définitive, et donc plus largement dans la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique. En effet, les cellules ES mutantes ne participent pas à la génération de cellules hématopoïétiques définitives dans les souris chimères (Porcher et al., 1996; Robb et al., 1996). SCL/Tal-1 est donc requis pour la génération des cellules hématopoïétiques du SV et du site intra-embryonnaire.

Le phénotype résultant du gain de fonction de la protéine SCL/Tal-1 chez ces vertébrés inférieurs concorde avec celui qui résulte de sa perte de fonction chez la souris. En amont de la hiérarchie, au niveau de précurseurs mésodermiques indifférenciés, SCL/Tal-1 est proposé comme le « gène maître » de la différenciation hématopoïétique.

Les étapes clés de l'action de SCL/Tal-1 sur « l'initiation » de l'hématopoïèse, ont été précisées par l'utilisation de cellules ES *scl* inductibles (Endoh et al., 2002). Ces études ont permis de confirmer que SCL/Tal-1 exerçait son action au stade de développement précédant l'apparition des premières cellules VE-cadhérine⁺, correspondant aux toutes premières étapes de la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique (Nishikawa et al., 1998a).

Non seulement SCL/Tal-1 est indispensable à l'émergence des cellules hématopoïétique dans l'embryon, mais il participe également au développement vasculaire du SV et de l'embryon (Patterson et al., 2005; Sanchez et al., 1999). D'ailleurs, il est exprimé par l'hémangioblaste présomptif, qui peut-être

caractérisé en culture à partir des cellules ES par la formation de colonies spécifiques où apparaissent à la fois des CE et des PH («blast colony forming cell : BL-CFC») (Choi et al., 1998; Kennedy et al., 1997).

Chez le Xénope (Mead et al., 1998) ou le poisson-zèbre (Gering et al., 1998), l'expression ectopique de SCL/Tal-1, au stade 2-4 cellules, induit une production anormalement élevée d'érythroblastes hémoglobinisés. Chez le poisson zèbre, ce phénomène est précédé d'une augmentation de la production de cellule SCL⁺ Flk-1⁺ (mésoderme hémangioblastique) aux dépens des autres compartiments mésodermiques et somitiques (Gering et al., 2003). De plus, l'injection de constructions codant pour des récepteurs BMP-4 dominants négatifs inhibe l'expression du gène *SCL* dans la région ventrale des embryons de Xénope et, contrairement à BMP-4, la surexpression de SCL au stade 2 cellules n'affecte pas la régionalisation du feuillet mésodermique tout en induisant l'expression de la globine dans les jeunes larves (Mead et al., 1998).

SCL/Tal-1 intervient donc en aval dans la cascade des événements induits par BMP-4. Au moins chez le Xénope, le facteur SCL/Tal-1 spécifie le lignage hématopoïétique une fois que les processus d'induction et de régionalisation du mésoderme ont eu lieu.

De nombreux points communs entre lmo2 et SCL/Tal-1 : Comme SCL/Tal-1, Lmo-2/Rbtn2 a été identifiés chez l'humain grâce à son implication dans des translocations associées à des leucémies aigües lymphoblastiques T (LAL-T) (Boehm et al., 1991). La protéine LMO-2 (ou Rbtn2) appartient à la famille des gènes LIM-Only (dépourvus d'homéoboites), qui contiennent deux domaines LIM structurellement similaires à des doigts de zinc (Sánchez-García and Rabbitts, 1994).

Au cours du développement, le patron d'expression de lmo2 présente des similitudes marquées avec celui de SCL/Tal-1, puisqu'il est exprimé par le mésoderme, puis dans le système cardiovasculaire, dans les sites hématogène extra- et intra-embryonnaires (Feroni et al., 1992; Manaia et al., 2000; Minko et al., 2003; Silver and Palis, 1997), et également dans le système nerveux (Feroni et al., 1992; Herberth et al., 2005; Hinks et al., 1997). Par contre, contrairement à SCL/Tal-1, lmo2 est également exprimé de façon transitoire, par des dérivés somitiques et par l'endoderme intra-embryonnaire (et non par celui du SV) au moment de la détermination des précurseurs à partir de la Sp (Manaia et al., 2000).

Le phénotype observé lors de l'inactivation du gène *lmo2* est similaire à celui observé chez les souris *scf*^{-/-}. Les embryons *lmo2*^{-/-} meurent *in utero* du fait d'une absence de différenciation érythroïdes au niveau du SV (Warren et al., 1994). L'analyse de l'implication de lmo2 dans l'hématopoïèse définitive par l'utilisation de cellules ES *lmo2*^{-/-} a démontré qu'aucune cellule *lmo2*^{-/-} ne participait à l'hématopoïèse définitive (Yamada et al., 1998).

La similitude des défauts hématopoïétiques entraînés par l'inactivation, soit de SCL/Tal-1 soit de lmo2, a permis d'émettre l'hypothèse d'une action en synergie de ces deux facteurs dans la spécification hématopoïétique du mésoderme. L'analyse de l'expression de ces deux facteurs dans la lignée érythroïde (Warren et al., 1994), ainsi que leur co-immunoprécipitation dans ces lignées a permis de postuler

l'existence d'un complexe multiprotéique incluant SCL/Tal-1, lmo2 et d'autres facteurs, comme E47 et Ldb1, GATA-1 (Wadman et al., 1994; Wadman et al., 1997).

L'ensemble des données concernant SCL/Tal-1 et lmo2 indique que leur association est indispensable à la génération des précurseurs qui établiront l'hématopoïèse primitive et définitive, suggérant que les mécanismes responsables de la détermination du mésoderme vers la voie hématopoïétique sont initialement identiques dans les sites hématogènes extra- et intra-embryonnaires.

Rôle du facteur GATA-2 dans l'hématopoïèse de l'embryon de souris : Au cours du développement, GATA-2 est exprimé au niveau du sac vitellin, à la fois par les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques (Silver and Palis, 1997) dans la P-Sp/AGM (Kobayashi-Osaki et al., 2005; Minegishi et al., 1999) dans les cellules endothéliales, mais aussi au niveau des « clusters » intra-aortiques et des plages sous-aortiques ((Bertrand et al., 2005b), Résultats, Partie III, Article 1). En dehors des systèmes cardiovasculaire et hématopoïétique, GATA-2 est exprimé par le système nerveux en développement (Nardelli et al., 1999) et dans le compartiment uro-génital (Siggers et al., 2002). Ce patron d'expression est retrouvé chez le Xénope (Kelley et al., 1994; Turpen et al., 1997; Zon et al., 1991b), le poisson-zèbre (Heicklen-Klein et al., 2005) et le poulet (Minko et al., 2003) et chez l'embryon humain (Labastie et al., 1998)

Les souris GATA-2^{-/-} meurent *in utero* d'anémie sévère résultant d'une réduction importante de l'hématopoïèse primitive et de la quasi-suppression de l'hématopoïèse définitive (Tsai et al., 1994). La létalité précoce et la sévérité de ce phénotype indiquent que GATA-2 doit exercer son rôle sur un précurseur très immature. Néanmoins, contrairement à SCL/Tal-1 ou lmo2, les cellules ES GATA-2^{-/-} montrent une capacité de différenciation, quoique réduite, en culture (Tsai et al., 1994). Ces cellules peuvent se différencier dans les lignages érythroïde et myéloïde (macrophages), mais les colonies formées sont de taille très réduite et présentent un fort taux de cellules apoptotiques (Tsai and Orkin, 1997). L'ensemble de ces données suggèrent que l'action de SCL/Tal-1 et lmo2 précède celle de GATA-2 dans la hiérarchie d'apparition des PH et que GATA-2 serait plutôt impliqué dans les étapes de prolifération et d'amplification des précurseurs hématopoïétiques multipotents.

Les expériences de surexpression dans les CSH de l'adulte induisent une inhibition de leur différenciation. GATA-2 semble être très lié à l'amplification des précurseurs immatures. De faibles taux de GATA-2 semblent nécessaires au démarrage de la différenciation hématopoïétique (Minegishi et al., 2003). De plus, l'analyse d'embryons hétérozygotes GATA-2^{+/-} indique qu'une réduction du niveau de GATA-2 entraîne une diminution de la prolifération et de l'expansion des CSH de l'AGM (Rodrigues et al., 2005). Par ailleurs, le potentiel de reconstitution des CSH de tous ces sites est altéré, suggérant un rôle de GATA-2 dans la production et l'expansion des CSH dans l'AGM, plus que dans la détermination du mésoderme vers la voie hématopoïétique (Ling et al., 2004).

Des expériences de gain et perte de fonction de BMP-4 au niveau du territoire présomptif des îlots sanguins, chez le Xénope, ont montré que GATA-2 était activé par BMP-4 (Maeno et al., 1996).

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la progression du mésoderme vers la voie hématopoïétique dépend d'une détermination liée à l'expression de BMP-4. Celle-ci est suivie de la génération des précurseurs, dépendante à la fois de SCL/Tal-1 et de *lmo2*, alors que l'établissement du contingent de précurseurs hématopoïétiques apparaît régulé par GATA-2. Les résultats des expériences d'inactivation chez la souris, indique que cette séquence est identique pour les précurseurs des deux sites hématogènes, suggérant que dans les premières étapes du développement, le type de précurseurs initialement produit pourrait être identique.

b) Précurseurs hématopoïétiques du SV et de l'AGM, quelles différences?

Dans le paragraphe précédent, nous nous sommes interrogés sur l'existence éventuelle d'un évènement unique de détermination qui serait à l'origine de l'apparition des précurseurs hématopoïétiques. Nous avons pour cela décrit un certain nombre de gènes qui sont directement impliqués dans la spécification du mésoderme hématopoïétique à la fois dans le SV et l'AGM. Néanmoins, les potentialités de différenciation et de reconstitution (activité RLT) des deux types de PH générés dans les deux sites hématogènes diffèrent. L'objectif de ce paragraphe est de montrer que même si les évènements à l'origine de l'émergence du potentiel hématopoïétique semblent conservés dans les deux sites hématogènes chez différentes espèces, il existe des gènes dont l'inactivation génique conduit uniquement à un défaut d'hématopoïèse définitive. Ce constat, associé au fait que, dans la plupart des cas, ces défauts sont très semblables dans l'embryon et chez l'adulte conduit irrésistiblement à l'idée selon laquelle l'expression de ces gènes serait la signature de la présence de CSH.

Les gènes Notch codent pour des récepteurs transmembranaires dont la liaison avec l'un des ligands (Jagged, Delta1, Delta4) aboutit au clivage de la partie intracellulaire de NOTCH et à l'activation de gènes cibles codant pour des protéines de la famille bHLH ou les gènes de la famille HES-related represser protein (HERP) (Davis and Turner, 2001; Iso et al., 2003). **Notch-1** est uniquement indispensable à l'émergence des CSH dans l'embryon (Kumano et al., 2003). Ceci est confirmé par le fait que dans les souris chimériques, les cellules ES *Notch1*^{-/-} participent à la génération des PH du SV (Hadland et al., 2004).

Runx1/AML-1 (*Cbfa2*) a été mis en évidence dans certaines translocations observées dans des leucémies et les myélodysplasies. C'est un gène de la famille CBF (core binding factor) qui fait partie des sous-unités CBF α . Les souris invalidées pour AML-1 (*Cbfa2*) meurent *in utero* entre 11,5 et 12,5 jdg par absence d'érythropoïèse et de myélopoïèse définitive (Wang et al., 1996), alors que, comme pour Notch-1, l'hématopoïèse primitive est normale (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996) De plus, les cellules ES AML-1^{-/-} gardent leur capacité à se différencier en cellules érythroïdes primitives et ne participent pas à l'hématopoïèse définitive, ni *in vitro*, ni *in vivo* (absence d'activité RLT) (Okuda et al., 1996).

Finalement, les souris invalidées pour *c-myb* ont un développement normal jusqu'à 13 jdg, indiquant que c-Myb n'est pas nécessaire à l'hématopoïèse primitive (Mucenski et al., 1991).

Il est difficile de faire le distinguo entre des gènes qui sont indispensables à la fonction des cellules souches et les gènes dont l'expression au sein du mésoderme permet l'émergence d'une activité hématopoïétique. Comme pour les phénomènes d'autorenouvellement, l'engagement vers un lignage hématopoïétique dépend en grande partie de facteurs de transcription, qui contrôlent l'activation ou l'extinction de gènes spécifique de lignage. Au niveau des CSH, différentes études ont décrit l'expression à un niveau basal de tous les gènes nécessaires à l'engagement vers les différents lignages (Hu et al., 1997), démontrant que la CSH se tient en quelque sorte prête sur les starting-block. C'est alors du fait d'un déséquilibre « stochastique » ou médié par un signal de l'environnement ou au cours d'une division asymétrique, que la CSH s'engage vers une voie de différenciation donnée.

Il est admis que les cellules de l'hématopoïèse primitive sont vouées à disparaître pour laisser place aux cellules issues de l'hématopoïèse définitive. Les lignages primitifs regroupent des cellules différenciées, possédant des caractéristiques qui semblent différentes de leurs homologues définitifs et les processus moléculaires à l'origine des deux types de lignages (primitif et définitif) apparaissent eux aussi en partie indépendants.

Cinquième Partie

Objectifs généraux de la thèse

Dans l'embryon de souris, deux types de précurseurs hématopoïétiques (PH) sont produits successivement et présentent des potentialités de maintenance et de différenciation différentes. La première vague apparaît dans les îlots sanguins du sac vitellin entre 7-7,5 jours de gestation (jdg) et produit uniquement des cellules érythromyéloïdes à court terme. La seconde est d'origine intra-embryonnaire et produit les futures cellules souches hématopoïétiques (CSH) de l'adulte. Le pic de production des CSH dans l'embryon a lieu dans l'AGM (Aorte, Gonade et Mésonephros) à 10.5 jdg. Elles sont retrouvées dans de petites grappes de cellules intravasculaires au niveau de la paroi latéro-ventrale de l'aorte (clusters intra-aortiques). Parallèlement et durant toute la phase de production des CSH, on peut observer dans le mésenchyme sous jacent à l'aorte des structures localisées sous les clusters, appelées plages sous-aortiques (SAP pour « sub-aortic patches »). Ces régions particulières du mésenchyme expriment des facteurs impliqués dans l'hématopoïèse et correspondent au site présumé d'émergence des précurseurs des CSH.

La possibilité d'isoler indépendamment ces deux types de PH qui ont des potentialités différentes constitue un véritable avantage expérimental pour l'étude des propriétés des cellules souches. L'analyse de l'expression génique et protéique aux sites de générations de ces PH démontre que certains facteurs de transcriptions impliqués dans l'hématopoïèse (GATA-3, *Imo2*) présentaient une expression différentielle entre les sites hématogènes extra- et intra-embryonnaires (Manaiia et al., 2000) (et Résultats, Partie I, Article 1). Ainsi, les différences de potentiels des précurseurs des deux sites pourraient être contrôlées par certains des facteurs exprimés de façon asymétrique au moment de leur génération.

L'objectif général de cette thèse est d'effectuer l'analyse fonctionnelle de ces facteurs potentiellement impliqués dans l'émergence des PH de l'embryon de souris. Pour cela, nous voulons perturber leur expression au niveau des PH du SV et du site intra-embryonnaire, dans des stades précédant le mélange des deux types de PH, c'est-à-dire avant l'établissement des connexions vasculaires entre les deux compartiments (8-8,5 jdg), en effectuant soit une expression ectopique (dans le SV), soit une expression forcée (dans l'AGM).

Le préalable à cette étude consistait à transduire le plus efficacement possible les précurseurs mésodermiques pré-hématopoïétiques et hématopoïétiques dans les deux sites. Pour cela, nous avons comparé l'efficacité de deux méthodes. La première, utilisée spécifiquement en biologie du développement, repose sur l'électroporation à ondes carrées pour transduire les cellules dans leur environnement tri-dimensionnel. La seconde, l'infection rétrovirale, qui est une méthode classiquement utilisée pour moduler l'expression génique dans les CSH (Résultats, Partie II, Article 1).

Le facteur de transcription GATA-3, qui est différentiellement exprimé dans les compartiments extra- et intra-embryonnaires (Manaiia et al., 2000), est exprimé au niveau des « clusters intra-aortiques » et des SAP au moment de la génération des CSH. Nous avons montré (Résultats, Partie 3, Article 1) que ce facteur

de transcription était exprimé par les CSH purifiées à partir de l'AGM. L'expression de GATA-3 par les CSH semble maintenue chez l'adulte, puisque des expériences de « micro-array » ont montré que ce facteur est qualitativement plus exprimé dans les PH ayant une activité de renouvellement à long terme que dans celles qui reconstituent à court terme (Zhong et al., 2005). L'inactivation du gène codant pour GATA-3 est létale, suite notamment à des anomalies cérébrales, un syndrome d'anémie et des hémorragies abdominales (Pandolfi et al., 1995). Dans les chimères, les précurseurs GATA-3^{-/-} ne donnent pas de cellules de la lignée T, alors que leur contribution aux autres lignées est apparemment normale (Ting et al., 1996). GATA-3 apparaît donc principalement impliqué dans l'engagement dans la lignée T. Les facteurs de la famille GATA étant largement interchangeable (Blobel et al., 1995), nous pensons que GATA-2, qui est également exprimé dans les CSH intra-embryonnaires et les plages sous-aortiques (Résultats, Partie III, Article n°1) pourrait compenser l'effet de la perte de GATA-3 dans les CSH des embryons mutants.

Les facteurs GATA sont très conservés dans les différentes espèces et leurs homologues sont impliqués dans de nombreux processus. Par exemple, chez la drosophile, l'inactivation du gène *pannier* au niveau des disques imaginaux est responsable d'une surproduction de neurones périphériques et *gta-3* régule la différenciation de certains neurones chez le poisson zèbre.

Tous ces arguments tendent à démontrer que les facteurs GATA ne sont pas uniquement impliqués dans les étapes d'amplification et/ou de différenciation des cellules hématopoïétiques. Ils jouent un rôle crucial au cours du développement, à la fois dans la régulation de la différenciation et dans la détermination des lignages cellulaires. GATA-3 pourrait être un facteur important pour l'acquisition du "potentiel souche hématopoïétique" et la régulation de la différenciation des PH au niveau des sites hématogènes de l'embryon.

Pour effectuer l'analyse fonctionnelle de facteur au cours de l'ontogenèse du système hématopoïétique, nous avons construit un ensemble de vecteurs permettant d'évaluer les modifications induites par l'expression ectopique de GATA-3 dans le SV. Compte tenu de la capacité des facteurs GATA à « échanger » partiellement leurs fonctions, la spécificité des effets observés suite à l'expression ectopique de GATA-3 a été comparée aux effets liés à la surexpression de GATA-1, qui est naturellement exprimé par les cellules du SV, ou aux effets de l'expression forcée de GATA-5, qui n'est pas exprimé au niveau du SV et de l'AGM.

Des modifications qualitatives ou quantitatives des propriétés de différenciation des CSH sont analysées, soit en cytométrie de flux par immunomarquage des antigènes spécifiques des lignées macrophagique (Mac-1 et CD45), érythroïdes (Ter119) et lymphoïdes (CD19 et B220), soit par évaluation du potentiel clonogénique par des cultures en méthyl-cellulose. Le test des potentialités de différenciation repose sur des cultures sur la lignée stromale OP9 en présence des cytokines qui permettent la différenciation vers les lignées érythromyéloïdes et lymphoïdes B, alors que le potentiel lymphoïde T est mis en évidence par reconstitution de thymus fœtaux (FTOC).

Une éventuelle amplification ou réduction du nombre de précurseurs peut être mise en évidence par le calcul du nombre de précurseurs par organe, obtenu par des cultures en dilution limites sur stroma OP9.

Enfin, les capacités de maintenance des cellules transduites sont analysées *in vivo* par des expériences de CFU-S et par l'analyse de la reconstitution à long terme après injection des cellules transduites dans des souris receveuses Rag2^{-/-} γc^{-/-} irradiées.

La partie résultats de ce manuscrit s'articule en trois parties. La première est consacrée à l'analyse du patron d'expression du facteur Lyl-1 au cours de l'ontogenèse de la souris. Ce facteur qui présente de forte homologie avec le facteur SCL/Tal-1, s'est avéré être un très bon marqueur des cellules souches de l'AGM.

La seconde partie permet d'appréhender l'aspect technologique de ce travail qui a consisté pour une large partie à mettre au point une technique de transduction des PH de l'embryon de souris. C'est après avoir validé les protocoles de transduction des précurseurs hématopoïétiques du sac vitellin que nous avons débuté l'analyse fonctionnelle de GATA-3. L'essentiel des résultats a été obtenu pour le SV, mais des résultats préliminaires, obtenus par surexpression de GATA-3 dans l'AGM, confirment déjà les conclusions obtenues dans le cadre de la surexpression de GATA-3 dans les PH du SV.

La troisième et dernière partie est consacrée aux différents travaux effectués en collaboration au cours de cette thèse. Le premier article auquel j'ai participé entre dans le cadre de la collaboration entre notre équipe et celle d'Ana Cumano à l'institut Pasteur. L'objectif était de localiser les CSH dans la région AGM en corrélant leur phénotype et de leur potentialité de différenciation *in vivo* et *in vitro*, avec des analyses pratiquées *in situ*. Le second article consiste en une revue méthodologique des modalités utilisées dans notre équipe pour effectuer l'analyse du développement hématopoïétique. Le troisième article est un peu en marge de l'ontogenèse du système hématopoïétique, mais fait partie intégrante de l'histoire de ma thèse. J'ai participé à ce travail avec Sabrina Badaoui, une autre étudiante en thèse de cette unité. Pour la petite histoire, ce travail lui a permis de se lancer sur un nouveau sujet passionnant, l'implication du système rénine-angiotensine dans l'hématopoïèse.

Résultats

Résultats 1^{ère} partie

Article n°1

Facteurs potentiellement impliqués dans l'émergence des précurseurs hématopoïétiques de l'embryon de souris

lyl-1 and SCL/Tal-1, two genes encoding closely related bHLH transcription factors, display highly overlapping expression patterns during cardiovascular and hematopoïetic ontogeny

Sébastien Giroux, Anna-Lila Kaushik*, Claude Capron*, Charikleia Kelaidi, Fred Sablitsky, Dominique Duménil, Olivier Albagli, Isabelle Godin

I / Comparaison des patrons d'expression de Lyl-1 et SCL/Tal-1

Introduction : Dans l'embryon de vertébré, l'émergence des CSH a lieu non pas au niveau du Sac Vitellin, premier site hématogène au cours de l'ontogenèse, mais plus tard dans le compartiment intra-embryonnaire. Les PH du Sac Vitellin (SV), injectés dans des animaux létalement irradiés ont des capacités d'autorenouvellement limitées. Ils n'assurent qu'une reconstitution de type érythromyéloïde et à court terme. Les précurseurs de la seconde vague d'hématopoïèse apparaissent dans la région Sp-PA/AGM entre 8,5 et 11 jdg. A la différence des précurseurs du SV, ils sont capables d'assurer *in vitro* et *in vivo* une reconstitution hématopoïétique à long terme de tous les lignages, caractéristique de la fonction des CSH.

L'analyse de l'expression génique et protéique aux sites de générations de ces PH démontre que certains facteurs de transcriptions impliqués dans l'hématopoïèse présentent une expression différentielle entre les sites hématogènes extra- et intra-embryonnaires. Ainsi, les différences de potentiels des précurseurs des deux sites pourraient être contrôlées par certains des facteurs exprimés au moment de leur génération.

L'objectif général de ma thèse était d'effectuer l'analyse fonctionnelle de facteurs présentant une expression différentielle entre les deux sites hématogènes. Ceci dans le but de perturber leur expression au niveau des PH du SV et du site intra-embryonnaire, dans des stades précédant le mélange des deux types de PH (Résultast, 2^{ème} partie), avant l'établissement des connexions vasculaires entre les deux compartiments (8-8,5 jdg).

Lyl-1 est un gène dont le rôle potentiel au cours du développement hématopoïétique a été suspecté en raison de son fort taux d'homologie avec SCL/Tal-1. SCL/Tal-1 est essentiel au développement du système hématopoïétique. Son invalidation génique entraîne une létalité embryonnaire à 8,5 jdg par l'absence totale d'hématopoïèse primitive dans le SV. Le rôle crucial de SCL dans l'hématopoïèse a été confirmé par le fait que les cellules ES *scf^{-/-}* ne participent pas à la génération des cellules hématopoïétiques définitives dans les souris chimères (Porcher et al., 1996; Robb et al., 1996). SCL est indispensable pour la génération des cellules hématopoïétiques primitives et définitives.

Lyl-1 et SCL/Tal-1 sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des bHLH (basic helix-loop-helix). SCL/Tal-1 exerce son action au sein d'un complexe transcriptionnel qui comprend également lmo2, Ldb-1, E2a (un autre facteur bHLH) et un facteur GATA. L'interaction de Lyl-1 avec des éléments du complexe Ldb-1 et E2A laisse supposer qu'il pourrait agir de façon similaire à SCL/Tal-1 (Wadman et al., 1994).

Nous disposons au laboratoire de souris C57/B6 transgéniques Lyl-1/LacZ « knock-in », qui portent le gène de la β -galactosidase d'*E coli* (LacZ) à la place de la partie codant pour la première hélice du domaine HLH, dans l'exon 4 de Lyl-1. L'expression de la forme tronquée de Lyl-1 fusionnée au gène LacZ reste sous le contrôle du promoteur de Lyl-1. L'analyse des effets de la délétion de Lyl-1 par Capron et collaborateurs a montré une diminution de la fréquence des CSH dans la moelle osseuse et le foie fœtal, ainsi qu'une

diminution du nombre de cellules B due à un arrêt partiel de la différenciation au stade préB (Capron et al., 2006). Ici, l'objectif est d'analyser le patron d'expression de ce facteur au cours de l'hématopoïèse primitive et définitive. Le patron obtenu est alors systématiquement comparé avec celui de SCL/Tal-1.

Résultats : Le patron d'expression de Lyl-1 a été caractérisé par révélation de l'activité de la β -galactosidase chez les hétérozygotes Lyl-1^{LacZ/+} ou Lyl-1^{LacZ/LacZ} et par hybridation *in situ* sur ces mêmes types d'embryons ou chez des embryons sauvages. Cette étude a montré que l'expression de Lyl-1 est restreinte aux cellules hématopoïétiques, endothéliales et à l'endocarde (alors que SCL/Tal-1 est également présent au niveau du système nerveux en développement). Contrairement à SCL/Tal-1, dont l'expression est constante durant toutes les étapes initiales du développement hématopoïétique (mésoderme, îlots sanguins du SV, précurseurs hématopoïétiques du SV et du compartiment intra-embryonnaire), l'expression de Lyl-1 est restreinte aux cellules hématopoïétiques (cellules souches CD31⁺CD41⁺CD45⁻) et endothéliales du compartiment intra-embryonnaire. Dans la mesure où Lyl-1 constitue un bon marqueur de cellule souche hématopoïétique, la suite de ce travail, qui comporte l'analyse *in vitro* et *in vivo* de l'effet de l'inactivation du gène sur le développement hématopoïétique a été poursuivi par Anna-Lila Kaushik (qui a aussi participé à l'établissement de ce patron d'expression), dans le cadre d'une thèse dirigée par Isabelle Godin.



ELSEVIER

Gene Expression Patterns 7 (2007) 215–226

GEP

www.elsevier.com/locate/modgep

lyl-1 and *tal-1/scl*, two genes encoding closely related bHLH transcription factors, display highly overlapping expression patterns during cardiovascular and hematopoietic ontogeny

Sébastien Giroux^{a,b,c,1}, Anna-Lila Kaushik^{a,b,c,1}, Claude Capron^{a,b,c,d}, Ali Jalil^{b,c,e}, Charikleia Kelaidi^{a,b,c}, Fred Sablitzky^f, Dominique Dumenil^g, Olivier Albagli^{a,b,c}, Isabelle Godin^{a,b,c,*}

^aINSERM U790, Institut Gustave Roussy-PR1, 39 Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

^bInstitut Gustave Roussy, 39 Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

^cUniversité de Paris XI, Orsay, France

^dLaboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine de Versailles-Paris Ouest, Garches, France

^eService Commun de Microscopie Confocale, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

^fThe University of Nottingham, School of Biology, Institute of Genetics, Queen's Medical Centre, Nottingham NG7 2UH, United Kingdom

^gInstitut Cochin, Département d'Hématologie, Bâtiment Gustave Roussy, 27 rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France

Received 17 July 2006; received in revised form 29 September 2006; accepted 6 October 2006

Available online 11 October 2006

Abstract

The *TAL-1/SCL* and *LYL-1* genes encode two closely related basic helix–loop–helix transcription factors involved in child T-acute lymphoblastic leukemia through chromosomal rearrangements and transcriptional deregulation. During ontogeny, Tal-1/SCL is required for hematopoietic cell generation, both in the yolk sac, where erythro-myeloid cells are first produced, then in the intra-embryonic compartment, where hematopoietic stem cells independently arise. We describe here the expression pattern of *lyl-1* in mouse embryos from 7 to 14 days post coitus using *in situ* hybridization, as well as β -Galactosidase (β -Gal) expression in *lyl-1-lacZ* knock-in embryos, which express a C-terminally truncated Lyl-1 protein fused to the β -Galactosidase (Lyl-1 Δ / β -Gal). In addition, we compare *lyl-1* expression pattern with that of *tal-1/scl*. Similar to Tal-1/SCL, Lyl-1 mRNA expression occurs in the developing cardiovascular and hematopoietic systems. However, contrary to *tal-1/scl*, *lyl-1* is not expressed in the developing nervous system. In *lyl-1-lacZ* knock-in heterozygous and homozygous embryos, β -Gal expression completely correlates with Lyl-1 mRNA expression in the intra-embryonic compartment and is present: (1) in the developing hematopoietic system, precisely where hematopoietic stem cells emerge, and thereafter in the fetal liver; (2) in the developing vascular system; and (3) in the endocardium. In contrast, whereas Lyl-1 mRNA is expressed in yolk sac-derived endothelial and hematopoietic cells, Lyl-1 Δ / β -Gal is either absent or poorly expressed in these cell types, thus differing from Tal-1/SCL, which is highly expressed there at both mRNA and protein levels.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: AGM; Aorta; Aortic clusters; bHLH; Cardiovascular; Endocardium; Endothelial cells; Fetal liver; Heart; Hematopoiesis; Hematopoietic stem cell; Lyl-1; Macrophages; Mouse embryo; Sub-aortic patches; Tal-1/SCL; Transcription factor; Yolk sac

Abbreviations: AGM, aorta–gonads–mesonephros; dpc, days post-coitum; β -Gal, β -galactosidase; bHLH, basic helix–loop–helix; FL, fetal Liver; HIAC, hematopoietic intra-aortic clusters; HSC, hematopoietic stem cells; LTR, long-term reconstitution (activity); P-Sp, para-aortic splanchnopleura; S, pairs of somites; SAP, sub-aortic patches; YS, yolk sac.

* Corresponding author. Tel.: +33 142 11 41 43; Fax: +33 142 11 52 40.

E-mail address: igodin@igr.fr (I. Godin).

¹ These authors equally contributed to this work.

1567-133X/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.modgep.2006.10.004

1. Results and discussion

The basic helix–loop–helix (bHLH) transcription factor Lyl-1 was first identified due to its translocation in T-cell leukemia (Mellentin et al., 1989). Lyl-1 bHLH domain is highly homologous to that of Tal-1/SCL, another transcription factor involved in the development of T-cell leukemia (Visvader et al., 1991). *tal-1/scl* is one of the major genes involved in the generation of hematopoietic precursors in the embryo since its deletion leads to a complete absence of hematopoiesis (Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995; Porcher et al., 1996; Robb et al., 1996). Contrary to *tal-1/scl* which expression pattern has been extensively analyzed (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1998, 1999), *lyl-1* embryonic expression has been so far only described in the vascular system of 9.5 days post-coitus (dpc) mouse embryos (Chapman et al., 2003). In the present study, we thoroughly examined *lyl-1* expression pattern in 7–14 dpc mouse embryos using both *in situ* hybridization, in comparison with *tal-1/scl*, and β -Galactosidase expression in *lyl-1^{+/LacZ}* and *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos (see below), with particular emphasis given to the development of hematopoiesis.

Hematopoiesis in vertebrate embryos results from the contribution of two distinct, independently generated, precursor pools (for review, see Godin and Cumano, 2002). In the mouse, the first wave of hematopoietic precursor production takes place in the yolk sac (YS)-blood islands from 7.5 dpc (Palis et al., 1999; Bertrand et al., 2005a). YS-derived precursors do not display the multipotentiality and capacity to sustain in the long-term the hematopoiesis of irradiated recipients (LTR activity), which typify hematopoietic stem cells (HSC) (Cumano et al., 1996, 2001). HSC develop from a second generation event, which takes place in the intra-embryonic compartment from 8.5 dpc, in a site named first para-aortic splanchnopleura (P-Sp: 8.5–9 dpc), then AGM from 10 to 11.5 dpc, as the aorta, gonads and mesonephros have developed from the P-Sp (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Godin et al., 1999). HSC generation can be ascribed to the aorta and underlying mesenchyme (Godin et al., 1999; de Bruijn et al., 2000; Bertrand et al., 2005b). Cytological analyses of the AGM, performed at the time when HSC production peaks at 10.5–11.5 dpc, uncovered the presence of these cells in two distinct locations (for review, see Godin and Cumano, 2002: (1) within cells clusters located in the ventrolateral part of the aorta. These hematopoietic intra-aortic

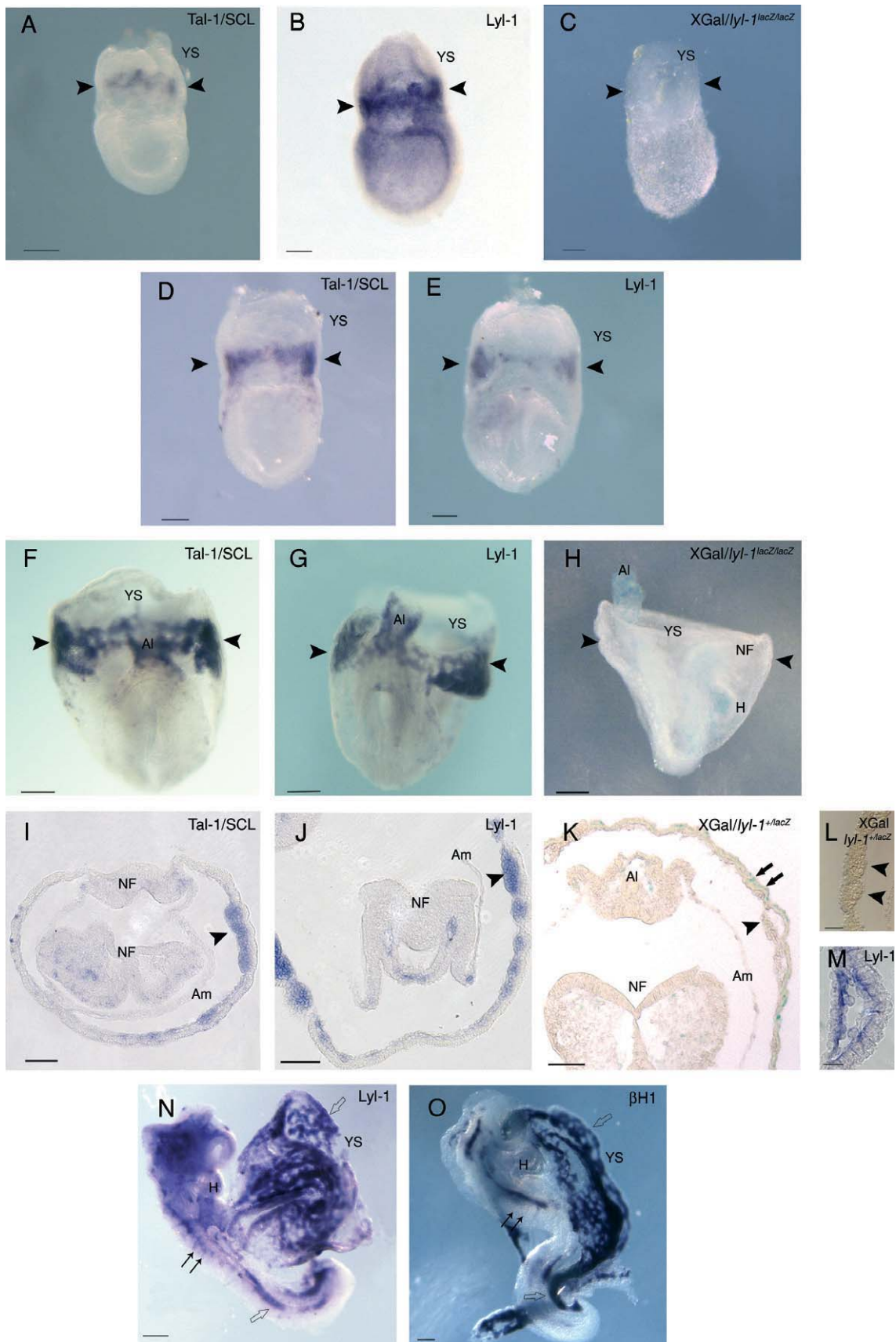
clusters (HIAC) have been described in all investigated vertebrate species; (2) within cellular patches localized in the mesenchyme below the aortic clusters, which express, amongst other markers, the AA4.1 antigen and the transcription factors GATA-2 and GATA-3 (Manaiia et al., 2000; Bertrand et al., 2005b). These sub-aortic patches (SAP) have, up to now, only be characterized in mouse (Manaiia et al., 2000) and human (Marshall et al., 1999) embryos.

As stated before, *tal-1/scl* invalidation disrupts the generation of both extra- and intra-embryonic hematopoietic precursors: erythro-myeloid precursors in the early YS are not produced (Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995) and HSC generation is also impaired, since *tal-1/scl^{-/-}* ES cells do not contribute to definitive hematopoiesis of chimaeric embryos (Porcher et al., 1996; Robb et al., 1996). Tal-1/SCL is expressed by embryonic hematopoietic precursors in the yolk sac (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1998) and also in the aortic region where HSC are generated, namely in the HIAC (Elefanty et al., 1999). In addition to the hematopoietic system, embryonic expression of Tal-1/SCL includes the endothelial (Kallianpur et al., 1994) and central nervous system (Elefanty et al., 1999; van Eekelen et al., 2003).

We used mice in which the *lyl-1* gene has been modified through homologous recombination (Capron et al., 2006). In these mice, part of *lyl-1* coding region was replaced by the *lacZ* reporter gene. The *lacZ* insertion occurs within the sequence encoding the first helix of Lyl-1 HLH domain, in exon four. Consequently, this *lyl-1^{lacZ}* allele encodes a C-terminally truncated Lyl-1 protein fused to β -Gal (Capron et al., 2006), thereafter referred to as Lyl-1 Δ / β -Gal. As *lyl-1^{lacZ}* keeps all the 5' cis-regulatory region of *lyl-1*, the detection of β -Gal expression and/or activity in any cells is likely to reveal the transcriptional activation of the *lyl-1* locus in wild-type mice. Unfortunately, the *bona fide* Lyl-1 protein expression pattern could not be assessed due to the absence of an anti-Lyl-1 antibody suitable for immunolabeling of embryo sections.

Null homozygous *lyl-1^{LacZ/LacZ}* mice are viable and display a reduced number of B cells resulting from a partial block after the pro-B stage. Moreover, both *lyl-1^{LacZ/LacZ}* fetal liver and bone marrow HSC, which exhibit high β -Gal activity levels, display a severely impaired long-term reconstitution capacity (Capron et al., 2006). No morphological alteration of development was observed in *lyl-1^{+/LacZ}* and *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos, compared to wild type.

Fig. 1. *lyl-1* and *tal-1/scl* expression in the extra-embryonic compartment. Abbreviations: Al, allantois; Am, amnios; H, heart; NF, neural folds; YS, yolk sac; (A–C) 7–7.5 dpc: Tal-1/SCL (A) and Lyl-1 (B) mRNA are present in YS mesoderm (arrowheads). (C) No β -Gal activity is detected in the mesoderm (arrowheads) of *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos. (D,E) 7.5 dpc: Tal-1/SCL (D) and Lyl-1 (E) mRNA are detected in YS-blood islands (arrowheads). (F–H) 8 dpc: YS-blood islands (arrowheads) express both Tal-1/SCL (F) and Lyl-1 (G) mRNA. In *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos (H), β -Gal activity is absent in YS-blood islands (arrowheads), but can be detected in nascent vessels in the cephalic region. Tal-1/SCL (F) and Lyl-1 (G) mRNA and β -Gal activity (H) are detected in the allantois. (I–M) Sections of wholemount 8 dpc embryos. Tal-1/SCL (I) and Lyl-1 (J) mRNA is expressed in YS-blood islands (arrowheads). In *lyl-1^{+/LacZ}* embryos (K), endodermal cells display a non specific β -Gal activity (arrows), whereas a specific staining is present in endothelial cells from the neural folds and allantois. Neither peripheral endothelial cells nor inner hematopoietic cells of the YS-blood islands display X-Gal staining (L) whereas Lyl-1 mRNA is detected (M). (N,O) 8.5 dpc (10S): Lyl-1 mRNA (N) is expressed by intra-embryonic endothelial cells (arrows). In circulating cells, the expression is similar to that of β H1 globin mRNA (O), expressed in YS-derived erythrocytes (open arrows). Scale bars: (A–L) 100 μ m; (M) 20 μ m; and (N,O) 200 μ m.



1.1. Compared *lyl-1* and *tal-1/scl* expression in the extra-embryonic compartment

tal-1/scl expression in the extra-embryonic mesoderm first appears at 7 dpc, both at the mRNA (Silver and Palis, 1997, and Fig. 1A) and protein (Kallianpur et al., 1994) levels, as well as β -Gal activity in the *tal-1/scl*^{LacZ} reporter mouse line (Elefanty et al., 1998). At this stage, Lyl-1 mRNA (Fig. 1B) expression is similar to that of Tal-1/SCL, whereas no β -Gal activity is detected in *lyl-1*^{+LacZ} and *lyl-1*^{LacZ/LacZ} embryos (Fig. 1C). From 7.5 dpc, when YS-blood islands become morphologically identifiable, expression of both Tal-1/SCL (Silver and Palis, 1997 and Fig. 1D) and Lyl-1 mRNA (Fig. 1E) is maintained but β -Gal activity remains undetectable in *lyl-1*^{LacZ/LacZ} embryos (data not shown).

From 8 dpc, as differentiation towards the endothelial and hematopoietic lineages occurs (Palis et al., 1999; Bertrand et al., 2005a), Tal-1/SCL and Lyl-1 mRNA (Fig. 1F and G) are similarly expressed in YS-blood islands, which however, do not display overt β -Gal activity in either *lyl-1*^{+LacZ} or *lyl-1*^{LacZ/LacZ} embryos (Fig. 1H). Sections of wholemount embryos show that both the peripheral endothelial cells and the inner hematopoietic cells of the blood islands express Tal-1/SCL (Fig. 1I) and Lyl-1 mRNA (Fig. 1J and M) and confirm the absence of β -Gal activity (Fig. 1K and L). At this stage, only a non-specific staining is observed in the visceral endoderm of *lyl-1*^{+LacZ} (arrows in Fig. 1K and L) and wild-type embryos. The absence of β -Gal activity in the YS is maintained throughout the stages when Lyl-1 mRNA is expressed in this site.

In contrast, β -Gal activity and Lyl-1 mRNA (as well as Tal-1/SCL mRNA) are concomitantly expressed in endothelial cells from 8 dpc in the allantois (Fig. 1F–H), another extra-embryonic structure.

After the establishment of the vascular connection between extra- and intra-embryonic vessels, which occurs at 8 dpc, precisely at the 4–5 somite-stage (S) (McGrath et al., 2003), blood-island-derived hematopoietic cells expressing Lyl-1 mRNA (Fig. 1N), but lacking β -Gal activity (data not shown), are present in the intra-embryonic vascular network. These cells likely correspond to YS-derived erythrocytes (which constitute the bulk of YS hematopoietic cells), since their distribution correlates with that of embryonic β H1globin-expressing cells (Fig. 1O). During subsequent stages, Lyl-1 and Tal-1/SCL mRNA expression is maintained in YS endothelial and circulating hematopoietic (erythroid) cells up to 10.5 dpc.

1.2. Compared *lyl-1* and *tal-1/scl* expression in the intra-embryonic compartment

Whereas no β -Gal activity is observed in YS-blood island derivatives even though Lyl-1 mRNA is expressed, β -Gal activity correlates with Lyl-1 mRNA expression in the intra-embryonic compartment.

1.2.1. Expression in the intra-embryonic mesoderm

At early stages of intra-embryonic hematopoietic determination (7.5–8 dpc), no overt Lyl-1 transcription nor β -Gal activity are observed in the splanchnopleural mesoderm, where Tal-1/SCL mRNA (Silver and Palis, 1997) and protein (data not shown) are expressed, probably in newly formed angioblasts.

1.2.2. Expression in the developing cardiovascular system

β -Gal activity in *lyl-1*^{+LacZ} embryos (Fig. 2A), as well as Lyl-1 mRNA (data not shown) and Tal-1/SCL protein expression (Fig. 2B) is first observed in the intra-embryonic compartment at 7.75 dpc (LHF stage) in the precardiac plate. At later stages of cardiac development, Lyl-1 mRNA and β -Gal protein appear restricted to the endocardium (Fig. 2C and D), as is Tal-1/SCL protein (Fig. 2E). In parallel, the developing vascular system in the embryo proper expresses Lyl-1 and Tal-1/SCL mRNA from 8 dpc, starting with nascent vessels in the cephalic region (Fig. 1H–K) and cells lining the dorsal aorta and omphalomesenteric arteries caudally (data not shown). From 8.5 to 9 dpc, Lyl-1 mRNA and β -Gal activity (Fig. 2F–H) and Tal-1/SCL mRNA (data not shown) expression encompasses the whole cardiovascular system, both arterial and venous, such as the paired dorsal aortae and cardinal veins, the lateral vascular network and the capillary network of the limb buds and perineural region.

By 11 dpc, both endocardial and vascular endothelial expression begin to decline and from 12 dpc, Lyl-1 mRNA and β -Gal activity are observed only in the aorta and its main branches and, very weakly, in the endocardium (data not shown).

Interestingly, while YS endothelial cells display no β -Gal activity, despite a clear Lyl-1 mRNA expression (Fig. 1M), such a discrepancy does not occur in the intra-embryonic compartment, where both signals are detected. Consistently, endothelial X-Gal staining in *lyl-1*^{+LacZ} embryos abruptly stops at the sites where intra-embryonic (umbilical) vessels connect to the YS vascular network (Fig. 2I).

1.2.3. Expression in the developing hematopoietic system

Intra-embryonic hemogenic site. When HSC production in the AGM reaches its maximal level, at 10.5 dpc, β -Gal activity in *lyl-1*^{+LacZ} embryos is detected in the HIAC located in the ventro-lateral part of the dorsal aorta (Fig. 3A), where HSC are cytologically identifiable (Garcia-Porrero et al., 1995; Bertrand et al., 2005b). HSC are believed to emerge slightly earlier in the mesenchyme underlying the aortic floor, within sub-aortic patches (SAP), which have been characterized through the expression of GATA-3 and CD31 (Manaiia et al., 2000; Bertrand et al., 2005b), so that HSC only constitute a minor sub-population of the GATA-3 and CD31 positive SAP. At 10 dpc, a few isolated X-Gal⁺ cells are present in the SAP region (Fig. 3B), as evidenced by GATA-3 *in situ* hybridization on adjacent sections (Fig. 3C, which shows a representative example of 12 overlays in three analyzed embryos).

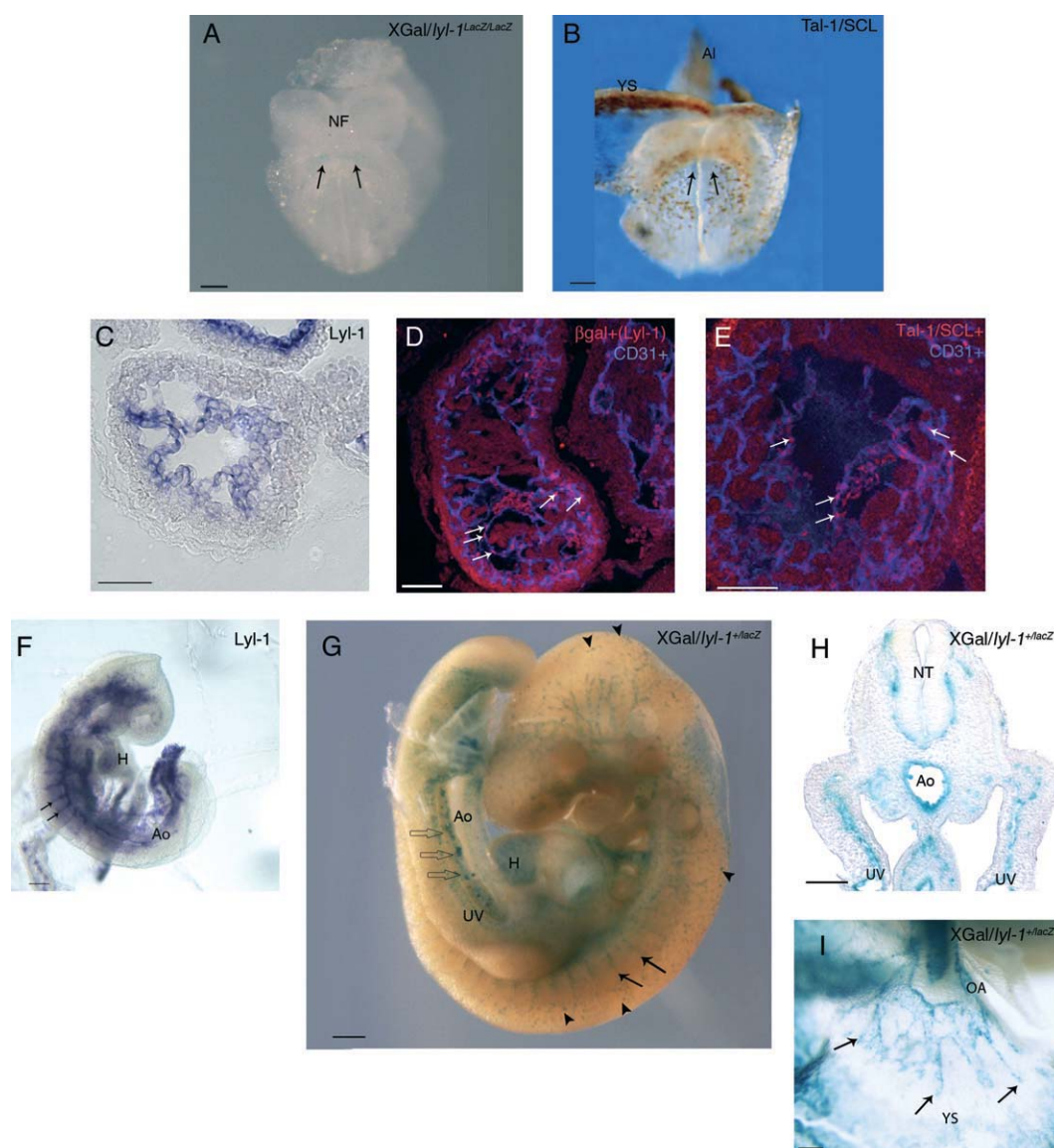
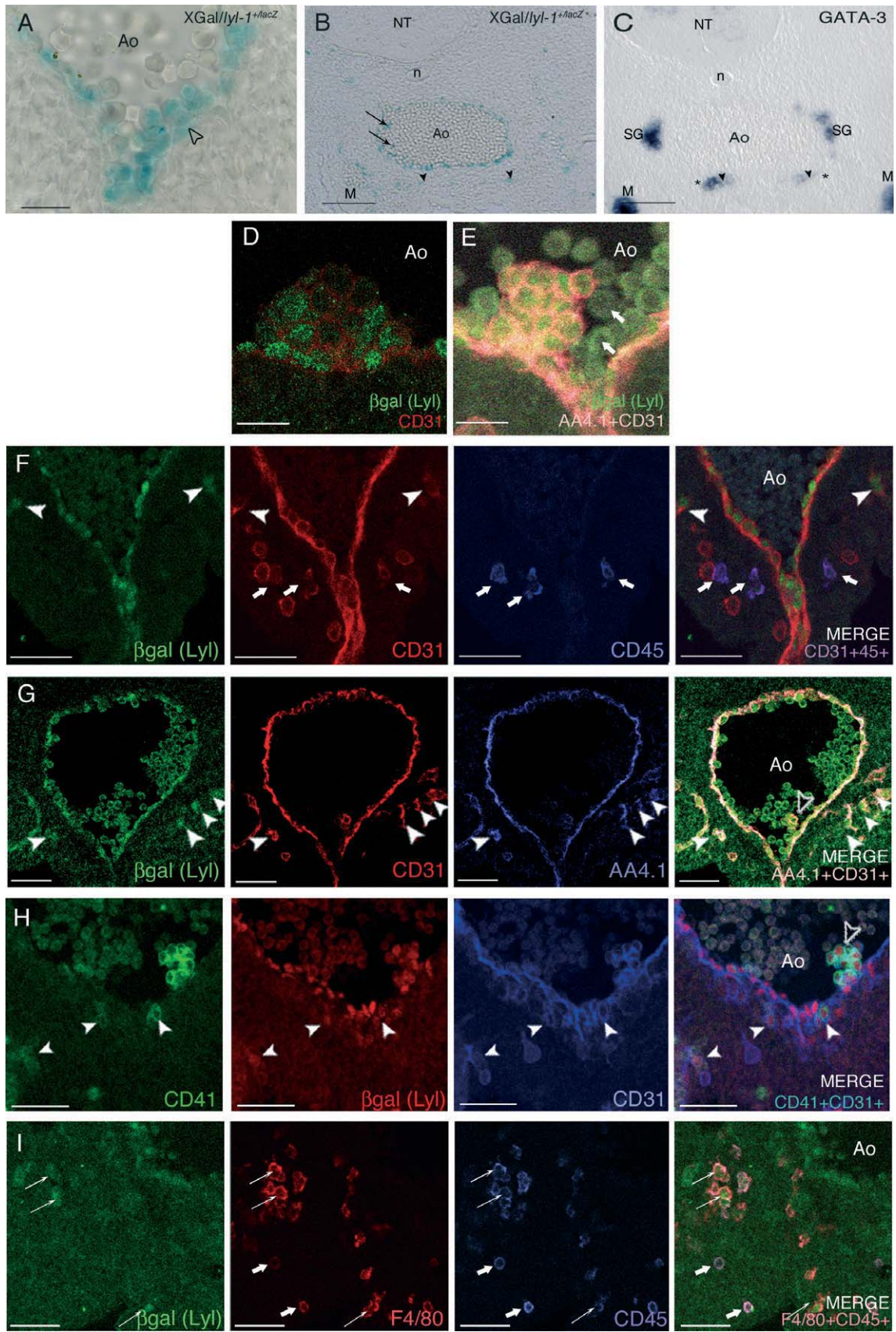


Fig. 2. *lyl-1* and *tal-1/scl* expression in the developing cardio-vascular system. *Abbreviations:* Ao, aorta; All, allantois; H, heart; NF, neural folds; NT, neural tube; UV, umbilical vein; YS, yolk sac. (A,B) At 7.5 dpc, β -Gal activity (A) and *Tal-1/SCL* mRNA (B) are detected in the precardiac plate (arrows). (C–E) At later stages, *Lyl-1* mRNA (C) expression appears restricted to the endocardium. Confocal colocalisations show that the nuclei (arrows) of CD31 (blue)-expressing endocardial cells express *Lyl-1* Δ / β -Gal (D) and *Tal-1/SCL* (E). (F,G) In 8.5 (F) and 9.5 dpc (G) wholemount embryos, *Lyl-1* mRNA (F) and β -Gal activity (G) are observed in arterial and venous vessels, such as dorsal aorta (Ao), intersomitic arteries (arrows), umbilical veins (UV). Isolated X-Gal⁺ cells are also scattered in the body wall and the roof of the neural tube (arrowheads). Compact X-Gal⁺ cells clusters are present in the aorta (large open arrows). (H) In section of 9.5 dpc (25S) *lyl-1*^{+/lacZ} embryos, β -Gal activity is detected in the whole vascular system, e.g., the dorsal aorta, perineural vessels and umbilical veins. No X-Gal⁺ cells are observed in the neural tube (NT). (I) In *lyl-1*^{+/lacZ} embryos, X-Gal staining is present in intra-embryonic umbilical vessels, but abruptly stops at the transition points (arrows) with the YS vascular network. Scale bars: 100 μ m, except (C) 20 μ m and (G) 200 μ m.

To precise the nature of X-Gal positive cells observed in the HIAC and SAP, multiple immuno-stainings were performed on sections of 10.5 dpc *lyl-1*^{+/lacZ} embryos. At this developmental stage, HSC are characterized by the expression of c-Kit, CD31, CD41, AA4.1, and by the lack of expression of the pan-leukocyte marker CD45. CD45⁺ cells correspond to YS-derived macrophages, that also express the F4/80 marker (Bertrand et al., 2005a). Nuclear β -Gal immuno-labeling is detected within the HIAC, in cells that also express the cell surface markers CD31 and AA4.1 (Fig. 3D and E). β -Gal positive cells only constitute a sub-population of the HIAC (Fig. 3D), consistent with previous

descriptions of the heterogeneous nature of the clusters (Manaiia et al., 2000; Bertrand et al., 2005b).

CD31⁺ β -Gal⁺ cells are present in the SAP (arrowheads in Fig. 3F–H). These cells, that lack CD45 expression (Fig. 3F), also express AA4.1 (Fig. 3G). AGM-HSC can be further discriminated from CD31⁺, AA4.1⁺, and CD45⁻ endothelial cells through the expression of low-CD41 levels. In 10 dpc AGM sections of *lyl-1*^{lacZ/lacZ} embryos, CD41^{low} CD31⁺ β -Gal⁺ cells are present in the SAP (arrowheads in Fig. 3H), as well as in the HIAC (open arrowhead in the merge panel of Fig. 3H). β -Gal positive cells that display the CD31⁺, CD41^{low}, AA4.1⁺,



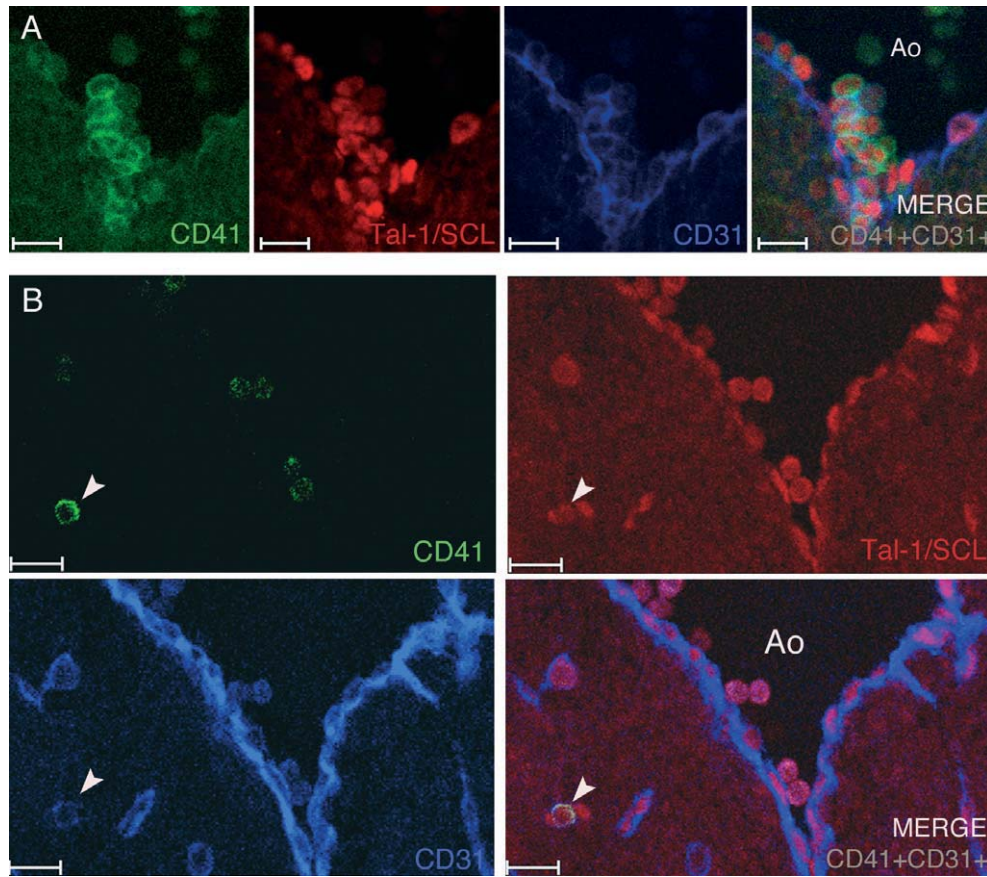


Fig. 4. *tal-1/scl* expression in the intra-embryonic hemogenic site. Abbreviation: Ao, aorta. (A) AGM sections of 10 dpc *lyl-1^{LacZ/LacZ}* (same embryo as in Fig. 3H). Within the HIAC, nuclei positive for Tal-1/SCL immuno-labelling (red) are detected in CD31/CD41 positive HSC. Aorta endothelial cells express Tal-1/SCL and CD31, but not CD41. (B) 10 dpc AGM section of wild-type embryo; CD31⁺CD41⁺ cells (arrowhead) that co-express Tal-1/SCL (red) are present in the SAP region. Scale bars: (A) 10 μ m; and (B) 20 μ m.

and CD45⁻ phenotype characterizing AGM-HSC, are thus present in the SAP.

In this study, Tal-1/SCL expression in the AGM is further characterized in the HIAC and documented for the first time in the SAP domain. In AGM section of wild-type embryos, Tal-1/SCL is expressed by CD31⁺CD41⁺ cells located in the HIAC (data not shown). In *lyl^{LacZ/LacZ}* embryos, Tal-1/SCL is also detected in the HIAC within the cells that co-express CD31 and CD41 (Fig. 4A), in a pattern

similar to that of β -Gal⁺ CD31⁺CD41⁺ cells analyzed in the same embryo (Fig. 3H). Cells expressing Tal-1/SCL, as well the CD31⁺/CD41⁺ antigen combination that defines HSC at this stage, are also present within the CD31⁺/CD41⁻ SAP (Fig. 4B). In conclusion, CD31⁺CD41⁺ HSC from both SAP and HIAC express the two highly related genes, *tal-1/scl* and *lyl-1*.

In wholemount X-Gal-stained 10 dpc *lyl^{LacZ/LacZ}* embryos, scattered labeled cells are present in the body wall and the

Fig. 3. *lyl-1* expression in the intra-embryonic hemogenic site. Abbreviations: Ao, aorta; M, mesonephros; n, notochord; NT, neural tube; SG, sympathetic ganglia; (A–G,I) AGM sections of 10.5 dpc *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos. (H) AGM sections of a 10 dpc *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryo. (A) X-Gal⁺ cells are observed in the HIAC located in the ventro-lateral part of the dorsal aorta (open arrowhead). (B) β -Gal activity is detected in endothelial cells. A few isolated X-Gal⁺ cells are present in the mesenchyme underlying the aortic floor within the putative SAP region (arrowheads). A few labeled circulating cells (arrows) are also present in the Aorta. (C) GATA-3 *in situ* hybridization on a section adjacent to (B) GATA-3 expression delineates the SAP region (asterisks). The few X-Gal⁺ cells (arrowheads) detected in (B) co-localize with the GATA-3⁺ SAP. GATA-3 is also expressed in mesonephros and sympathetic ganglia. (D,E) β -Gal immuno-labelling (green) is detected within a sub-population of the HIAC, that co-expresses CD31 (D) and AA4.1 (E) merge co-expression of AA4.1 and CD31 in light pink). Circulating cells display a non specific cytoplasmic labeling (arrows). Note that the β -Gal immuno-labelling appears in the nucleus, presumably due to nuclear targeting signal(s) present in the Lyl-1 moiety of the Lyl-1 Δ / β -Gal protein. (F) Aorta endothelial cells express β -Gal and CD31. In the SAP region, the few CD31⁺ CD45⁻ cells present a nuclear β -Gal immuno-labelling (arrowheads). CD31⁺CD45⁺ myeloid precursors in this section do not express β -Gal (arrows). (G) In the SAP (arrowheads) and aorta endothelium, β -Gal⁺CD31⁺ cells also express AA4.1 (light pink in the merge panel). β -Gal⁺CD31⁺AA4.1⁺ cells (open arrowhead) are also present in the HIAC. (H) β -Gal⁺CD31⁺ cells in the SAP express a low CD41 level, which altogether characterize the HSC phenotype (arrowheads). This marker allows the discrimination between HSC and CD31⁺AA4.1⁺CD45⁻ endothelial cells. β -Gal⁺CD31⁺CD41⁺ cells are also present in the HIAC (open arrowhead), wherein CD41 is expressed at higher levels than in the SAP. (I) The F4/80⁺CD45⁺ macrophage population comprises both β -Gal⁺ (arrows) and β -Gal⁻ (bold arrows) cells. Scale bars: (A,D,E) 20 μ m; (B,C,F,G) 100 μ m; and (H,I) 50 μ m.

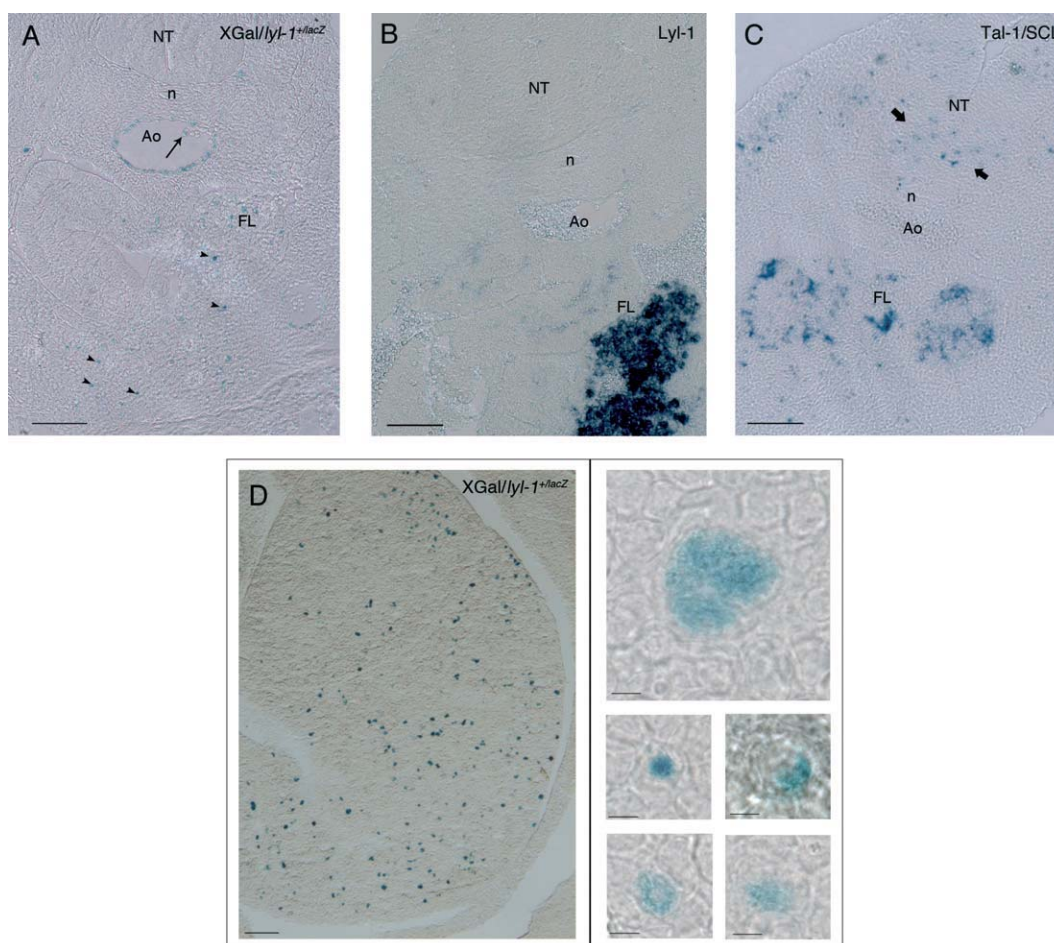


Fig. 5. *lyl-1* and *tal-1/scl* expression in the fetal liver. Abbreviations: Ao, aorta; FL, fetal liver; n, notochord; NT, neural tube. (A–C) β -Gal activity (A) is detected in the fetal liver in a few number of cells (arrowheads) than *Lyl-1* mRNA (B), in sections of 10.5 dpc *lyl-1^{+/LacZ}* and wild-type embryos, respectively. β -Gal activity (A) is also observed in some circulating cells (arrow). No X-Gal-positive cells (A), nor *Lyl-1* transcripts (B) are detected in the neural tube, whereas *Tal-1/SCL* mRNA is observed in this location (arrows) in section of 10 dpc embryos (C). (D) Section of the fetal liver of a 14 dpc *lyl-1^{+/LacZ}* embryo (left panel). The X-Gal nuclear staining of fetal liver hematopoietic cells appears varied in shape (right panel). Scale bars: (A–C,D: left panel), 100 μ m; and (D: right panel), 5 μ m.

roof of the neural tube (arrowheads in Fig. 2G), in a distribution similar to that of $CD45^+$, $F4/80^+$ macrophages at this stage (Lichanska et al., 1999 and our unpublished data). In AGM sections, the $CD45^+$ and $F4/80^+$ macrophage population comprises both β -Gal positive and negative cells (Fig. 3I).

Altogether, these data indicate that *lyl-1* is expressed by intra-embryonic HSC as well as by a macrophage subset that, at this developmental stage, probably derives from YS hematopoietic precursors.

Fetal liver, spleen and thymus. From 10 dpc, YS-derived circulating hematopoietic cells colonize the fetal liver. A little later (10.5–11.5 dpc), the fetal liver receives a second cohort of immigrants, namely AGM-derived HSC, and from then on becomes the major hematopoietic organ of the embryo. X-Gal positive hematopoietic cells are seen in the liver as soon as it becomes morphologically identifiable in the septum transversum, at 10 dpc, indicating that at least some YS-derived cells express the *Lyl-1* Δ / β -Gal protein (data not shown). However, β -Gal activity (arrowheads in Fig. 5A) is detected in a few number of fetal liver cells than *Lyl-1* or *Tal-1/SCL* mRNA (Fig. 5B and C). This may

be the consequence of the lack of β -Gal activity in the YS-derived erythroid lineage. X-Gal positive cells are present in the fetal liver in all subsequent stages analyzed (up to 14 dpc, Fig. 5D). The morphology of nuclear X-Gal staining in fetal liver hematopoietic cells is diverse (multilobulated, kidney-shaped, annular, etc.), suggesting that multiple hematopoietic cell types express *lyl-1*.

β -Gal activity is also detected in the developing spleen from 13 dpc (data not shown), i.e., soon after the onset of its colonization at 12 dpc (Godin et al., 1999).

No β -Gal activity is detected in the developing thymus of 10.5–14 dpc *lyl-1^{+/LacZ}* embryos, suggesting that embryonic T-cells do not express *lyl-1*, consistent with the previously described lack of *LYL-1* and *TAL-1/SCL* transcription in human T-lymphoid cells (Visvader et al., 1991).

1.3. Circulating blood cells

As stated above, YS-derived circulating erythroid cells, which express both *Lyl-1* and *Tal-1/SCL* mRNA, but lack β -Gal activity are found in the whole vascular network

(extra- and intra-embryonic) from 8 dpc (Figs. 1N and 2F). The first circulating cells displaying β -Gal activity are detected in *lyl-1^{+LacZ}* embryos between 9 and 10 dpc. Beside isolated cells present at a low frequency in both extra- and intra-embryonic vessels (arrows in Figs. 3B and 5A), X-Gal labeling of wholemount 10 dpc embryos allow the detection of compact cell clusters located: (1) in the posterior part of the aorta (open arrow in Fig. 2G), (2) in the omphalomesenteric artery (Fig. 6A–C), (3) in the yolk sac, in continuity with the omphalomesenteric artery and at the junction of large YS blood vessels (Fig. 6D and E). These compact cell clusters are never found in veins (Figs. 2G and 6A). They appear relatively homogeneous in size and without continuity with the endothelium, which they locally deform, often obstructing the lumen (Fig. 6C and E). These hematopoietic plugs were not assayed for *Lyl-1* and *Tal-1/SCL* mRNA expression as they would not be easily discriminated from the bulk of YS-derived erythroid cells that express high levels of these two transcripts.

These previously undisclosed “plugs” may be distinguished from the HIAC by (1) their stage of appearance (they are present in the vessels from 9 dpc, whereas HIAC are only detected after 10 dpc), (2) their distribution (the “plugs” are also present in the YS vessels), (3) their location

within the vessel (they fill the whole lumen, whereas HIAC are only present in the ventral aspect of the arteries). The “plugs” seem to gradually disintegrate between 10.5 and 11 dpc, as β -Gal⁺ aggregates become smaller and the number of scattered positive cells increases in the whole vascular network. A sharp decrease of β -Gal⁺ circulating cells is observed from 11.5 to 12 dpc and, from 14 dpc, such cells are no longer detected in the circulation.

Intravascular β -Gal⁺ hematopoietic plugs thus appear in the vasculature concomitantly to the starting activity of the intra-embryonic hemogenic site and are mainly observed when the generation of HSC in the AGM culminates by 10–11.5 dpc (Godin et al., 1999).

1.4. Other organs

Beside the endothelial and hematopoietic system, *Tal-1/SCL* is also expressed in the developing central and peripheral nervous system from 10 dpc (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1999; van Eekelen et al., 2003 and arrows in Fig. 5C). In contrast, no X-Gal-positive cells (Figs. 2H and 5A) nor *Lyl-1* transcripts (Fig. 5B) are detected in the 10–10.5 dpc developing nervous system. These distinct expressions are maintained up to 14 dpc (latest examined stage),

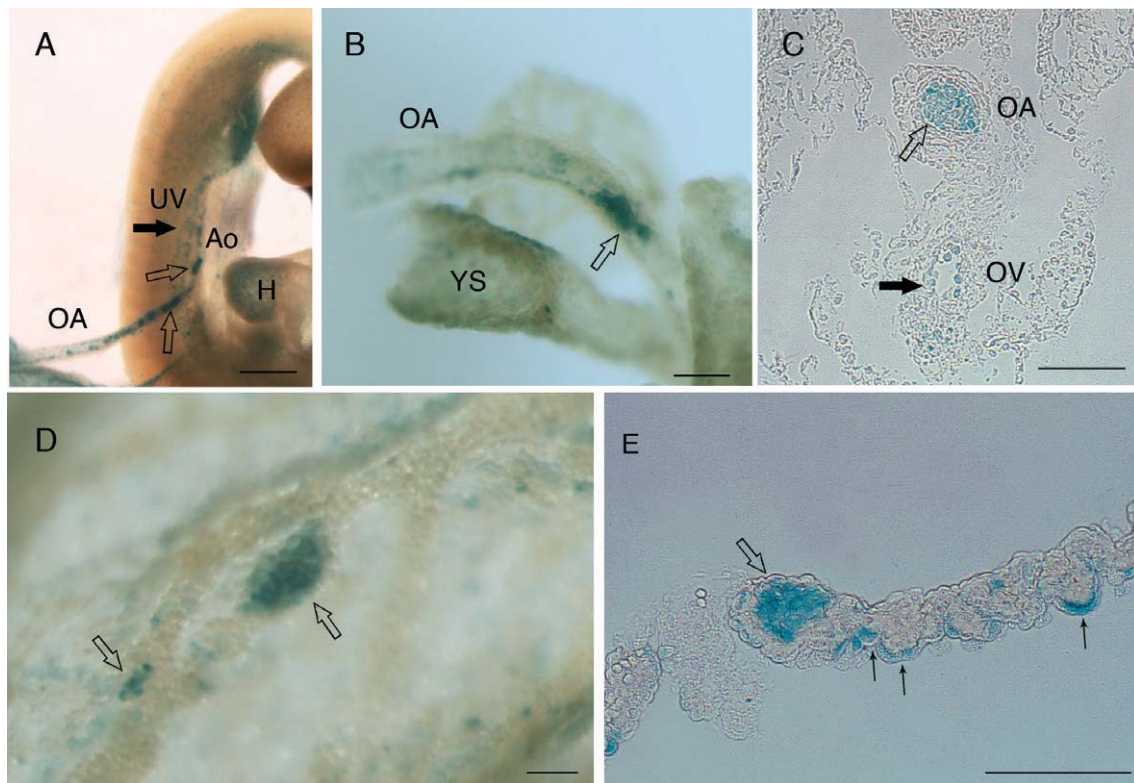


Fig. 6. *lyl-1* expression in circulating cells. Abbreviations: Ao, aorta; H, heart; OA, omphalomesenteric artery; OV, omphalomesenteric vein; UV, umbilical vein; YS, yolk sac; (A) 9.75 dpc (26 S) *lyl-1^{+LacZ}* embryo; X-Gal⁺ plugs (open arrows) are present in the aorta and omphalomesenteric arteries; Note that the umbilical vein is devoid of X-Gal⁺ plugs (arrow). (B) 10 dpc (32S) *lyl-1^{+LacZ}* embryo; a large X-Gal⁺ plug (open arrow) fills the lumen of the omphalomesenteric artery. (C) Section of a wholemount X-Gal stained 10 dpc (30–35S) *lyl-1^{+LacZ}* embryo; Whereas the lumen of the omphalomesenteric artery is filled by a hematopoietic X-Gal⁺ plug (open arrow), the omphalomesenteric vein (arrow) is devoid of X-Gal⁺ plugs. (D) X-Gal stained 10 dpc (30–35S) *lyl-1^{+LacZ}* YS; large and medium-sized plugs (open arrows) are present in the YS vasculature. (E) Section of a wholemount X-Gal stained 10 dpc (30–35S) *lyl-1^{+LacZ}*. A X-Gal plug fills the whole YS blood vessel (large open arrow). Yolk granules in the endodermal cells display a non-specific staining (arrows). Scale bars: 100 μ m.

Table 1
Compared Lyl-1 and Tal-1 expression in the developing mouse embryo

	<i>lyl-1</i> Δ/βGAL	Lyl-1 mRNA	Tal-1/SCL protein and/or <i>Tal-1</i> /β-GAL	Tal-1/SCL mRNA
Extra-embryonic compartment				
Extra-embryonic mesoderm	–	+	+ (1, 2, *)	+ (4, *)
YS Hematopoietic cells (erythroid)	–	+	+ (1, 2, *)	+ (4, *)
YS Endothelial cells	–	+	+ (1, 2, *)	+ (4, *)
Allantois	+	+	+ (1, 2, *)	+ (*)
Intra-embryonic compartment				
Intra-embryonic endothelial cells	+	+	+ (1, 2, *)	+ (*)
Endocardium	+	+	+ (1, 2, *)	+ (*)
Intra-embryonic hemogenic site				
HIAC	+	ND	+ (2,*)	ND
HSC within SAP	+	ND	+ (*)	ND
Fetal liver and spleen hematopoietic cells	+	+	+ (1, 2, *)	+ (*)
Embryonic Thymus	–	–	–	–
Central nervous system	–	–	+ (1–3, *)	+ (*)

Whereas *lyl-1*Δ/βGAL and Lyl-1 mRNA expression are all from the present data, data concerning the expression of Tal-1/SCL X-Gal/protein or mRNA come from the following reports, excepts for those labeled *, which are drawn from the present study.

- 1, Kallianpur et al. (1994).
- 2, Elefanty et al. (1999).
- 3, van Eekelen et al. (2003).
- 4, Silver and Palis (1997).

except that the choroid plexus displays a non-specific β-Gal activity present in both *lyl-1*^{+LacZ} and wild-type embryos from 11 to 14 dpc (data not shown). The absence of Lyl-1 mRNA detection in Tal-1/SCL expressing nervous system rules out the possibility that the Lyl-1 riboprobe cross-hybridizes with Tal-1/SCL mRNA.

From 14 dpc, Tal-1/SCL has been reported to be expressed in cells in the dermis and epidermis (probably mast cells and melanocytes), nasal epithelium, adrenal medulla, and by chondrocytes in the perichondrium of the developing ribs, femur, and jaws (Kallianpur et al., 1994). We found no expression of Lyl-1 mRNA nor β-Gal activity in these locations (data not shown).

Thus, *lyl-1* is a gene specifically expressed by derivatives of the hemangioblastic mesoderm, as it is only expressed by endothelial, endocardial, and hematopoietic cells during mouse development.

Interestingly, while mRNA expression and β-Gal activity coincide in the intra-embryonic compartment and, within the extra-embryonic compartment, in the allantois, no β-Gal activity is detected in early YS-blood islands derivatives, endothelial, and hematopoietic cells, although both cell types express Lyl-1 mRNA. Concerning YS-derived hematopoietic cells, the absence of β-Gal activity is conspicuous in erythroid cells present in the YS, in the blood vessels (systemic circulation) and in the fetal liver during early stages of erythropoiesis. As the Lyl-1Δ/β-Gal protein retains a large part of Lyl-1 (its N-terminus two-third), it is possible that the product of the *lyl-1*^{LacZ} allele undergoes at least part of a translational/post translational regulation controlling wild type *lyl-1* expression. For instance, the lack of β-Gal activity in a subset of Lyl-1 mRNA-expressing cells may reveal a cell type-specific inefficient translational initiation of Lyl-1 mRNA and/or an accelerated degradation of the Lyl-1Δ/

β-Gal protein. Alternatively, it may be conceivable that the expression of the *lyl-1*^{LacZ} allele does not faithfully recapitulate that of the natural allele: possibly the neo cassette which is retained in the modified allele somehow distorts the normal transcriptional regulation of the gene.

A comparison between the expression patterns of *lyl-1* and *tal-1/scl* (Table 1) reveals a largely overlapping pattern, in the developing vasculature and endocardium and, within the developing hematopoietic system, in the sites of emergence of intra-embryonic HSC (HIAC and SAP), in the fetal liver and spleen, but not in the thymus. However, the expression patterns of these two genes differ in several instances: (1) unlike Tal-1/SCL, the Lyl-1Δ/β-Gal protein is not expressed in YS-blood islands during vasculogenesis and primitive erythropoiesis, so that the endothelial expression of the Lyl-1Δ/β-Gal protein is restricted to the intra-embryonic compartment and allantois; (2) *lyl-1* does not share *tal-1/scl* neuronal expression (van Eekelen et al., 2003). The overall mRNA expression pattern common to Lyl-1 and Tal-1/SCL is reminiscent of that previously observed with Lmo2 (Manaia et al., 2000), a transcription cofactor that has been found to form complexes with either Tal-1/SCL or Lyl-1 proteins (Wadman et al., 1994).

Finally, the Tal-1/SCL mRNA expression pattern in *lyl-1*^{+LacZ} and *lyl-1*^{LacZ/lacZ} embryos appears identical to that found in wild-type embryos (data not shown).

2. Experimental procedures

2.1. Animal

In this work, we used C57BL/6 mice as well as “knock-in” *lyl-1*^{LacZ} mice (Capron et al., 2006) containing a targeted allele in which an in-frame insertion of the β-Galactosidase (*lacZ*) reporter gene replaced part of the fourth coding exon. Mice were bred in the animal facilities of the Institut

Gustave Roussy. All animal experiments were conducted in compliance with French and European regulations.

C57BL/6 *lyl-1^{LacZ/LacZ}* males were crossed with wild-type C57BL/6 females to generate *lyl-1^{+LacZ}* embryos and the morning of the vaginal plug observation was considered as 0.5 dpc. Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation. Embryos between 8 and 12 dpc were staged by somite counting. Presomitic embryos were staged according to the development of the allantois bud and neural folds: OB (no bud) and LB (late bud) from 7.25 to 8 dpc; EHF (early head fold) and LHF (late head fold) from 7.5 to 8 dpc (Downs and Davies, 1993).

2.2. *In situ* hybridization

DIG-labeled (Boehringer–Mannheim) riboprobes were obtained from PCR fragments subcloned into expression vectors (β H1, provided by I. Max-Audit, 250 bp subcloned into pCRTM; GATA-3, provided by V. Lemarchandel, 367 bp subcloned into pCRTMII; Tal-1/SCL, from V. Lemarchandel, 744 bp subcloned into Bluescript SK⁺; and *Lyl-1*: 1.4 kb into MPI). To obtain 10 μ m cryostat sections, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde, 4% sucrose, 0.12 M CaCl₂, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, H₂O and embedded in 0.12 M phosphate buffer, 7.5% gelatin, 15% saccharose, and then frozen in liquid nitrogen. Wholemount embryos (7.5–10 dpc embryos) or cryostat sections from 10 to 14 dpc wild type, *lyl-1^{+LacZ}* or *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos were hybridized with riboprobes at 65 °C, as previously described (Manai et al., 2000). Alternate sections (on two consecutive microscope slides) were processed for *in situ* hybridization with GATA-3 riboprobes in order to indicate the sub-aortic patches position or for X-Gal counter-staining. Computer driven overlay of the digital images of X-Gal and GATA-3 stained consecutive sections allows the allocation of X-Gal⁺ cells relatively to the SAP.

2.3. X-Gal staining

The 5' cis-regulatory regions of *lyl-1* control the expression of the mRNA encoding the *Lyl-1* Δ / β -Gal protein. Hence, the detection of β -Gal activity likely reflects the transcriptional activation of the wild type *lyl-1* gene. The expression of β -Galactosidase is revealed by enzymatic activity on its specific substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside (X-Gal), which, hydrolyzed, gives blue-colored nuclear staining.

X-Gal staining was performed either on wholemount embryos or on cryostat sections. In either case, *lyl-1^{+LacZ}* or *lyl-1^{LacZ/LacZ}* embryos and YS were fixed in PBS, 0.2% paraformaldehyde, 0.1 M Pipes (pH 6.9), 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA for 30 min at room temperature, and then washed in PBS. For sections, fixed embryos were embedded as described above. Wholemount embryos or 10–15 μ m cryostat sections were incubated with staining solution (1 mg/mL X-Gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 0.02% Nonidet P-40, 0.01% Na deoxycholate, in PBS) overnight at 37 °C. Wholemount or cryostat sections of wild-type embryos were similarly processed to detect non-specific β -Gal activity.

2.4. Immuno-fluorescence stainings

For multiple labeling, permeabilized (0.1% Triton X-100) cryostat sections were first incubated with PBS + 10% fetal calf serum for at least 2 h at room temperature in order to prevent non-specific antibody binding, and then incubated overnight at 4 °C with the S19 rabbit polyclonal antibody against β -Galactosidase (a kind gift from J.F. Nicolas, Pasteur Institute) and other primary antibodies. We used rat anti-mouse monoclonal antibodies against the following cell surface markers: Purified or PE-coupled anti-CD31 (MEC13.3), anti-CD45-PE-Cy5 (LCA.Ly.5) and anti-CD41-FITC (MWRReg30) from BD Bioscience-Pharmingen, anti-F4/80-PE (CI/A3-1) from Caltag and purified anti-AA4.1 (from Ihor Lemishka). Secondary antibodies used were Alexa fluor® 488- or Alexa fluor® 546-goat anti-rabbit and Alexa fluor® 633-goat anti-rat (Molecular probe). Sections are mounted with Vectashield Hardset (Vector).

Wholemount and section immuno-staining with the rabbit anti-Tal-1/SCL polyclonal antibody (provided by Stephen Brandt) was performed according to Yoshida et al. (1998).

2.5. Observation

Wholemount embryos and yolk sacs were observed on Olympus SZX12 stereomicroscope and images were acquired with the DP50 Olympus digital camera (Analysis© software). X-Gal stained and *in situ* hybridized sections were observed on a Zeiss Axiophot light microscope. Stacks of confocal images were collected with a LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss) using 20X/0.75 or 40X/1.2W Apochromat plan objectives. The excitation wavelengths were 488 nm for Alexa fluor® 488 and PE-Cy5, 543 nm for PE and Alexa fluor® 546, and 633 nm for Alexa fluor® 633. Images were acquired using BP505-530, BP560-615, and LP650. Images were processed with the Adobe Photoshop CS software.

Acknowledgements

We thank Michèle Klaine for expert assistance with embryos preparation, the staff from IGR's "SCEA" animal facility for mice husbandry, and Philippe Herbomel for critical reading of the manuscript. The work is supported by grants from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (Grant No. 3552) and Institut Gustave Roussy (CRI grant X74487). S.G. and C.C. are supported by the "Association pour la Recherche sur le Cancer" and A.K. by the French Ministry of Research and Education.

References

- Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., Godin, I., 2005a. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106, 3004–3011.
- Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., Cumano, A., 2005b. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *PNAS* 102, 134–139.
- Capron, C., Lecluse, Y., Kaushik, A.L., Foudi, A., Lacout, C., Sekkai, D., Godin, I., Albagli, O., Poullion, I., Svinartchouk, F., et al., 2006. The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* 107, 4678–4686.
- Chapman, M.A., Charchar, F.J., Kinston, S., Bird, C.P., Grafham, D., Rogers, J., Grutzner, F., Marshall Graves, J.A., Green, A.R., Gottgens, B., 2003. Comparative and functional analyses of LYL1 loci establish marsupial sequences as a model for phylogenetic footprinting. *Genomics* 81, 249–259.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I., 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907–916.
- Cumano, A., Ferraz, J.C., Klaine, M., Di Santo, J.P., Godin, I., 2001. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477–485.
- de Bruijn, M.F., Speck, N.A., Peeters, M.C., Dzierzak, E., 2000. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J.* 19, 2465–2474.
- Downs, K.M., Davies, T., 1993. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255–1266.
- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Metcalf, D., Barnett, L., Kontgen, F., Robb, L., 1998. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11897–11902.

- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Hartley, L., Papaevangelidou, B., Robb, L., 1999. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754–3763.
- Garcia-Porrero, J.A., Godin, I.E., Dieterlen-Lievre, F., 1995. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat. Embryol. (Berl)* 192, 425–435.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lievre, F., Cumano, A., 1999. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J. Exp. Med.* 190, 43–52.
- Godin, I., Cumano, A., 2002. The hare and the tortoise: an embryonic hematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 593–604.
- Kallianpur, A.R., Jordan, J.E., Brandt, S.J., 1994. The SCL/TAL gene is expressed in progenitors for both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200–1208.
- Lichanska, A.M., Browne, C.M., Henkel, G.W., Murphy, K.M., Ostrowski, M.C., McKercher, S.R., Maki, R.A., Hume, D.A., 1999. Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* 94, 127–138.
- Mania, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I., 2000. Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127, 643–653.
- Marshall, C.J., Moore, R.L., Thorogood, P., Brickell, P.M., Kinnon, C., Thrasher, A.J., 1999. Detailed characterization of the human aorta–gonad–mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev. Dyn.* 215, 139–147.
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Malik, J., Palis, J., 2003. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669–1676.
- Medvinsky, A., Dzierzak, E., 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897–906.
- Mellentin, J.D., Smith, S.D., Cleary, M.L., 1989. *lyl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix–loop–helix DNA binding motif. *Cell* 58, 77–83.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G., 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., Orkin, S.H., 1996. The T-cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47–57.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., Begley, C.G., 1995. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7075–7079.
- Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Köntgen, F., Li, R., Barnett, L.D., Begley, C.G., 1996. The *scl* gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15, 4123–4129.
- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., Orkin, S.H., 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432–434.
- Silver, L., Palis, J., 1997. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 89, 1154–1164.
- van Eekelen, J.A., Bradley, C.K., Gothert, J.R., Robb, L., Elefanty, A.G., Begley, C.G., Harvey, A.R., 2003. Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience* 122, 421–436.
- Visvader, J., Begley, C.G., Adams, J.M., 1991. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix–loop–helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* 6, 187–194.
- Wadman, I., Li, J., Bash, R.O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T.H., Baer, R., 1994. Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* 13, 4831–4839.
- Yoshida, H., Takakura, N., Hirashima, M., Kataoka, H., Tsuchida, K., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-I., 1998. Hematopoietic tissues, as a playground of receptor tyrosine kinases of the PDGF-receptor family. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 321–332.

Résultats 2^{ème} partie

Article n°1

Analyse fonctionnelle de facteurs impliqués
dans l'émergence des précurseurs
hématopoïétiques de l'embryon de souris

**Gene transfer to pre-hematopoietic and committed
hematopoietic precursors in the early mouse Yolk Sac: a
comparative study between *in situ* electroporation and
retroviral transduction**

Sébastien JD Giroux, Celmar Alves-Leiva, Yann Lécluse,
Patrick Martin, Olivier Albagli and Isabelle Godin

I/ Modification de l'expression génique dans les précurseurs du Sac Vitellin précoce

Introduction: L'une des stratégies les plus informatives pour appréhender les mécanismes génétiques contrôlant le développement embryonnaire ou le fonctionnement d'organes adultes est la manipulation génétique, suivie de l'analyse des effets phénotypiques obtenus. Ces stratégies sont limitées au développement précoce chez le xénope ou le poisson zèbre, coûteuses et difficiles chez la souris et, jusqu'à récemment, impossibles chez le poulet. C'est dans ce contexte que le premier objectif de mon travail de thèse, qui est d'effectuer l'analyse de facteurs potentiellement impliqués dans l'émergence des précurseurs hématopoïétiques de l'embryon souris, a consisté à comparer l'efficacité de deux méthodes pour effectuer la transduction, soit des précurseurs mésodermiques, soit des précurseurs hématopoïétiques du Sac Vitellin.

La première méthode, très utilisée en biologie du développement, consiste à transférer les cellules dans l'embryon *in situ*, en utilisant l'électroporation à ondes carrées. Cette technique permet aux cellules transfectées d'évoluer dans leur environnement tridimensionnel normal. La seconde approche a consisté à tester l'infection rétrovirale qui est une méthode classiquement utilisée pour moduler l'expression génique dans les CSH ou les cellules plus engagées du système hématopoïétique, tels que les progéniteurs et les précurseurs.

Principes de l'électroporation: En 1972, un chercheur allemand du nom de E. Neumann, du Max Planck Institut de Munich, révéla que des cellules soumises à un bref champ électrique augmentent leur perméabilité jusqu'à se transformer en véritables « passoirs ». Cet état passé, la membrane cellulaire recouvre sa structure habituelle. Néanmoins, ces premières expériences montraient que les cellules étaient fortement endommagées, et la plupart du temps, mouraient très rapidement. En modifiant la forme de l'impact électrique, c'est-à-dire en substituant à un courant très fort puis rapidement décroissant (**décroissance exponentielle**), un électrochoc doux, c'est-à-dire une brève impulsion d'intensité modérée (**impulsion carrée**), Louis Mir a mis au point une technique permettant de sauver les cellules d'une mort assurée. L'électro-perméabilisation des cellules vivantes est maintenant une technique connue et maîtrisée pour l'introduction de médicaments, d'ADN et d'autres molécules non perméantes dans des cellules *in vivo* et *in*

vitro, et l'électro-chimiothérapie est déjà utilisée en routine pour traiter des patients atteints de cancer (Orlowski et al., 1998).

L'électroporation est utilisée depuis longtemps pour transférer de l'ADN dans des bactéries ou dans des cellules eucaryotes en culture (Andreason and Evans, 1988). Elle consiste à appliquer un champ grâce à deux électrodes placées de part et d'autre des parois d'une chambre contenant une suspension mixte d'ADN et de cellules. Les parois cellulaires sont perméabilisées et l'ADN est transféré dans les cellules selon une orientation polarisée (chargé négativement, il est attiré par l'anode). La modulation des paramètres de base de cette technique a permis son application à la transfection d'ADN *in vivo* dans des tissus ou dans des embryons entiers (Muramatsu et al., 1997). Cette technique a tout d'abord été mise au point pour le transfert de gènes dans le tube neural d'embryons de poulet.

Pour accéder à l'embryon, une fenêtre est découpée dans la coquille et la solution d'ADN est injectée dans le tube neural à l'aide d'une micropipette. Deux électrodes sont alors appliquées en parallèle de chaque côté de l'embryon. Ceci procure l'avantage d'obtenir, sur le même embryon, un côté témoin qui ne reçoit pas l'ADN et peut être comparé avec le côté du tube neural modifié. Les oeufs sont refermés et incubés pour permettre la progression du développement de l'embryon et l'expression du gène transféré. L'utilisation du gène rapporteur codant pour la β -galactosidase (*lacZ*) permet de visualiser l'expression du transgène. Cette expression peut être détectée deux à trois heures après l'électroporation, mais reste cependant transitoire car l'ADN ne s'intègre pas au génome (Itasaki et al., 1999). Nous verrons dans l'article qui suit les modalités de mise au point des paramètres permettant de concilier l'efficacité d'électroporation et une bonne viabilité de l'embryon (dans notre cas, explant de SV).

L'électroporation *in vivo* est une technique potentiellement applicable à tous les types de tissus ou organismes. La forme des électrodes et le site d'injection d'ADN constituent alors la clef de la réussite. L'électroporation est également devenue une méthode de choix pour réaliser des études dans l'embryon de souris, par exemple par la complémentation génique de souris mutantes. Il est en effet possible, par la technique d'électroporation, de tester la capacité de gènes candidats à récupérer un phénotype de type « perte de fonction » et, qui plus est, à un moment spécifique du développement et dans une région embryonnaire ciblée (Pierreux et al., 2005; Soares et al., 2005).

Cependant, il est très difficile de manipuler les embryons murins *in utero* et l'électroporation requiert donc l'extraction des embryons, suivie de leur culture *in vitro* après

l'électroporation. La possibilité d'utiliser cette même méthode dans différentes espèces en fait un outil précieux (Swartz et al., 2001). L'électroporation n'est pas limitée à la surexpression d'un gène, elle permet également d'interrompre la fonction d'un gène en utilisant des mutants dominants négatifs, ou bien des vecteurs codant des ARN interférants (Calegari et al., 2004).

Résultats : L'électroporation *in vivo* offre donc de nouvelles possibilités d'études du contrôle de l'expression des gènes et de leur fonction au cours du développement embryonnaire. Comme vous pourrez le constater dans les résultats ci-après, nous avons mis au point un protocole d'électroporation qui montre pour la première fois que l'électroporation *in vivo* peut être utilisée pour l'étude du développement hématopoïétique dès les stades de la gastrulation (7 jdg) et qu'elle n'affecte pas le potentiel de différenciation des PH du SV. Cette technique se révèle quantitativement peu efficace (nombre de cellules transfectées : GFP⁺), mais permet un ciblage relativement efficace des cellules d'intérêts.

Principe de l'infection rétrovirale : La capacité des virus à ADN ou à ARN à induire un état de tumorigenèse par transformation cellulaire via un transfert de matériel génétique tels que des oncogènes viraux est à la base de l'utilisation des vecteurs viraux pour transférer des gènes exogènes dans des cellules cibles. Le transfert de gènes par des vecteurs rétroviraux est actuellement l'une des approches les plus utilisées pour étudier l'expression de gènes étrangers dans les cellules hématopoïétiques. Les rétrovirus sont constitués d'une capsidie entourée par une enveloppe permettant l'adsorption à la membrane cellulaire. Le génome viral est un dimère d'ARN comportant, d'une part des séquences codant les protéines de la capsidie (gag : group-specific Antigen), de l'enveloppe (env), de la transcriptase inverse et de l'intégrase (pol, RNA-dépendant DNA polymerase). Leur transcription est assurée par la présence de séquences non codantes (LTR : Long Terminal Repeat). D'autres séquences non codantes ont pour fonction de permettre l'encapsidation de l'ARN rétroviral (Psi : Packaging signals). La spécificité d'espèce des cellules infectables est déterminée par la glycoprotéine de l'enveloppe. Ainsi, on définit des virus ayant un tropisme « écotrope » (à tropisme limité à la souris), « xénotrope » (à large tropisme, mais n'infectant pas la souris) et « amphotrope » (à tropisme plus large, permettant l'infection des cellules humaines). La fixation du virus sur son récepteur constitue la première étape du cycle viral.

Le transfert de gène, qu'il soit à visé thérapeutique ou non, ne peut être médié par des rétrovirus sous forme répliquative du fait de dangers qu'ils représentent. C'est pourquoi des vecteurs rétroviraux défectifs pour la répllication ont été conçus par délétion des gènes de

structure gag, pol et env. Ceci implique donc l'utilisation de lignées d'encapsidation pour permettre la fabrication de particules infectieuses.

Le rétrovirus utilisé lors de cette étude est le Migr1. Il s'adsorbe et sa membrane avec celle la membrane cellulaire de la cellule cible et libère alors le contenu nucléoprotéique dans le cytoplasme. La principale différence entre la transduction rétrovirale et l'électroporation *in vivo* repose sur la nature de l'expression du transgène. Lors de l'infection rétrovirale, le provirus s'intègre au génome de la cellule hôte et l'expression devient de ce fait constitutive (sous le contrôle des LTR).

Résultats : Quelques auteurs ont montré que l'infection rétrovirale pouvait être utilisée pour transduire les PH du SV (Kyba et al., 2002) ou de la Sp-PA/AGM (Goyama et al., 2004; Mukouyama et al., 1999). Néanmoins, aucune donnée précise dans la littérature ne permettait d'évaluer l'efficacité de l'infection rétrovirale sur les PH de SV précoces (8 jdg). Pour le SV, nous avons montré que deux heures de mise en contact avec le surnageant rétroviral contenant un vecteur vide suffisent à obtenir, seize heures plus tard 40% de cellules GFP⁺. Une mise en contact plus longue (4 à 6 heures), permet d'obtenir des taux de transduction de même ordre et n'affecte pas la viabilité cellulaire. Néanmoins, pour les constructions contenant un transgène, une meilleure transduction est obtenue après 6 heures d'infection (30 à 40 % au lieu de 15% après deux heures d'exposition). Des analyses effectuées en cytométrie en flux ont montré que les cellules de SV infectées avec les vecteurs témoins, présentent une différenciation normale.

Methodology article

Open Access

Gene transfer to pre-hematopoietic and committed hematopoietic precursors in the early mouse Yolk Sac: a comparative study between *in situ* electroporation and retroviral transduction

Sébastien JD Giroux^{1,2,3}, Celmar Alves-Leiva^{1,2,3}, Yann Lécluse^{1,2,3}, Patrick Martin⁴, Olivier Albagli^{†1,2,3} and Isabelle Godin^{*†1,2,3}

Address: ¹INSERM U790, Institut Gustave Roussy-PR1; 39, Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France, ²Institut Gustave Roussy, 39, Rue Camille Desmoulins; 94805 Villejuif, France, ³Université de Paris XI, Orsay, France and ⁴CNRS UMR6548; Université Nice-Sophia Antipolis, Bât. Sciences Naturelles; Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2; France

Email: Sébastien JD Giroux - Sebastien.Giroux@u-bourgogne.fr; Celmar Alves-Leiva - celmar.alves@hotmail.fr; Yann Lécluse - ylecluse@igr.fr; Patrick Martin - patrick.martin@unice.fr; Olivier Albagli - oalbagli@igr.fr; Isabelle Godin* - igodin@igr.fr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 2 July 2007

Received: 19 February 2007

BMC Developmental Biology 2007, **7**:79 doi:10.1186/1471-213X-7-79

Accepted: 2 July 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/7/79>

© 2007 Giroux et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Hematopoietic development in vertebrate embryos results from the sequential contribution of two pools of precursors independently generated. While intra-embryonic precursors harbour the features of hematopoietic stem cells (HSC), precursors formed earlier in the yolk sac (YS) display limited differentiation and self-renewal potentials. The mechanisms leading to the generation of the precursors in both sites are still largely unknown, as are the molecular basis underlying their different potential. A possible approach to assess the role of candidate genes is to transfer or modulate their expression/activity in both sites. We thus designed and compared transduction protocols to target either native extra-embryonic precursors, or hematopoietic precursors.

Results: One transduction protocol involves transient modification of gene expression through *in situ* electroporation of the prospective blood islands, which allows the evolution of transfected mesodermal cells in their "normal" environment, upon organ culture. Following *in situ* electroporation of a GFP reporter construct into the YS cavity of embryos at post-streak (mesodermal/pre-hematopoietic precursors) or early somite (hematopoietic precursors) stages, high GFP expression levels as well as a good preservation of cell viability is observed in YS explants. Moreover, the erythro-myeloid progeny typical of the YS arises from GFP⁺ mesodermal cells or hematopoietic precursors, even if the number of targeted precursors is low. The second approach, based on retroviral transduction allows a very efficient transduction of large precursor numbers, but may only be used to target 8 dpc YS hematopoietic precursors. Again, transduced cells generate a progeny quantitatively and qualitatively similar to that of control YS.

Conclusion: We thus provide two protocols whose combination may allow a thorough study of both early and late events of hematopoietic development in the murine YS. *In situ* electroporation constitutes the only possible gene transfer method to transduce mesodermal/pre-hematopoietic precursors and analyze the earliest steps of hematopoietic development. Both *in situ* electroporation and retroviral transduction may be used to target early hematopoietic precursors, but the latter appears more convenient if a large pool of stably transduced cells is required. We discuss the assets and limitation of both methods, which may be alternatively chosen depending on scientific constraints.

Background

In the mouse embryo, hematopoiesis involves the sequential contribution of two independent waves of precursors (for review, see [1]). The first precursor generation occurs in the extra-embryonic compartment, where the yolk sac (YS) blood islands produce erythro-myeloid-restricted precursors, from 7.5 days post-coitus (dpc). The second generation of hematopoietic precursors takes place, from 8.5 to 11.5 dpc, in the region comprising the Aorta and underlying mesenchyme, which is referred to first as para-aortic splanchnopleura (P-Sp: 8.5–10 dpc), then as aorta-gonads-mesonephros region (AGM: 10–11.5 dpc). The P-Sp/AGM produces hematopoietic precursors endowed with the multilineage differentiation potential and long term reconstitution (LTR) capacity that characterise Hematopoietic Stem Cells (HSC). The P-Sp/AGM prospective territory, the caudal intra-embryonic splanchnopleura (Sp: before 8.5 dpc) does not harbour a hematopoietic potential when cultured *in vitro* on OP9 stromal cells [2]. Yet, when the early Sp is cultured *in toto* for a few days, it now produces hematopoietic precursors, which harbour a multilineage differentiation potential as well as LTR capacity [3,4]. As the Sp are explanted before the establishment of vascular connection with the extra-embryonic vascular network, which occurs at the 4–5 somite-stage [5,6], this observation shows that the intra-embryonic site is capable of autonomously generating HSC. In contrast, the progeny of similarly treated YS lacks both multipotentiality (they are unable to generate lymphoid cells) and LTR activity (they only provide short term erythro-myeloid reconstitution of irradiated recipients) [5,6].

The analysis of gene function during the successive steps leading to the emergence, in the YS, of hematopoietic precursors with limited differentiation and self-renewal potentials, by comparison to the events occurring in the intra-embryonic hemogenic site, constitutes a major issue for understanding the process leading to HSC generation. Indeed, the inability of extra-embryonic precursors to provide a lymphoid progeny and to maintain in the long term might result from a divergence in the pathways leading from mesodermal cells to a committed hematopoietic progeny. This divergence may be (potentially) reflected by differential gene expression at the time of hematopoietic induction in both hemogenic sites. We aim to assess whether genes differentially expressed in the extra- and intra-embryonic hemogenic sites do indeed play a role in the distinct potentials displayed by extra- and intra-embryonic precursors through the forced expression in the YS of genes only expressed in the intra-embryonic Sp.

Most of the investigations aimed to characterize hematopoietic development pathways in the mouse YS involve the analysis of either genetically engineered mice strains

or *in vitro* differentiation potential of modified ES cells, which may be efficiently transduced by "classical" electroporation procedure or retroviral transduction [7]. We here describe and test an alternative approach that might help to decipher early steps of developmental hematopoiesis, by directly targeting YS cells. Moreover, to be able to separate potential effects on the emergence of native hematopoietic precursors from the blood islands mesoderm from effects on further differentiation and maintenance of these precursors, we designed and compared two independent protocols. The first, aimed to transiently transduce early blood islands mesodermal/pre-hematopoietic cells involves *in situ* electroporation, followed by an organ culture step prior to hematopoietic development investigations. The second, designed to target YS-hematopoietic precursors at later stages is based on retroviral transduction.

Embryo transduction through *in situ* electroporation [8], initially used mainly to analyse avian nervous system development, is now frequently used to study early stages of mouse ontogeny. This approach allows the introduction of transgenes into embryonic tissues explants [9] or into cells of the gastrulating mouse embryo [10–12] to follow cell fate, cell migration and lineage differentiation. We show here that this technique, which permits a controlled spatio-temporal delivery of transgenes and is compatible with the maintenance of transduced cells in their "natural" environment, is appropriate to analyze YS-blood islands mesodermal/pre-hematopoietic cells.

Retroviral transduction also constitutes an efficient approach to transfer cDNA into hematopoietic cells as well as HSC. Although efficiently used to transduce ES cells [7], it has yet been rarely used to transduce cells from early embryos. To our knowledge, it has only been used once to target 8 dpc YS hematopoietic precursors [13]. In this study, hematopoietic precursors were shown to acquire long-term multilineage hematopoietic reconstitution of irradiated recipients upon stable HoxB4 expression. However, the extent of efficiency and versatility of this method on YS cells was not reported. Here, it is shown that retrovirus-mediated gene transfer is inefficient to transduce YS mesodermal/pre-hematopoietic precursors, but is a powerful method to genetically modify hematopoietic precursors from YS at later stages.

Results

A-Gene transfer into early precursors from 7 dpc YS-blood islands

I-Determination of suitable stages for mesodermal/pre-hematopoietic cell targeting

To precisely identify the stage when blood islands are enriched in immature mesodermal or pre-hematopoietic cells, we used *lmo2* mRNA expression as a marker of

immature blood islands precursors. Indeed, the LIM-zinc finger transcriptional co-regulator *lmo2* is required for the generation of hematopoietic precursors of both extra- and intra-embryonic origin [14,15]. *lmo2* is expressed in the extra-embryonic mesoderm that gives rise to hematopoietic precursors [16,17], but also by their erythroid progeny. The differentiation of blood islands mesoderm into mature erythroid cells occurs extremely fast. We thus used β -H1 mRNA expression, as the earliest marker of differentiating erythroid cells, namely primitive erythroblasts. We compared the temporal evolution of the expression of both markers, during early blood islands formation (7.25 to 8 dpc), to select the time window when *lmo2* is expressed and β -H1 not yet/poorly expressed.

lmo2 transcripts are first detected at the OB stage in the whole extra-embryonic mesoderm (Fig. 1A) and are subsequently restricted, at the EB stage (Fig. 1B), to a subset of mesodermal cells, which might correspond to blood islands precursors. Upon proliferation of these precursors, *lmo2* expression expands to encompass all hematopoietic derivatives of the blood islands, from the LB to LHF stages (Fig. 1C, D) [17].

The first β -H1 transcripts are detected at the OB stage in a limited number of cells located within the *lmo2*-expressing ring (Fig. 1E). The number of cell clusters expressing β -H1 gradually increases, leading to the formation, at the LB stage, of a ring which expression overlaps that of *lmo2* (Fig. 1F, G). During the following stages (EHF/LHF), this correlation of *lmo2* and β -H1 expression is maintained (Fig. 1H). The correlation of these two expression patterns strongly suggest that mesodermal and/or pre-hematopoietic precursors are enriched in the OB to EB YS blood islands, even if mesodermal cells and native hematopoietic precursors may be still present in the blood islands at later stages. Targeting mesodermal cells was thus conducted at the OB to EB stages of development (Fig. 1 Lower panel).

II-Developmental constraints imposed on the choice of methodology

At these developmental stages, the determination and further proliferation/differentiation of hematopoietic precursors strictly depend on endoderm/mesoderm interaction. This implies that a method allowing the maintenance of tissue structure during transduction will be required for suitable development of a hematopoietic progeny from transduced cells. Accordingly, when we nevertheless tested the feasibility of dissociated cells transduction at the OB-EB stages using lipofection (using ExGen500) or retroviral transduction (see paragraph B2), we found that, in both instance, the transduction levels were naught, and cell viability drastically affected (Data not shown).

III-Viral-mediated transduction and in situ electroporation of 7dpc YS-blood islands

Given these constraints, two alternative approaches could be undertaken to transfer genes into the YS while keeping its tri-dimensional structure, viral-mediated transduction [18] and *in situ* electroporation. Indeed, both methods have already been used to transfer genes in other embryonic tissues and stages.

We first tested the ability of dissected YS to be transduced *in toto* by exposure to retroviral supernatant. OB-EB YS-explants were cultured in medium containing viral particles for 24 hours (for the method, see B). Explants were subsequently cultured in fresh medium for two days before assessing GFP levels and hematopoietic cell production. At the outset of the organ culture step, the morphology of transduced YS appeared affected by the process. Cytometry analysis of these YS explants showed that only 0.1% of viable cells expressed GFP. These cells were in addition unable to produce a hematopoietic progeny (data not shown).

We thus investigated *in situ* electroporation as a second approach.

I-General scheme of the in situ electroporation protocol

To optimize this method, we used the pEGFP-C1 plasmid (Clontech), which brings on a ubiquitous expression of the GFP reporter gene driven by the CMV promoter. After injection of the plasmid into the YS cavity and *in situ* electroporation, the YS is dissected from the embryo and kept in organ culture for three days.

The evolution of electroporated YS is systematically compared to non-electroporated control and/or control YS electroporated without plasmid. The effect of *in situ* electroporation on the development and viability of YS-explants is assessed through morphology examination after the organ culture step, as well as by the detection of endothelial and erythroid cells differentiation within the explants. GFP levels allow the monitoring of transduction efficiency. Finally, the characterization of the hematopoietic progeny of GFP⁺ sorted cells, obtained upon culture on OP9 stromal cells, which normally allows the hematopoietic differentiation of mesodermal precursors [19], is used to typify the targeted precursors.

2-In situ electroporation parameters adapted to YS-mesoderm transduction

Previous studies involving *in situ* electroporation stressed the importance of several parameters for an efficient DNA delivery as well a proper preservation of cell viability, and an accurate tissue targeting [20,21].

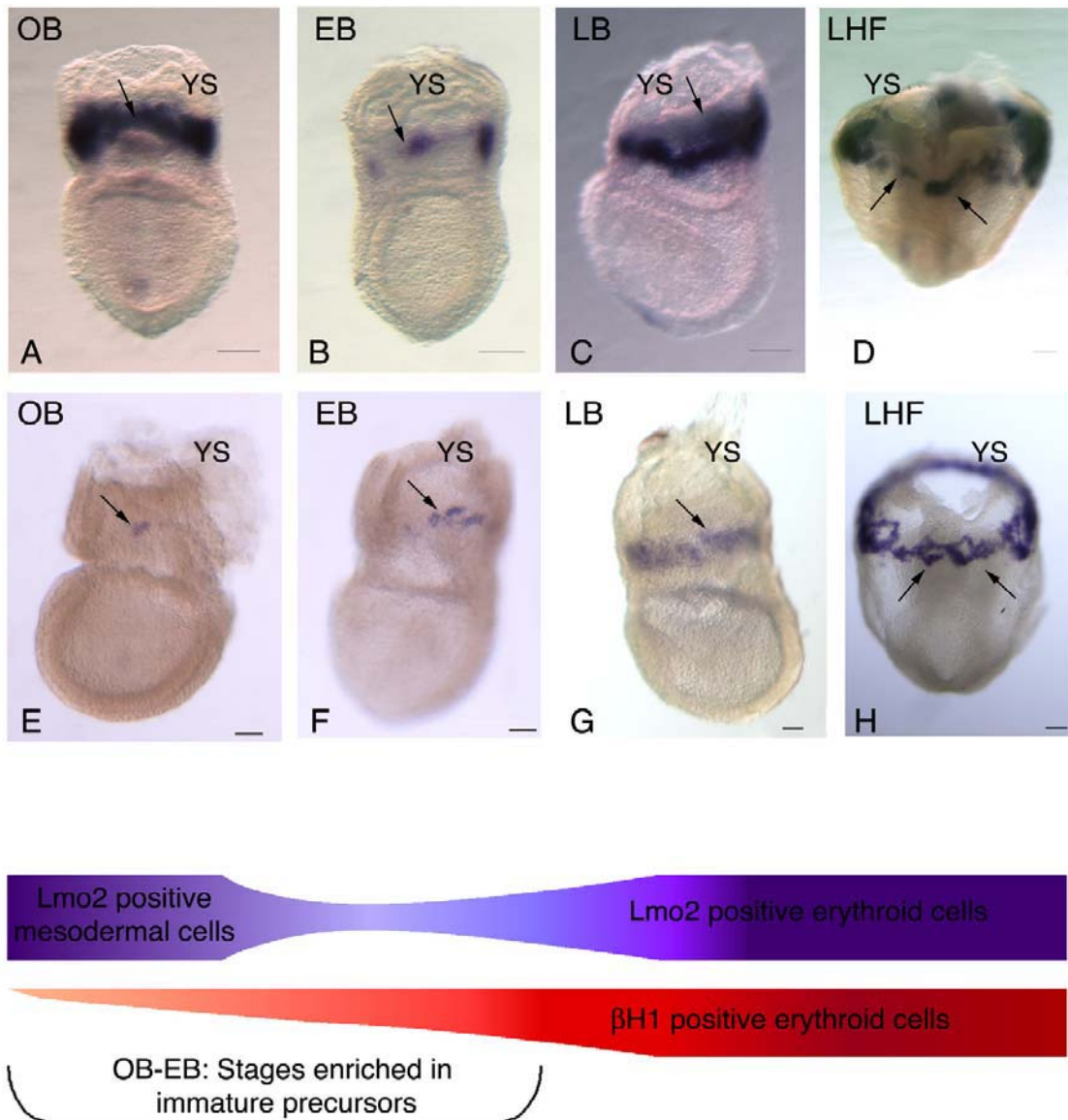


Figure 1

Determination of the development stages enriched in immature precursors. Upper panel: Temporal evolution of Lmo2 expression from the OB to LHF stages: initially expressed by most extra-embryonic mesodermal cells (A), Lmo2 expression rapidly restricts to a smaller cell number at the EB stage (B). Lmo2 expression subsequently expands with the development of blood islands endothelial and hematopoietic cells from LB (C) to LHF (D), and subsequent stages. Middle panel: Transcripts of the embryonic globin β -H1 are present in a minute cell number at the OB/EB stages (E, F). During the following stages (LB: G to LHF: H, and subsequent stages), β -H1 expressing erythroid cells rapidly expand. The arrows in the upper and middle panels point to equivalent zone of the blood islands. Lower panel: The comparative evolution of Lmo2 and β -H1 expressions points to embryos at the OB/EB stages as enriched in immature precursors. Scale bar: 100 μ m.

The electroporation procedure (voltage (V), pulse duration (ms), number of pulses applied and intervals (ms) between two pulses) is critical for the maintenance of tissue integrity and effectiveness of construct delivery.

The choice of the electrode type used, the distance between them and their position regarding the injected site clearly constitute the most important parameters influencing cell targeting.

a-Plasmid delivery

Targeting the YS-mesodermal/pre-hematopoietic precursors, while avoiding endoderm transduction, requires the injection of the construct into the YS cavity, since the mesoderm layer is facing this cavity while endoderm is exposed to the external environment. The embryos are freed from the decidua and Reichert's membrane (Fig. 2A, B) to allow injection. A capillary, back-filled with 1 µg/µl *peGFP-C1* plasmid DNA solution is inserted into the YS cavity from the node region and through the amnios. Fast Green (0.01%) is added to the solution to visualise construct delivery. This injection mode, designed to limit plasmid release from the YS cavity, leads to the collapse of the amnion towards the ectoplacental cavity. Upon mouth driven-release of the plasmid, the amnion returns to its former position and an accurate injection can thus be visualized by the fast green filling of the YS cavity (Fig. 2C, D).

b-Electrode positioning and electroporation parameters

Electroporation allows gene delivery into the specified cell subset provided that the path of the negatively charged DNA towards the positive electrode (anode) is correctly adjusted. Careful examination of wholemount β H1 and *lmo2* *in situ* hybridization patterns allocated the blood islands to the median third of the distance extending from the floor to the roof of the YS-cavity. Following injection, the two electrodes (gold genetrodes 512 from BTX) are thus positioned at each side of the YS (Fig. 2E), parallel to the presumptive blood islands ring.

We used a square-wave pulse generator (ECM830, BTX) to deliver the construct at a low voltage, thus preserving tissue integrity. The best results (efficient electroporation, preservation of explants morphology and recovery of a normal hematopoietic progeny from transfected precursors, see below) are obtained with five 50 ms pulses of 30 V at 500 ms intervals, with a 4 mm distance between the electrodes (Fig. 3). In theory, with such settings, a maximum 40–50% of the blood islands cells might take up the plasmid. In order to increase the targeted area, pulses were applied twice, with an inverted field, using the same parameter set-up. Unfortunately, the gain in the number of transduced cells was annihilated by a decrease in cell viability (Data not shown).

3-Development of electroporated YS-explants during organ culture

When placed in organ culture, YS-explants, both non-electroporated control and electroporated (with or without plasmid), rapidly form a bubble-like (Fig. 4A) structure that mimics YS development. It contains cell clusters similar to those observed in control blood islands (Fig. 4B). Moreover, differentiation along the erythroid (Fig. 4A, B) and endothelial (Fig. 4C, D) lineages normally occurs. After 3 days in organ culture, the explants have progressively organized into a bipolar structure with most mesoderm slightly adhering to the plastic dish, while the endoderm is exposed to the external environment, as shown by the expression of α-foeto-protein (AFP) transcripts, as a visceral endoderm marker [22] (Fig. 4E–H). Within the mesodermal layer, β-H1-expressing erythroid cells are mostly located at the adhering site (Fig. 4I, J see also Fig. 4A, L), while *lmo2*-expressing cells are more largely distributed in the YS-explants (Fig. 4K).

GFP can be visualized in electroporated YS after on average three hours and is still detected after the 3 days of organ culture. In YS explants, GFP⁺ cells are mostly located within the blood islands-like clusters and the adhering site (Fig. 4L–O), which provides a first indication that the prospective blood islands has been accurately targeted.

4-Hematopoietic recovery from electroporated YS-explants kept 3 days in organ culture

a-Characterization of the hematopoietic progeny of transduced cells

We next analysed by flow cytometry the presence of transduced hematopoietic cells in YS-explants immediately after the three days in organ culture (thereafter referred to as OrgD3-YS). The percentage of GFP positive cells represents on average 0,5–1% of the whole OrgD3-YS population (corresponding to 50–100 cells), a percentage classically obtained using unilateral electroporation procedure in mouse embryonic tissues [9,23]. The presence of both *c-kit* and CD45 positive cells within the GFP⁺ subset (Fig. 5A) confirms that mesodermal/pre-hematopoietic cells, capable to give rise to a hematopoietic progeny, were successfully transduced.

In order to assess whether the targeted mesodermal/pre-hematopoietic precursors keep a normal differentiation pathway, we next analysed the differentiation potential of sorted GFP⁺ cells after a 5 days culture on OP9 stromal cells. These cells gave rise to the typical YS progeny, namely *Mac-1*⁺/*CD45*⁺ macrophages and *Ter119*⁺ erythroid cells, and few *c-kit*⁺/*CD45*⁺ precursors (Fig. 5B), indicating that the GFP plasmid was indeed transferred to mesodermal/pre-hematopoietic precursors. Interestingly, GFP is not expressed by their hematopoietic progeny (data not shown), reflecting the non-integrated status, and hence the transient expression, of the transgene.

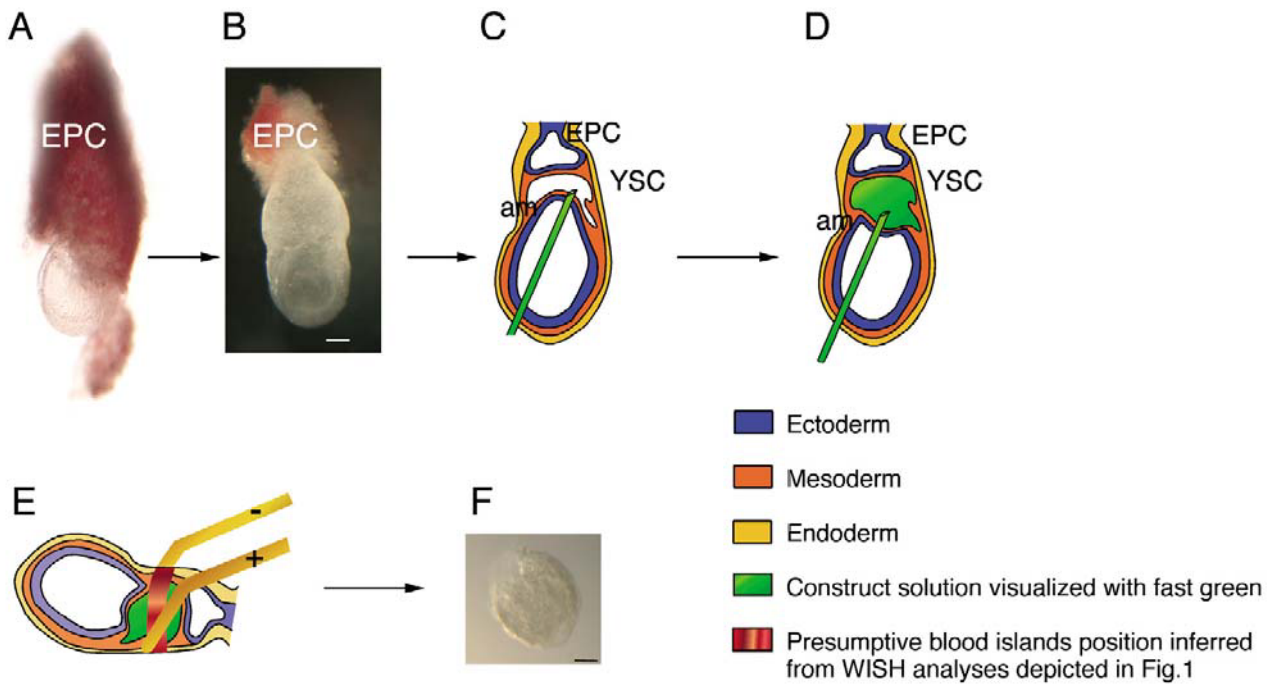
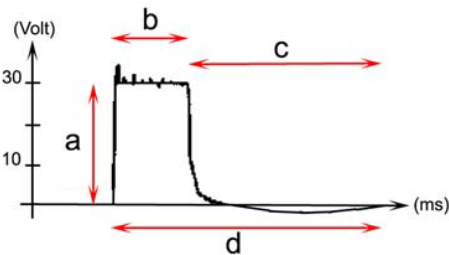


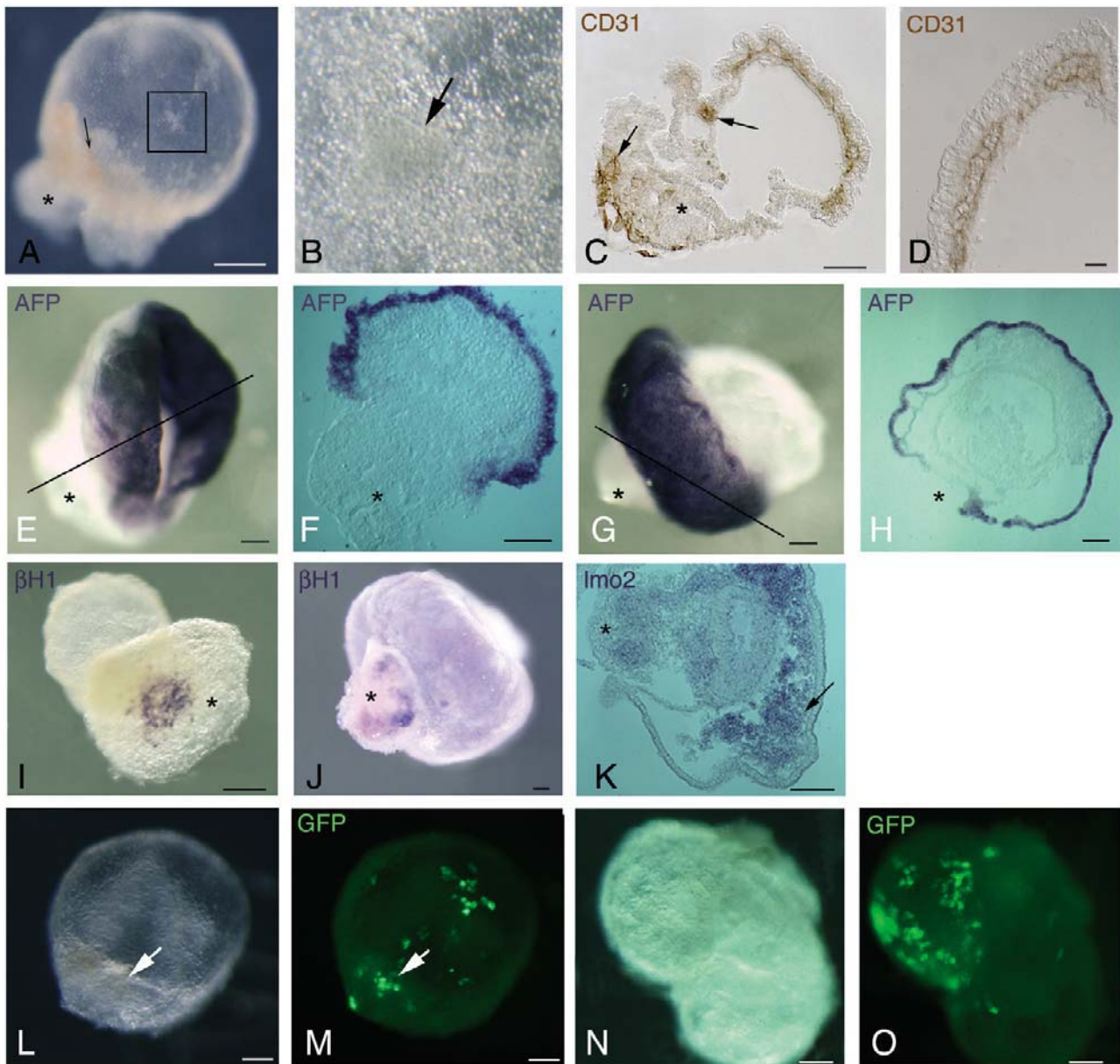
Figure 2
Plasmid injection protocol. Abbreviations: am: amnion; EPC: Ectoplacental cone; YSC: YS cavity OB-EB stage embryos are dissected from the decidua (A). The Reichert membrane is removed, while the EPC is kept in place (B). The plasmid solution is injected into the YSC, from the node region through the amnion (C). Plasmid filling of the YSC is visualised with fast green (D). Prior to pulse application, the electrodes are positioned parallel to the prospective blood islands ring (E). After electroporation, the YS is dissected from the embryo and placed in organ culture (D). Scale bar: 100 μ m.

b



ECM830 + Gold genetropes (BTX)	
a- Pulse intensity (Volt)	30
b- Pulse duration (ms)	50
c- Interval between pulses (ms)	500
d- Number of pulses	5
e- Distance between the electrodes (mm)	4
f- Plasmid concentration (μ g/ μ l)	1

Figure 3
In situ electroporation parameters. Left: Scheme of a square wave pulse delivered during *in situ* electroporation. Right: Optimal parameters used for YS *in situ* electroporation at the OB-EB stages.

**Figure 4**

Cytological analysis of electroporated OrgD3 YS-explants. Abbreviations: AFP: α -foeto-protein; Control non-electroporated YS-explants (A), maintained in organ culture, organise into a "bubble-like" structure that contains a compacted part, at the site adhering to the culture dish (asterisk). Erythroid cells (arrow), differentiated from explanted YS mesoderm, are located close to this adhering site (A). The "bubble-like" part harbours clusters similar to YS-blood islands (B: Enlargement of the square in A), which also contains erythroid cells (arrow). CD31⁺ cells are present in the both in the "bubble-like" structure and adhering site (asterisk) (C). Whereas in the adhering site, the nature of labelled cells (arrows) is unclear, CD31⁺ endothelial cells (D) are clearly present cells in the bubble. In electroporated YS explants, both without (E, F) or with (G, H) plasmid, the endoderm, revealed by AFP wholemount *in situ* hybridization, remains external, but does not cover the whole mesoderm, as shown on the sections of wholemount embryos (F, H) made along the axis shown in E, G. β -HI⁺ erythroid cells (I, control YS and J, electroporated YS) are mostly located at the adhering site (asterisk), while *lmo2*-expressing cells (K, control YS) are distributed either in the adhering site (asterisk) or in close contact with the endoderm (arrow). At the end of the organ culture step, both the blood islands-like clusters and the adhering sites (L, N) display GFP⁺ cells (M, O: same explants as L, N), often in area containing erythroid cells (arrows). Scale bars: 100 μ m, except D: 20 μ m.

Viability of electroporated hematopoietic precursors

The frequency of hematopoietic precursors present in control OrgD3-YS, as well as in OrgD3-YS electroporated without plasmid, was quantified by culture in limiting dilution on OP9 stromal cells for 5 days. In control OrgD3-YS, an average 1 out of 480 cells gives rise to a hematopoietic progeny, which corresponds to about 10–11 precursors per YS (Fig. 5C, Table 1). A similar frequency (1 hematopoietic precursor out of 453 cells) is obtained from OrgD3-YS electroporated without plasmid (Table 1), indicating that our electroporation protocol does not affect the recovery/viability of hematopoietic precursors.

c-Efficiency of the gene transfer into mesodermal/pre-hematopoietic precursors

We next quantified the recovery of hematopoietic precursors derived from transduced mesodermal cells. As stated above, our unilateral electroporation procedure only delivers the construct to at the best 40–50% of the blood islands, corresponding to 5–6 precursors per YS.

Sorted GFP⁺ cells were distributed at 10 or 30 cells per wells on OP9 stromal cells and scored for the presence of a hematopoietic progeny five days later. In five independent experiments, on average 1/150 GFP⁺ cell displayed a hematopoietic potential (Table 1). This value corresponds to a 3-fold enrichment in hematopoietic precursors compared to control OrgD3-YS. This enrichment indicates the presumptive blood islands were accurately targeted during the *in situ* electroporation step. However, the absolute number of GFP⁺ hematopoietic precursors (0.56 ± 0.18 obtained per 0.5 YS-equivalent) remains low (Table 1), even though a hematopoietic progeny is systematically obtained from transduced mesodermal/pre-hematopoietic precursors.

B-Transduction of 8 dpc YS-hematopoietic precursors

I-In situ electroporation

We investigated whether *in situ* electroporation is also efficient to target hematopoietic precursors at later development stages (From EHF stage to the 5-S stage). The same settings were applied to transfer the plasmid to the blood islands. Electroporated YS were kept in organ culture for one day (instead of the 3 days in organ culture for 7 dpc YS, required for the differentiation of mesodermal/pre-hematopoietic precursors) to allow for GFP expression prior to sorting. Flow cytometry analyses, performed immediately after the organ culture step, showed that GFP-expressing cells again represented 0.5–1% of the whole population. Upon sorting and culture on OP9 stromal cells for 5 days, these cells produced a hematopoietic progeny comparable to that obtained from whole control (non-electroporated) YS. These data indicate that *in situ*

electroporation may be used to transduce hematopoietic precursors at 8 dpc.

II-Retroviral transduction

However, at this stage, the blood islands have developed into vessels filled with hematopoietic cells, so that the hematopoietic precursors are diluted amongst erythroid cells (Figure 1D, H). Thus electroporation appears less convenient at this stage while a method ensuring a high efficiency of transduction (with respect to the whole population) would be more adapted. In addition, at 8 dpc, contrary to 7 dpc, blood islands precursors can be directly obtained from dissociated YS. We took advantage of these features to examine whether retroviral transduction would be adapted to efficiently transfer genes into hematopoietic precursors from 8 dpc YS.

I-General scheme of the protocol

Transduction using ecotropic retrovirus has previously been used to transfer HoxB4 into 8 day YS hematopoietic precursors [13]. However, neither quantitative data nor optimization of the various infection parameters was provided.

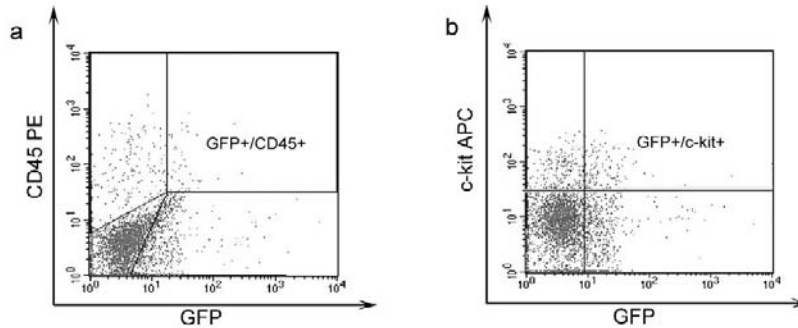
As a first step, the following protocol was designed to target gene to hematopoietic precursors from 8 dpc (0–4 somite stages) YS. In this study, transduction of hematopoietic precursors was obtained using a MSCV-based retroviral vector called MPI. This retroviral vector harbours, as a FACS-selectable reporter, the *eGFP* cDNA downstream a IRES element [24].

We first compared the transduction efficiency attained using freshly isolated YS or YS explants dissociated after one day in organ culture (thereafter referred to as OrgD1-YS). In both conditions, we systematically analysed: 1- GFP level at day 1 post-infection (*i.e.* 24 hours after exposure to the viral supernatant), 2- the persistence of GFP expression in YS-transduced cells during *in vitro* hematopoietic differentiation, 3- the viability and phenotype of the hematopoietic progeny of sorted GFP⁺ cells, 4- the number and the type of hematopoietic cells produced upon *in vitro* culture on OP9 stromal cells or in methylcellulose assay. In both instances (8 dpc YS freshly explanted or maintained in organ culture for one day), all these analyses were performed after GFP⁺ cell sorting at day 1 post-infection.

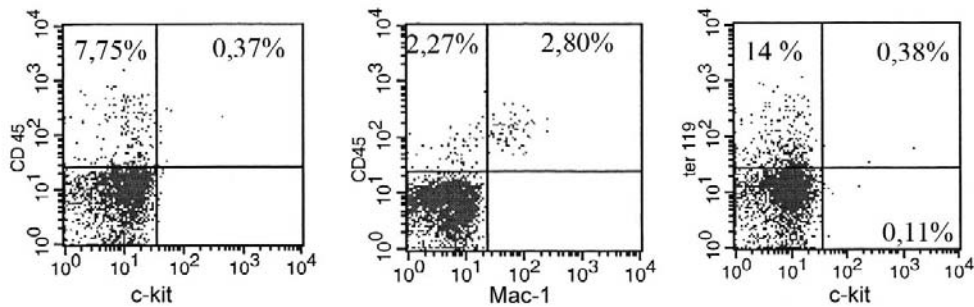
2-Retroviral transduction of 8 dpc YS on freshly isolated cells or after organ culture

In our first tests, we used the MPI retroviral vector to transduce 8 dpc YS directly upon dissection. After dissociation, YS cells are seeded in a 48-well plate in 1 ml medium supplemented with cytokines and 4 µg polybrene (see Materials and Methods). After addition of the retroviral

A Hematopoietic precursors targeting progeny after 3 days in organ culture



B Hematopoietic progeny of sorted GFP+ cells in OP9



C Frequency of hematopoietic precursors in 7 dpc OrgD3-YS

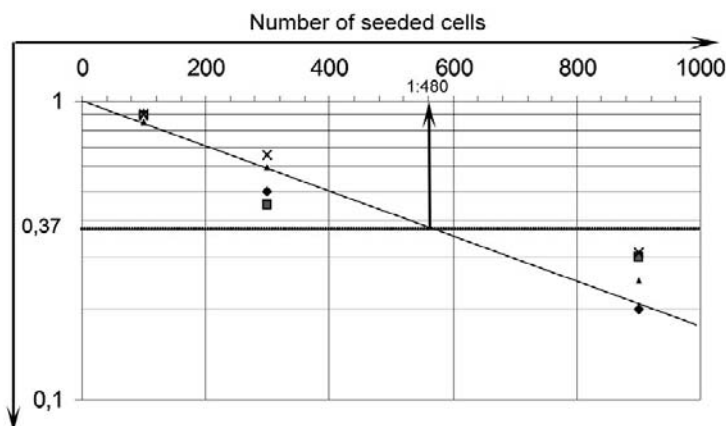


Figure 5

A: Hematopoietic progeny obtained from OrgD3 electroporated YS. GFP⁺ cells display hematopoietic markers indicating that pre-hematopoietic mesodermal cells were targeted. B: GFP⁺ cells sorted from electroporated OrgD3-YS give rise, after a 5 day culture on OP9 stroma, to the hematopoietic progeny typical of the YS, i.e. few precursors (left panel), myeloid (middle panel) and erythroid (right panel) cells. C: Frequency of hematopoietic precursors within OrgD3 control YS (see also Table 1) obtained by limiting dilution assay.

supernatant (MOI = 1), the culture is maintained at 37°C, 5% CO₂ for 12 hours and re-plated in fresh medium and either seeded on OP9 stromal cells or analysed for clonogenic potential in methylcellulose assay. In these conditions, the initial efficiency of transduction is reproducible and quantitatively high (60–70% GFP⁺ cells). However, the GFP⁺ population rapidly decreases in culture to completely vanish after 4–5 days (Fig. 6A). The 8 dpc YS is enriched in terminally differentiated hematopoietic cells and immature erythro-myeloid precursors only appear at the 2–5 somite-stage [25,26]. Accordingly, we suspect that the rapid exhaustion of the GFP⁺ population during the 4 days culture arises as a consequence of the relative maturity of the transduced cells, which therefore rapidly complete differentiation and disappear.

A mean to obtain a larger number of targeted hematopoietic precursors and still avoid cross-contamination by intra-embryonic-derived hematopoietic precursors, is to place the YS, dissected before the 4 somite-stage for one day in organ culture (OrgD1), as previously described [3,4]. Thus, dissociated OrgD1-YS cells were exposed to the retroviral supernatant with the same MOI and cultured as described above. Under these conditions, transduction efficiency is also highly reproducible, but lower (25–30%) than in the former conditions. However, in sharp contrast with the former conditions, the absolute number of GFP⁺ cells increases between 4 and 8 days post-infection (Fig. 6A). Moreover, the percentage of GFP⁺ cells also increases during the culture to reach a maximum (50–60%) at day 4 post-infection (Fig. 6B). Since about 15–20% of GFP-negative cells sorted at day 1 post-infection are shown to acquire GFP expression over the following days in culture (Fig. 6B), the increase in GFP⁺ population between day 1 and day 4 post-infection may result, at least in part, from *de novo* GFP expression. Interestingly, when observed in semi-solid culture, the colonies appear as entirely composed of strongly GFP positive cells, which indicates that the whole progeny of transduced hematopoietic precursors keeps the expression of the transgene (Fig. 6C). The threefold increase in the number of monopotent as well as multipotent clonogenic precursors among the GFP⁺ cells at day 4 compared to that obtained from 8 dpc YS transduced immediately after explantation (Fig. 6D), confirms that inclusion of an organ culture step leads to a transduction of a higher number of hematopoietic precursors. The persistence of GFP expressing cells, when transduced cells derive from OrgD1-YS, thus reflects that the organ culture step indeed improves the targeting of immature precursors.

We therefore focused on the protocol including the organ culture step for further analyses of the hematopoietic phenotype and differentiation potential of transduced cells.

3-Hematopoietic development from YS transduced cells

Flow cytometry analysis of the percentage of 7AAD labelled cells shows no difference in cell viability between infected or non infected YS-cells after one or four days in culture on OP9 stromal cells (Data not shown). In our conditions, the proliferation rate is perfectly equal between transduced and non-transduced cells (Data not shown).

The phenotype of hematopoietic cells recovered from OrgD1-YS at 24 hours post-infection is similar to that of control OrgD1-YS (data not shown). Moreover, the various hematopoietic subsets, both myeloid (CD45⁺) and erythroid (c-kit⁺/Ter 119⁺) are similarly distributed within the GFP⁺ and GFP⁻ populations (Fig. 7A). The fact that the retrovirus-mediated transduction protocol does not disturb hematopoietic differentiation from OrgD1-YS is also evidenced upon phenotype analyses performed at day 4 after culture on OP9 stromal cells, since the relative percentage of erythroid and myeloid cells is not modified in transduced cells compared to normal YS (Fig. 7B).

We coupled the phenotype analyses to *in vitro* clonogenic assay to verify that the differentiation potential of transduced precursors was not modified by the whole procedure. As shown in Fig. 7C, in three independent experiments, the clonogenic potential obtained from sorted GFP⁺ does not significantly differ from that obtained from similar number of OrgD1 control (normal) YS, both at days 1 and 4 post-infection. The clonogenic potential thus correlates with the phenotype analyses performed at the same time points (Fig. 7A,B).

In conclusion, there is no phenotypic as well as differentiation potential bias between GFP⁺ and GFP⁻ cells recovered from Org-D1 transduced YS. Moreover, our results (to be published elsewhere) obtained following retroviral transduction of a candidate gene into Org-D1 YS indicates that insertion of a 2 kb cDNA into the MPI vector: 1- does reduce neither the GFP level nor the percentage of transduced cells, 2- allows the identification of the exogenous protein through Western Blot. This procedure is thus adapted to analyse the effect of candidate gene on YS-hematopoietic cells development.

Discussion

The analysis of the first steps of hematopoietic development historically performed through the study of the yolk sac, is somehow limited by the poor level of available precursors, as well as their extremely fast differentiation. Great progress in the understanding of the development of primitive hematopoiesis was achieved, owing to the ES model, once the similarity of developmental sequence with that which occurs *in vivo* was firmly established [27]. The availability of large number of ES cells, amenable to

Table 1: *In situ* electroporation efficiently delivers the construct to the blood islands

	Frequency of recovered hematopoietic precursors	Number of recovered hematopoietic precursors per YS	Number of experiments
Whole OrgD3-YS	1/475	10-11	4
Whole OrgD3-YS electroporated without plasmid	1/453	10	3
OrgD3-YS GFP ⁺ cells	1/150 (± 57.62)	0.56 ± 0.18 per 0.5 YS (targeted area)	5

Hematopoietic precursor frequency within whole control YS (electroporated without construct) and GFP⁺ cells sorted from electroporated YS-explants were determined through limiting dilution assay.

genetic manipulations, further refined our knowledge of the mechanisms involved (e.g. through invalidated ES cells rescue experiments). Unfortunately, the gathered information cannot be easily placed back to back to similar experiments conducted in the "normal" YS developmental context.

Here we provide two gene transfer protocols, whose combination may allow a thorough study of both early and late events of hematopoietic development in the YS. Thanks to two markers which make it possible to discriminate between mesodermal/pre-hematopoietic (lmo2⁺/β-H1⁻) [17] and their erythroid progeny (lmo2⁺/β-H1⁺), we precisely determined the stage when the YS blood islands are enriched in immature precursors. This expression analysis also allowed to precisely locate the prospective blood islands in intact 7 dpc YS. We next used this delineation to perform *in situ* electroporation, which keeps intact the mesoderm-endoderm interactions shown to be crucial for proper hematopoietic development at these stages [28,29]. This approach was proven here to be effective to target mesodermal/pre-hematopoietic precursors and to be completely compatible with a normal viability and hematopoiesis of the transfected mesodermal/pre-hematopoietic precursors upon organ culture and subsequent *in vitro* culture on OP9 stromal cells. Thus, our work provides for the first time a detailed procedure allowing the analysis of the very early steps (determination) of primitive hematopoiesis. However, although our protocol ensures a significant enrichment of hematopoietic cells in the transfected population (three folds), the overall yield remains low (about 1 transfected mesodermal/pre-hematopoietic precursors per YS) for two reasons: 1- the intrinsic paucity of this precursor type in the 7.5 YS (about 10, after the 3 days in organ culture); 2- the relatively low, albeit usual in related experiments [9,23], level of gene transfer through *in situ* electroporation. Yet, this limitation does not disqualify the procedure since qualitative analyses following transfer of candidate genes can be performed.

A complementary protocol was then provided to transfer gene in « late » (8 dpc) YS which contains numerous determined cells. At this stage, hematopoietic precursors are much less precisely localized than their mesodermal

ancestors, but rather dispersed and diluted among an abundant differentiated (essentially erythroid) progeny. Moreover, the differentiation of these cells is not anymore dependent upon interaction with endodermal cells. We thus reasoned that a « blind » (i.e. non selective) but efficient method would be the most adapted and therefore performed ecotropic retrovirus-mediated gene transfer onto isolated YS cells. A similar strategy has been previously used to express HoxB4 into YS cells at about the same stage [13]. However, neither indication about the efficiency of the method, nor quantitative data were provided. This is of particular importance given that the nature of the transduced gene in this study may confer such a high competitive growth/survival advantage that even a weak efficiency of transduction may have been sufficient. We show here that even for a « neutral » gene (*eGFP*), the transfer through ecotropic retrovirus in 8 dpc YS hematopoietic precursors is very potent, therefore overcoming the problem of precursor dilution. Indeed, over 60% of the YS cells were transduced using a MOI as low as 1. In fact, YS cells appear highly susceptible to retroviral transduction as a very short contact (4-6 hours) with the viral supernatant is sufficient to produce a maximal transduction which therefore minimizes the potential side effects of concentrated viral supernatant or of polybrene, and allows a precise temporal targeting of the beginning of gene transfer. Moreover, we show that including a 24 h organ culture step before exposure to the viral supernatant markedly improves the targeting of immature precursors. This may result from an increased precursor frequency, as evidenced by the higher recovery of clonogenic precursors obtained when GFP⁺ cells are sorted from OrgD1-YS. As a consequence, even though the protocol that includes an organ culture step leads to a lower percentage of transduced cells, GFP⁺ cells steadily increase from day 4 post-infection, while they rapidly vanish when recovered from freshly transduced YS. Further analysis of the hematopoietic progeny of transduced cells is therefore easier under these conditions. Confirming the high permissiveness of YS cells to retroviral transduction, we found that a MPI vector carrying a 2 kb cDNA is almost as efficient as the empty one at transducing OrgD1-YS hematopoietic precursors.

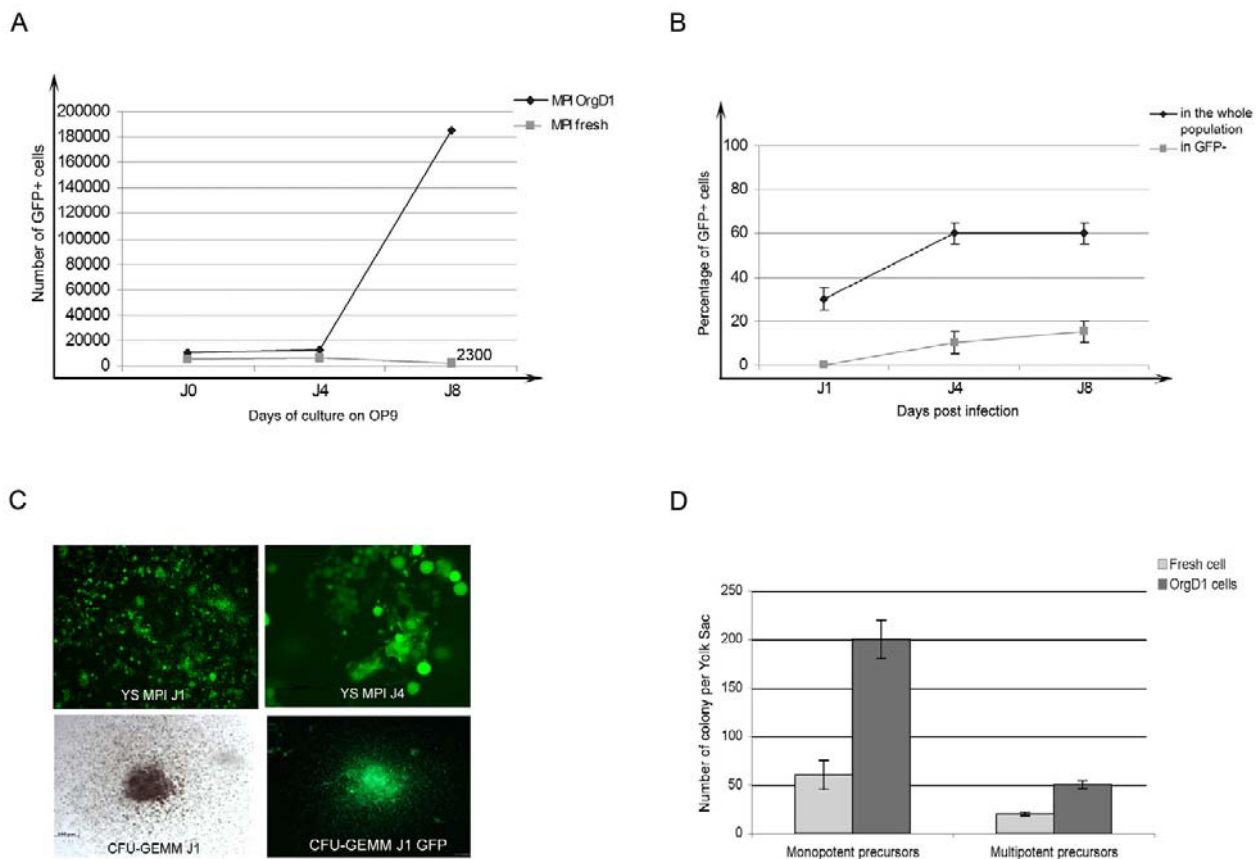


Figure 6

A: Compared evolution of cell production obtained from GFP⁺ cell sorted from 8 dpc YS infected upon explantation (between bracket: number of cells recovered at day 8), or after one day in organ culture. B: Evolution of GFP expression in the whole population or in GFP⁻ cells sorted from transduced 8 dpc OrgD1-YS after culture on OP9 stromal cells. A steady state GFP expression is attained at day 4 post-infection. Moreover, GFP expression is acquired, during culture, by a subset of GFP⁻ sorted cells. C: GFP expression in transduced OrgD1-YS cells (top panel left) persists in sorted GFP⁺ cells cultured on OP9 stromal cells (top panel right). The colonies generated by transduced cells also remain entirely GFP⁺ (bottom panel).

As for *in situ* electroporation of 7 dpc YS, the recovery, survival and differentiation potentials of retrovirally transduced YS cells appear undistinguishable from that of non-transduced cells. Thus, retroviral transduction appears as a very convenient way to genetically modify hematopoietic precursors from 8 dpc YS.

Two potential problems, however, limit the use of retroviral transduction:

1- in our conditions, 7 dpc YS cells (i.e. containing mesodermal/pre-hematopoietic precursors cells), which are amenable to gene transfer by *in situ* electroporation, appear almost totally refractory to retroviral transduction. The reason for this pitfall is unknown, but we suspect that, at this early development stage, mesodermal cells have

not yet reached some degree of commitment/differentiation that allows retroviral transduction. Indeed, 7 dpc YS mesodermal/pre-hematopoietic precursors become efficiently transduced after a two days of organ culture, which essentially recapitulates their *in vivo* progression toward committed precursors.

2- Retroviral vector are stably integrated, and therefore transduced cells are indelibly genetically modified. This is confirmed by the expression of GFP after at least two weeks of culture (latest time point analysed) in retrovirally transduced cells from late YS. In contrast while GFP is still detectable in electroporated cells from 7 dpc YS after 4 days, it completely vanished a few days later. In view of this limitation, we show that our *in situ* electroporation protocol transduce hematopoietic precursors from

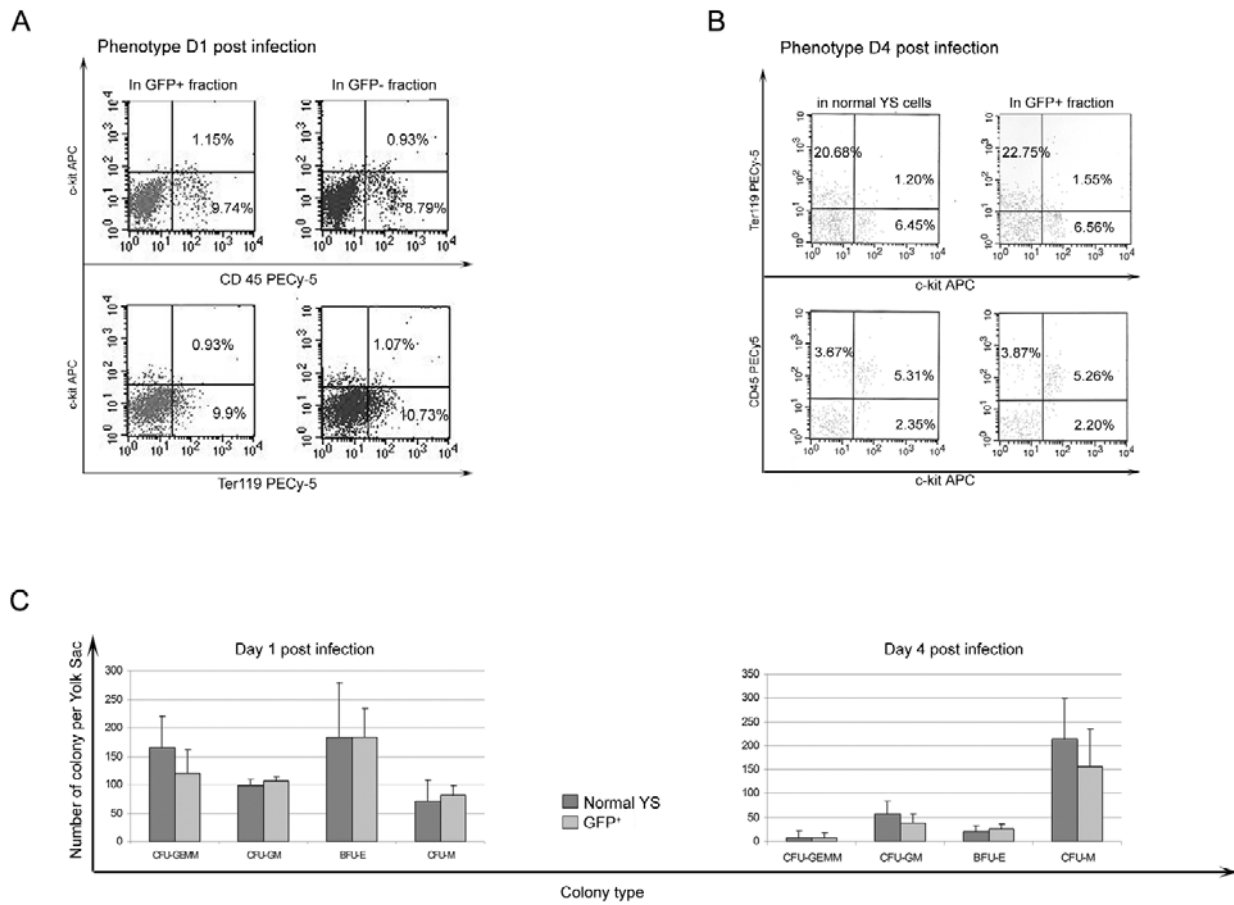


Figure 7
Hematopoietic development from transduced cells. A: Comparison of the clonogenic potential of GFP⁺ cells sorted at day 4 post-infection from YS infected upon explantation or after one day in organ culture. B: Phenotype analyses of OrgDI-YS infected cells cultured for 1 day on OP9 stromal cells, show that erythroid (Ter199⁺) and myeloid (CD45⁺) cells are identically distributed within GFP⁺ and GFP⁻ subsets. C: At day 4 post infection, the distribution of erythroid (Ter199⁺) and myeloid (CD45⁺) cells within the GFP⁺ population is similar to that obtained from normal YS (never exposed to viral supernatant). D: Clonogenic assays, performed at day 1 (left panel) and 4 (right panel) post-infection, indicate that the transduction procedure does not modify the type and numbers of precursors recovered.

8 dpc YS and thus deserves to be used notably if a transient expression is needed. Note that a 4 days expression may appear somewhat long with respect to the accelerated dynamic of embryonic events, especially in the case of early hematopoiesis. However, given the intense proliferation of early YS cells, we suspect that the plasmid delivered by *in situ* electroporation is in fact rapidly diluted so that the expression of labile proteins will be expected to be more really « transient » than that of GFP, whose half life exceeds 24 hours.

Conclusion

In summary (Table 2), we provide and detail here two complementary methods to transfer genes in YS cells, at the earliest stages of hematopoietic development (7–8 dpc). We studied the influence of several parameters and hence determined the most convenient for either early (mesodermal/pre-hematopoietic) and late (hematopoietic) precursor transduction. These two methods can be used to either enforce (as exemplified here) or knock-down (through vectorized siRNA) the expression of potentially important genes. They are thus likely to

increase our knowledge of the mechanisms giving rise to primitive hematopoiesis and to understand the molecular basis underlying its limited potency, when compared to true HSC from the AGM or adult BM.

Methods

1-Mice and isolation of embryo

All animal experiments were conducted in compliance with French and European regulations. Balb/c or C57BL/6 males are crossed with females to generate embryos and the morning of the vaginal plug observation is considered as 0.5 dpc. Pregnant females are sacrificed by cervical dislocation. Embryos at 8 dpc are staged by somite counting. Presomitic embryos are staged according to the development of the allantois bud: OB (No Bud), EB (Early Bud) and LB (Late Bud) [30].

2-Isolation and organ culture of 7 and 8 dpc Yolk Sacs

Embryos from OB to EB stages, used for *in situ* electroporation, are collected in Hanks balanced salt solution (HBSS: Invitrogen), and after removal of the Reichert membrane (the ectoplacental cone being preserved), they are injected with the plasmid solution as described below. After injection and pulse application, the extra-embryonic compartment is removed with ultra-fine forceps and maintained in organ culture as described below. From 8 dpc, the YS used for retroviral infection, are directly explanted from the embryos.

YS explants are transferred into 6-well plates (TPP) containing "Complemented OptiMEM medium", i.e. OptiMEM with Glutamax (Invitrogen), 10% Fetal Calf Serum (Hyclone), 1% Penicillin-streptomycin (Invitrogen) and 0.1% β -mercaptoethanol (Invitrogen), and are kept in culture at 37°C, 5% CO₂ for 1 (8 dpc) or 3 (OB and EB stages) days, before analyse (OB and EB stages) or retroviral infection (8 dpc). Prior to further processing, YS-explants are dissociated by gentle pipeting and filtered to obtain a single cell suspension.

3-In situ Electroporation

For *in situ* electroporation, we use the pGFP-C1 vector (Clontech), in which the cytomegalovirus (CMV) promoter drives the expression of the GFP reporter protein.

To visualise plasmid solution delivery, 0.01% Fast Green is added to 1 μ g/ μ l pGFP-C1 plasmid DNA. Borosilicate standard wall (1.0 mm O.D./0.58 mm I.D.) glass capillaries (Harvard Apparatus) are pulled and filled with DNA/Fast Green solution for injection.

After dissection, the plasmid solution is injected in the YS cavity as described in Fig. 2, and embryos are placed in a Petri dish, in HBSS. To accurately target the presumptive blood islands, OB-EB embryos are oriented so that the

caudal half part of the visceral YS is facing the anode. The two gold genetrodes (BTX Instrument Division Ref 512) are positioned parallel to the presumptive blood islands, and pulses are applied using a square-wave pulse generator (Electro Square Porator ECM 830, BTX Instrument Division; San Diego, CA, USA).

4-Retroviral infection of 8 dpc YS

Production of ecotropic retroviral supernatants

We used for retroviral transduction a MSCV-based retroviral vector, called MPI [24]. HEK 293T cells (4×10^6 cells; 30–40% confluence) are seeded in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% Penicillin-streptomycin (Invitrogen), in 150 mm culture dishes. The following day, the MPI expression vector (6.4 μ g) is co-transfected with 3.2 μ g pHCMV-intron GagPol and 3.2 μ g FB-MO-SALF [31] helper plasmids, encoding the MLV gag-pol and ecotropic env proteins, respectively, using Fugene 6 (Roche), as transfection reagent, to produce retroviral particles. Viral supernatants are collected twice a day, from 24 h to 72 h post-transfection, filtered (0.45 μ m) and concentrated on Centrifugal Filter Devices (Centricon®Plus-20 from MICON Bioseparation). Concentrated supernatants are distributed into 30 μ l aliquots, kept frozen at -80°C. Titration is performed by transducing mouse 3T3 fibroblasts (plated at 10^5 cells per well in 6-wells plates) in exponential growth phase with 5 μ l concentrated supernatant in the presence of 4 μ g/ml polybrene. Cells are analysed for GFP expression 4 days post exposition to the viral supernatant, by flow cytometry using a FacsCan (Becton Dickinson). Typically, the titre of concentrated supernatants is 7×10^6 - 10^7 viral particles per ml.

Retroviral transduction conditions

Ten dissociated YS explants (about 10^5 cells) are seeded in 48 well-plates containing 1 ml "Complemented OptiMEM medium", further supplemented with Flt3-ligand (20 ng/ml), Stem Cell Factor (100 ng/ml), EPO (10^3 U/ml) and 4 μ g polybrene. Viral supernatant is added to obtain one retroviral particle per cell (MOI = 1) during 12 hours. After infection, transduced cells are transferred on OP9 stromal cells and cultured as described below. Interestingly, a 25–30% transduction efficiency is achieved on OrgD1-YS, either with a 24 hours or a shorter (4 or 6 hours) exposure to the retroviral supernatant.

5-Expression analyses

In situ hybridization

YS explants, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C and rinsed with PBS, are hybridized with riboprobes at 65°C, as previously described [32]. Digoxigenin (DIG)-labelled antisense RNA probes are obtained from PCR fragments subcloned into expression vectors (β H1, provided by I. Max-Audit: 250 bp subcloned into pCR™; Lmo-2 constructed by V. Lemarchandel: 450 bp

Table 2: Assets and limitation of *in situ* electroporation and retroviral transduction to target YS blood islands precursors

	<i>In situ</i> electroporation		Retroviral transduction	
	Asset	Limitation	Asset	Limitation
7–7.5 dpc: Mesodermal/pre-hematopoietic precursors	- Transient - Layer specific delivery - Spatial control of delivery	- Reduced number of precursors available for transduction		- Causes extensive cell death - Refractory to transduction ?
Application	Only possible method		Unsuitable at this development stage	
From 7.5–8 dpc: Hematopoietic precursors	- Transient - Layer specific delivery - Spatial control of delivery	- Only a fraction of the YS blood islands is targeted	- Easy - All hematopoietic precursors may be transduced	- Does not allow layer specific targeting
Application	- Transient transgene delivery - Possible layer specific delivery. - Possible delivery of SiRNA or proteins		- Sustained expression of the transgene - Possible delivery of ShRNA	

Hematopoietic precursor frequency within whole control YS (electroporated without construct) and GFP⁺ cells sorted from electroporated YS-explants were determined through limiting dilution assay.

subcloned into pBSKII and α -foeto-protein (AFP) provided by L. Robb: 845 bp subcloned into pBSKII) and synthesized using the DIG RNA Labelling Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). To obtain cryostat sections of hybridized samples, YS explants are fixed (4% paraformaldehyde, 4% sucrose, 0.12 M CaCl₂, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, H₂O), embedded in 0.12 M phosphate buffer, 7.5% gelatin, 15% saccharose and frozen in liquid nitrogen. Embedded embryos are sectioned at 10–15 μ m and transferred to Superfrost slides.

Immuno-histochemistry

Cryostat sections of YS explants, prepared as described above, are incubated first with 0.3% H₂O₂ to block endogenous peroxydase activity, then in PBS, 10% fetal calf serum (2 hours at room temperature) to prevent non specific antibody binding. Samples are incubated with purified Rat anti-Mouse CD31 (clone MEC13.3, Pharmingen) overnight at 4°C, followed by incubation with biotinylated-Goat anti-Rat (DAKO), as secondary antibody for 1 hour at room temperature and Streptavidine-horseradish peroxydase complex (VECTOR) for 30 Min. at 37°. Peroxydase activity is revealed by exposure to its diaminobenzidine substrate. Sections are mounted in Glycergel (DAKO) and photographed using DIC optics.

6-Microscopy and photography

Samples are observed either on a Fluorescence-equipped Olympus SZX12 stereomicroscope (wholemount *in situ* hybridized or electroporated YS) or on a Zeiss Axioplan microscope (YS-explants sections). Images are acquired respectively with the DP50 Olympus digital camera (Analysis software) or Zeiss AxioCam MRc (Axiovision 4.3 soft-

ware). Images are further processed with the Adobe Photoshop CS software.

7-Analysis of hematopoietic cell production

Culture on OP9 stromal layer

Cells are seeded on OP9 stromal cells (from S.-I. Nishikawa and T. Nakano, Riken Center for Developmental Biology, Kobe, Japan), in "Complemented OptiMEM medium", further supplemented with Flt3-ligand, Stem Cell Factor and EPO, and cultured as described in [32]. At various culture time points, cells are analysed by flow cytometry or submitted to clonogenic assays.

Clonogenic assay

Cells recovered after 1 or 4 days from the culture on OP9 stroma, are assayed for the presence of colony-forming units, by seeding 3000 cells per 30 mm culture dish, in triplicate, in 1 ml methylcellulose medium (M3234; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with cytokines (50 ng/ml Stem Cell Factor, 10 ng/ml Il-3, 10 ng/ml Il-6, 3 U/ml EPO and 10 ng/ml TPO). After 3 to 7 days at 37°C, colonies are scored based on their morphology on an inverted microscope.

Flow Cytometry Analyses and cell sorting

Cells are analyzed on a FACS Sort (Becton-Dickinson) as previously described [32], and FACS data are analyzed with CellQuestPro software (Becton-Dickinson).

The following antibodies (all from Pharmingen) are used to reveal the presence of lineage-specific surface markers: CD45 (Clone 30-F11), CD31 (Clone MEC 13.3) and Mac-1 (Clone M1/70) for myeloid cells, Ter119 (Clone Ly-76)

for erythrocytes. Cell sorting was performed with a FACS Diva cell sorter (Becton-Dickinson).

Abbreviations

AGM: Aorta-Gonad-Mesonephros; EB: Early allantoic Bud stage; LB: Late allantoic Bud stage; LHF: Late Head Fold stage; HSC: Hematopoietic Stem Cell; LTR: Long Term Reconstitution (capacity); OB: No allantoic Bud stage; Sp: Splanchnopleura; YS: Yolk Sac.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

IG conceived the project. IG and OA supervised the project. IG, OA and SG designed experiments, analysed the results and wrote the manuscript. PM assisted in experimental design. SG carried out most of the experimental work. CA-L and YL participated significantly to data acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Michèle Klaine for expert assistance with embryos preparation, F. Larbret for cell sorting and the staff from IGR's "SCEA" animal facility for mice husbandry. This work is supported by grants from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (grant n°3552) and Institut Gustave Roussy (CRI grant X74487). SG is supported by the "Association pour la Recherche sur le Cancer".

References

- Godin I, Cumano A: **The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2(8)**:593-604.
- Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A: **Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and para-aortic splanchnopleura in mouse embryo, beginning at 8.5 days postcoitus.** *Proc Natl Acad Sci Usa* 1995, **92(3)**:773-777.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I: **Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura.** *Cell* 1996, **86(6)**:907-916.
- Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, Godin I: **Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution.** *Immunity* 2001, **15(3)**:477-485.
- McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J: **Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo.** *Blood* 2003, **101(5)**:1669-1676.
- Bertrand JI, Manaia A, Van Celst J, Cumano A, Godin I: **Origin and fate of hematopoietic precursors in the early mouse embryo.** In *Hematopoietic Stem Cell Development* Edited by: Cumano IGA. Georgetown, New York, Landes Kluwer dual imprint; 2006:108-123.
- Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Fukazawa T, Chen Y, Navarro-Alvarez N, Tanaka N: **Gene delivery to embryonic stem cells.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005, **75(1)**:10-18.
- Muramatsu T, Mizutani Y, Ohmori Y, Okumura J: **Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **230(2)**:376-380.
- Quinlan JM, Yu WY, Hornsey MA, Tosh D, Slack JM: **In vitro culture of embryonic mouse intestinal epithelium: cell differentiation and introduction of reporter genes.** *BMC Dev Biol* 2006, **6**:24.
- Davidson BP, Tsang TE, Khoo PL, Gad JM, Tam PP: **Introduction of cell markers into germ layer tissues of the mouse gastrula by whole embryo electroporation.** *Genesis* 2003, **35(1)**:57-62.
- Tam PPL, Khoo PL, Wong N, Tsang TE, Behringer RR: **Regionalization of cell fates and cell movement in the endoderm of the mouse gastrula and the impact of loss of Lhx1(Lim1) function.** *Developmental Biology* 2004, **274(1)**:171-187.
- Pierreux CE, Poll AV, Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG: **Gene transfer into mouse prepancreatic endoderm by whole embryo electroporation.** *Jop* 2005, **6(2)**:128-135.
- Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ: **HoxB4 Confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors.** *Cell* 2002, **109(1)**:29-37.
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MBL, Evans MJ, Smith AJH, Rabbits TH: **The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein Rbtn-2 is essential for erythroid development.** *Cell* 1994, **78**:45-57.
- Yamada Y, Warren AW, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbits TH: **The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:3890-3895.
- Silver L, Palis J: **Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis.** *Blood* 1997, **89(4)**:1154-1164.
- Manaia A, Lemarchandel V, Klaine M, Max-Audit I, Romeo P, Dieterlen-Lievre F, Godin I: **Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites.** *Development* 2000, **127(3)**:643-653.
- Bachnou N, Laudet V, Jaffredo T, Quatannens B, Saule S, Dieterlen-Lievre F: **Cooperative effect of v-myc and v-erbA in the chick embryo.** *Oncogene* 1991, **6(6)**:1041-1047.
- Furuta C, Ema H, Takayanagi S, Ogaeri T, Okamura D, Matsui Y, Nakauchi H: **Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo.** *Development* 2006, **133(14)**:2771-2779.
- Itasaki N, Bel-Vialar S, Krumlauf R: **'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression.** *Nat Cell Biol* 1999, **1(8)**:E203-E207.
- Swartz M, Eberhart J, Mastick GS, Krull CE: **Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations.** *Dev Biol* 2001, **233(1)**:13-21.
- Dziadek MA, Andrews GK: **Tissue specificity of alpha-fetoprotein messenger RNA expression during mouse embryogenesis.** *Embo J* 1983, **2(4)**:549-554.
- Nakamura Y, Yamamoto M, Matsui Y, Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Scholer HR: **Introduction and expression of foreign genes in cultured mouse embryonic gonads by electroporation Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice.** *Reprod Fertil Dev* 2002, **14(5-6)**:259-265.
- Martin P, Albagli O, Poggi MC, Bouloukos KE, Pognonec P: **Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity.** *BMC Biotechnol* 2006, **6**:4.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G: **Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse.** *Development* 1999, **126(22)**:5073-5084.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I: **Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac.** *Blood* 2005, **106(9)**:3004-3011.
- Wiles MV, Keller G: **Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture.** *Development* 1991, **111(2)**:259-267.
- Belaoussoff M, Farrington SM, Baron MH: **Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo.** *Development* 1998, **125(24)**:5009-5018.
- Palis J, McGrath KE, Kingsley PD: **Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants.** *Blood* 1995, **86(1)**:156-163.
- Downs KM, Davies T: **Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope.** *Development* 1993, **118**:1255-1266.
- Lavillette D, Maurice M, Roche C, Russell SJ, Sitbon M, Cosset FL: **A proline-rich motif downstream of the receptor binding**

- domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. *J Virol* 1998, **72**(12):9955-9965.**
32. Bertrand JY, Giroux S, Cumano A, Godin I: **Hematopoietic stem cell development during mouse embryogenesis.** *Methods Mol Med* 2005, **105**:273-288.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Résultats 2^{ème} partie

Article n°2

Analyse fonctionnelle de facteurs impliqués
dans l'émergence des précurseurs
hématopoïétiques de l'embryon de souris

(en préparation)

**L'expression ectopique de GATA-3 dans le Sac Vitellin
maintient et amplifie un contingent de précurseurs
hématopoïétiques immatures**

S. Giroux , M. Klaine, Y. Lecluse, O. Albagli, I. Godin

J'ai volontairement choisi de ne pas détailler le rôle et la structure des facteurs de transcription de type GATA dans le paragraphe consacré aux bases moléculaires de l'hématopoïèse embryonnaire. En effet, cette partie était essentiellement dédiée à la description de facteurs importants pour la spécification du mésoderme vers la voie hématopoïétique. En avant-propos de l'introduction sur mon travail concernant la surexpression du facteur GATA-3 dans le SV de souris, je me propose de faire une présentation plus détaillée de ces facteurs. Cette présentation s'articulera en deux parties. La première concernera les facteurs GATA dit « endodermiques-cardiaques » (GATA-4, GATA-5 et GATA-6), et la seconde sera consacrée aux facteurs GATA hématopoïétiques (GATA-1, GATA-2 et GATA-3). Nous verrons que l'expression et la fonction de chacune des six protéines sont fonction, non seulement du tissu ou de la cellule concernée, mais aussi du stade de développement où elles agissent.

L'objectif principal sera de mettre en évidence que les facteurs GATA (hématopoïétiques et endodermiques-cardiaques) peuvent être impliqués dans deux fonctions principales : 1) La spécification de lignage au cours de l'ontogenèse, 2) La différenciation terminale au sein d'un lignage particulier. Ceci nous permettra de reconstituer progressivement la démarche intellectuelle qui nous a amené à tester les effets de l'expression ectopique de GATA-3 dans le sac vitellin d'embryon de souris.

I/ Introduction

a) Les facteurs de transcription de type GATA

Les protéines GATA sont des facteurs de transcription qui assurent leur fonction le plus souvent par l'intermédiaire d'interactions directes ou indirectes avec des co-facteurs qui, le plus souvent, coordonnent la fenêtre d'expression de gènes cibles, soit en agissant comme co-activateur ou comme répresseur (FOG-2, Nkx2.5, lmo2...).

Chez les vertébrés supérieurs, depuis la caractérisation initiale de GATA-1 (Wall et al., 1988), cinq autres facteurs GATA ont été décrits. Les membres de cette famille peuvent être classés en deux sous-familles correspondant grossièrement à leur profil d'expression. GATA-1, 2 et 3 sont exprimés essentiellement dans les lignées hématopoïétiques (Weiss and Orkin, 1995), alors que GATA-4, 5 et 6 le sont dans d'autres tissus, majoritairement dans le cœur, le poumon, l'intestin et le cerveau (Molkentin, 2000).

Mode d'action des facteurs GATA : Les facteurs GATA sont des protéines modulaires, comportant un domaine de transactivation amino-terminal et deux doigts de zinc. Le doigt carboxy-terminal (C-finger) assure la fixation à l'ADN, et le doigt amino-terminal (N-finger)

aurait une fonction de stabilisation. Cette structure en doigts de zinc représente l'élément conservé à travers l'évolution (Lowry and Atchley, 2000), alors que les séquences en acides aminés situées de part et d'autre des doigts ont largement divergé (Orkin, 1992; Yamamoto et al., 1990) (Figure 1A).

Les doigts de zinc sont de petits domaines protéiques qui requièrent la coordination d'un ou plusieurs atomes de zinc pour stabiliser leur repliement. La structure est en général constituée de deux feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α (Figure 1B). Un atome de zinc est chélaté par des résidus histidine et cystéine, et cet ion Zn^{2+} permet de stabiliser le motif sous une forme caractéristique en doigt de gant. Ces motifs particuliers sont des structures de reconnaissance de l'ADN (Laity et al., 2001). En fonction de la nature des acides aminés qui les composent (hors les cystéines et les histidines liant l'atome de zinc), une séquence spécifique d'ADN sera reconnue. Le motif tire alors son nom de la boucle d'acides aminés qui dépasse du site de liaison de l'ion-zinc et est décrit comme le doigt Cys2/His2. Il existe plusieurs types de doigts de zinc, caractérisés par leur composition :

1) Type C2H2 : Ce sont des motifs composés de 25-30 acides aminés qui contiennent deux cystéines et deux histidines qui forment les 4 ligands de coordination d'un atome de Zinc. Ils sont impliqués dans la formation de séquences de fixation à l'ADN de nombreux facteurs de transcription. La liaison à des ARN ou à d'autres protéines est également possible.

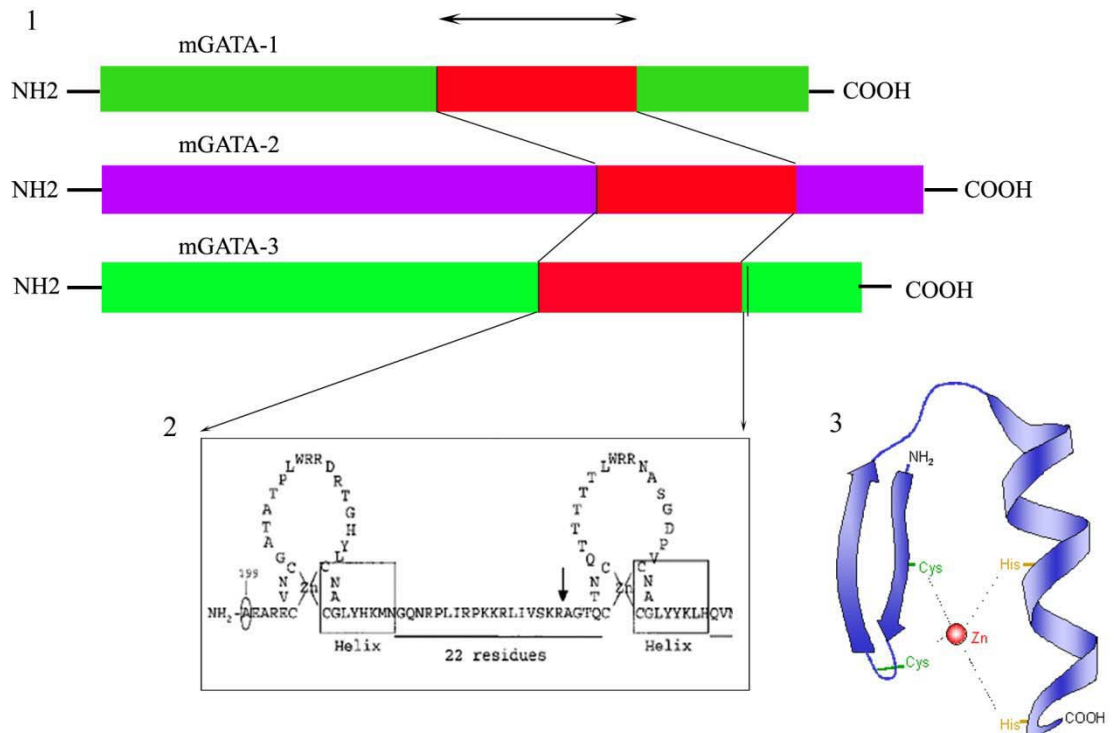
2) Type C3HC4 (appelé aussi RING) : Ce sont des motifs observés dans de nombreuses protéines eucaryotes et virales et composé de 40-60 acides aminés.

3) Type C4 : Ils contiennent 4 cystéines qui lient le Zinc et sont très généralement retrouvés dans des récepteurs nucléaires comme les RAR (Rétinoïdes...). Les protéines à doigts de zinc de type GATA possèdent deux doigts de zinc au motif C4 (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys) qui interagissent avec les séquences nucléiques observées dans la séquence de régulation de nombreux gènes. Le nom donné aux protéines GATA correspond au fait qu'elles se fixent au niveau de séquence consensus de type : (A/T)**GATA**(A/G) pour transactiver différents types de promoteurs (Ko and Engel, 1993; Merika and Orkin, 1993) (Figure 1C).

Les gènes codant les facteurs GATA contiennent en général deux premiers exons non traduits et cinq exons codant la protéine. Les deux premiers exons sont responsables de l'expression de la protéine dans un tissu spécifique. L'utilisation différentielle de ces deux premiers exons est bien documentée dans le système hématopoïétiques (Ito et al., 1993) (Minegishi et al., 1998) (Asnagli et al., 2002). On sait par exemple que GATA-2 n'est pas exclusivement exprimé dans le système hématopoïétique, puisqu'il est détecté dans le cerveau, dans l'appareil génital, les cellules endothéliales et le muscle cardiaque. Le premier exon

proximal de GATA-2 (exon IG) est utilisé indifféremment pour tous les types de tissus, alors que l'exon distal (exon IS) est plus particulièrement impliqué dans les tissus hématopoïétiques et nerveux (Minegishi et al., 1998) (Pan et al., 2000).

Figure 1: Structure des facteurs GATA hématopoïétiques :



feuilletés mésodermique et ectodermique (Fujikura et al., 2002). Néanmoins, cette activité semble restreinte aux seules cellules ES, puisque la surexpression de GATA-4 dans des cellules de carcinomes embryonnaires permet la différenciation de dérivés mésodermiques (cardiomyocytes). GATA-6 est également indispensable au développement de certains dérivés endodermiques qui permettent la formation de l'épithélium pulmonaire. Chez la souris, GATA-4 est le seul facteur GATA dont l'expression dans la crête génitale coïncide avec celle du gène *Sry* (Viger et al., 1998). Il est détecté à 11.5 jdg dans les gonades indifférenciées et son expression se maintient plus tard dans le noyau des cellules de Sertoli nouvellement différenciées.

Le rôle central de GATA-5 dans la formation de l'endoderme a été suggéré d'après des expériences réalisées chez le poisson zèbre et le Xénope. Chez le poisson zèbre, GATA-5/*faust* est exprimé dans des territoires cellulaires qui à l'issue de la gastrulation donneront à la fois de l'endoderme et du mésoderme (mesendoderme). Chez le Xénope également, les cellules qui expriment ce facteur (GATA-5) contribuent à la formation d'endoderme. La capacité du facteur GATA-5 à activer les gènes responsables de l'induction de l'endoderme dépendrait d'une signalisation médiée par Nodal (Stainier, 2002).

Chez la levure, les champignons, mais aussi que chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, des protéines homologues aux facteurs GATA des vertébrés ont été identifiées, témoignant d'un extrême degré de conservation au cours de l'évolution. Les expériences de gain/perte de fonction dans ces modèles soulignent l'importance des protéines GATA dans la spécification embryonnaire précoce. Chez la drosophile, l'expression du gène *pannier* est initiée par un signal de type décapentaplegic (*dpp*) (Herranz and Morata, 2001). Ce facteur participe alors à la formation d'un complexe protéique composé des facteurs *Chip* et *achaete/scute-daughterless*, permettant ainsi de réguler les informations sur la position des soies sensorielles (Ramain et al., 2000). Chez le nématode *C. Elegans*, les facteurs GATA (*elt*) sont principalement exprimés dans l'épiderme. Le plus important, *elt-1* code pour un facteur possédant deux doigts de zinc (les autres n'en possédant qu'un seul). Il joue un rôle crucial dans la spécification de la plupart des cellules de l'hypoderme (Gilleard and McGhee, 2001).

Rôle dans la différenciation cellulaire : Au cours du développement, le facteur GATA-4 est essentiel au maintien du phénotype cardiaque, et il est requis pour la différenciation et la survie des cardiomyocytes (Peterkin et al., 2005). L'inactivation génique du gène GATA-4 conduit à une létalité embryonnaire (7-9,5 jdg) consécutive à l'absence de formation du tube cardiaque (Kuo et al., 1999; Molkenin, 2000). GATA-4 est également impliqué dans la réponse à l'hypertrophie cardiaque. L'activation des voies Rho-A/ROCK-1 et MAP-kinase induisent la phosphorylation de ses domaines amino- et carboxy-terminaux, permettant ainsi la transcription

de gènes impliqués dans la machinerie de la contraction musculaire. Le signal GATA-4 est à lui seul suffisant pour induire l'hypertrophie cardiaque (Charron et al., 2001; Liang et al., 2001). L'activité transcriptionnelle de GATA-4 dans les phénomènes d'hypertrophie ou de morphogenèse cardiaque est dépendante de son interaction avec des protéines, comme NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), qui permet l'activation de gène comme l'endothéline-1 (peptide vasoconstricteur), ou encore, de l'interaction avec les cofacteurs FOG-2 (via le doigt de zinc amino-terminal) et NKx2.5, qui permettent sa fixation sur des séquences spécifiques de l'ADN des gènes cibles (Nishida et al., 2002).

Le facteur GATA-5 est lui aussi impliqué dans le développement cardiaque (Charron and Nemer, 1999). Chez le poisson zèbre, le mutant de GATA-5/*faust* précédemment cité pour son rôle dans la spécification du mésoderme et de l'endoderme chez le poisson zèbre présente une réduction du nombre de cardiomyocytes. Comme pour GATA-4, son activité sur les gènes cibles cardiaques est médiée par son interaction avec le facteur Nkx2.5 (Reiter et al., 1999).

Cette description des différents rôles de facteurs GATA endodermiques-cardiaques dans la morphogenèse du cœur n'est pas exhaustive. Elle permet de mettre l'accent sur la double fonction de ces facteurs au cours du développement. GATA-4 et GATA-5 sont exprimés dès les premiers stades de la gastrulation au niveau de territoires de l'épiblaste qu'ils spécifient pour former de l'endoderme et/ou du mésoderme cardiaque. C'est alors au sein de ces tissus qu'ils établissent un profil d'expression spécifique de lignages, permettant l'activation de gènes cibles impliqués dans la différenciation et la prolifération des cardiomyocytes.

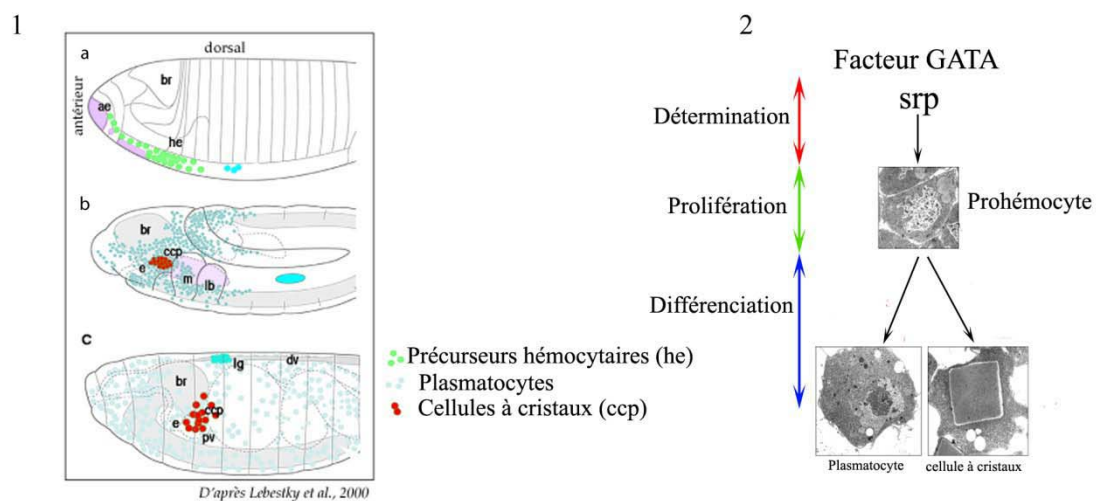
Les facteurs GATA hématopoïétiques

Implication du facteur GATA serpent (srp) dans la détermination et la différenciation des cellules hématopoïétiques de la drosophile : Lors du développement embryonnaire de la drosophile, une population de cellules issues du mésoderme antérieur colonise rapidement l'embryon (Tepass et al., 1994). Ces cellules, appelées plasmotocytes, sont caractérisées comme macrophages embryonnaires, et assurent la phagocytose des corps apoptotiques formés au cours du développement. Simultanément apparaît dans l'embryon une deuxième population de cellules sanguines, de taille plus réduite, localisée exclusivement dans la région du tube digestif antérieur. Ces cellules sont des précurseurs des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000).

Vers la fin de l'embryogenèse, les glandes de la lymphe qui constitueront l'organe hématopoïétique larvaire se différencient dorsalement. Ces glandes assurent l'essentiel de la production d'hémocytes (Dearolf, 1998). Elles contiennent toutes les cellules circulantes, mais également une population importante de cellules indifférenciées (cellules souches) qui peuvent, dans des conditions particulières (métamorphose, infection), se différencier en un lignage

spécialisé adapté aux circonstances. Au moment de la métamorphose, l'organe hématopoïétique se vide et les plasmacytes se différencient en macrophages qui phagocytent tous les tissus larvaires. L'organe hématopoïétique disparaît ainsi au début de la vie pupale, et aux stades ultérieurs un tel organe n'est jamais retrouvé. Chez l'adulte, le seul type hémocytaire présent est le plasmacyte qui conserve ses potentialités phagocytaires (Figure 2A).

Figure 2 : Hématopoïèse chez la drosophile



1) a) Au stade 5, le mésoderme antérieur (violet), les précurseurs hémocytaires (he : vert) et les cellules de la glande de la lymphe (ig : en bleu). b) Embryon de stade 11, les plasmocytes (en bleus) commencent à migrer, alors que les cellules à cristaux (ccp, en rouge) se différencient. Les précurseurs de la glande de la lymphe commencent à migrer dorsalement. c) Les plasmocytes sont dispersés et les cellules à cristaux restent groupées au niveau du proventricule (pv) ; la glande de la lymphe s'organise le long du vaisseau dorsal.

2) Le facteur GATA *srp* est impliqué dans la spécification et la différenciation du système hématopoïétique.

Cinq homologues des facteurs GATA sont codés dans le génome de la drosophile, parmi lesquels trois ont été caractérisés, *serpent* (*srp*), *pannier* et *grain*. Leurs fonctions ont été étudiées chez l'embryon, et à ce jour, seul le gène *srp* est impliqué dans le développement hématopoïétique (Rehorn et al., 1996). Au cours du développement embryonnaire, *srp* est exprimé par les cellules mésodermiques, précurseurs des hémocytes embryonnaires (Rehorn et al., 1996). Son activité est indispensable pour attribuer aux cellules du mésoderme antérieur leur identité hémocytaire, et les engager dans les lignages hématopoïétiques. *Srp* est exprimé au stade larvaire par les prohémocytes ainsi que par les hémocytes différenciés (Lebestky et al., 2000). Les embryons mutants *srp* présentent très peu de cellules mésodermiques engagées dans un destin hémocytaire et aucun de ces hémocytes n'arrive à maturité (Rehorn et al., 1996). La

létalité de la mutation *srp* en fin d'embryogenèse interdit toutes études de son rôle au cours de l'hématopoïèse larvaire. Néanmoins, il est exprimé dans toutes les cellules de la glande de la lymphe (Lebestky et al., 2000).

Des études récentes ont montré que deux isoformes du facteur Srp sont générées par épissage alternatif (Waltzer et al, EMBO, 2002) : une isoforme SrpNC contenant deux doigts de zinc en C et N-terminal, et une isoforme SrpC, qui ne présente qu'un seul doigt de zinc en C-terminal. La présence des doigts de zinc aux extrémités de la protéine est une caractéristique commune des facteurs GATA des vertébrés. Bien que ces deux isoformes présentent certaines caractéristiques fonctionnelles identiques, SrpNC présente une affinité de liaison à l'ADN différente de celle de SrpC. Le doigt de zinc en N-terminal est un site d'interaction avec des facteurs de lignage qui contrôlent les spécifications hématocytaires. Ces interactions vont modifier l'activité du facteur SrpNC qui régule alors différemment l'expression de plusieurs gènes cibles (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003).

Parmi les quelques gènes dont le rôle dans l'établissement des lignages hématocytaires de la drosophile a été identifié, plusieurs ont des homologues qui jouent un rôle dans des processus similaires chez les vertébrés et en particulier le facteur GATA *srp*, mais aussi d'autres acteurs de l'hématopoïèse, tels que FOG (U-shaped), Runx1 (Lozenge), Jak/Stat, etc (Meister and Govind, 2006). De plus, des séquences proches de celles de transactivateurs tels que SCL/Tal-1 (Varterasian et al., 1993) et Imo2 (Milan and Cohen, 1999; Zhu et al., 1995) existent dans le génome de la drosophile, même si une fonction dans la détermination de lignage ou dans le développement hématopoïétique n'est pas beaucoup documentée.

GATA-1 est essentiellement impliqué dans la différenciation terminale : GATA-1 est le membre fondateur de la famille des facteurs de transcription de type GATA (Wall et al., 1988). Ce gène a ceci de particulier qu'il est localisé sur le chromosome X (Zon et al., 1990). GATA-1 est exprimé dans les cellules érythroïdes primitives et définitives (Leonard et al., 1993), dans les éosinophiles (Zon et al., 1993), les mégacaryocytes et les mastocytes (Martin et al., 1990). Son expression n'est pas totalement restreinte au système hématopoïétique, puisqu'il est également exprimé dans les testicules, au niveau des cellules de Sertoli (Ito et al., 1993).

Les souris invalidées pour GATA-1 meurent *in utero* à 10.5-11,5 jdg d'une anémie sévère et d'un défaut de mégacaryocytopoïèse (Fujiwara et al., 1996). L'analyse de différentes souris présentant des niveaux d'expression de GATA-1 variables a également démontré que la sévérité du phénotype était proportionnelle à la quantité de GATA-1 produite (Mc Devitt et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Les mastocytes qui expriment de fort taux de GATA-1, ainsi que les

cellules de Sertoli, ne présentent quant à eux pas de phénotype particulier (Lindeboom et al., 2003).

Les cellules ES GATA-1^{-/-} sont capables de contribuer à tous les tissus de souris chimères à l'exception des érythrocytes matures (Pevny et al., 1991). En effet, la différenciation *in vitro* des cellules des chimères révèle l'existence d'un blocage du développement érythroïde au stade proérythroblaste (Pevny et al., 1995) et une thrombocytopénie due à l'absence de différenciation et de maturation des mégacaryocytes (Vyas et al., 1999). Une analyse complémentaire du potentiel de différenciation des cellules ES GATA-1^{-/-} confirme ce blocage et démontre que celui-ci est dû à l'apoptose prématurée des précurseurs (Weiss et al., 1994).

Relation entre GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse: GATA-1 et GATA-2 présentent des patrons d'expression très similaires dans les différents lignages hématopoïétiques. Cependant, alors que GATA-1 est nécessaire à la différenciation terminale des cellules érythroïdes, les études d'expression et l'analyse des souris invalidées pour GATA-2 indique que celui-ci est plutôt impliqué dans l'amplification des précurseurs immatures (voir Introduction, chapitre 4).

Fonction des facteurs FOG dans la régulation transcriptionnelle des facteurs GATA: La fonction des facteurs GATA dans différents contextes de développement et/ou de différenciation dépend en partie de leur interaction physique avec différents cofacteurs. Les facteurs GATA-1, -2 et -3 sont requis pour la différenciation du lignage hématopoïétique, alors que GATA-4, -5 et -6 activent principalement l'expression de gènes impliqués dans le programme endodermique ou cardiaque. Parmi ces co-facteurs, les protéines à doigt de zinc de type FOG (friend of GATA) jouent un rôle important dans la régulation de la transcription dépendant des facteurs GATA (Cantor and Orkin, 2005). FOG1, qui est exprimé principalement dans le système hématopoïétique, interagit avec GATA-1, alors que FOG-2 est exprimé dans le cerveau et dans le cœur, où il interagit avec GATA-4.

FOG-1 est une protéine possédant neuf doigts de zinc. Lors de la différenciation érythroïde, la fonction de GATA-1 est en partie assurée par sa liaison avec le facteur FOG-1, au niveau du sixième doigt de zinc (F6), situé dans le domaine amino terminal. De son côté, le doigt carboxy-terminal est capable de fixer d'autres partenaires de GATA-1 comme les facteurs Krüppel, EKLF ou Sp1. Les deux facteurs, GATA-1 et FOG, agissent en synergie au cours de l'activation de la transcription au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire. Cependant, l'inactivation du gène *FOG* chez la souris n'a pas les mêmes conséquences sur le développement des lignées érythroïde et mégacaryocytaire. Comme les souris GATA-1^{-/-}, les souris FOG^{-/-} meurent *in utero* d'une anémie sévère, due à un blocage de la maturation terminale des cellules

érythroïdes. FOG et GATA-1 interagissent au sein du complexe multiprotéique qui comporte également SCL/tal-1 et LMO2. Mais, FOG semble agir en amont de GATA-1 puisque, contrairement aux mégacaryocytes *GATA-1^{-/-}* qui prolifèrent sans se différencier, les cellules issues du SV et du foie fœtal ne forment aucune colonie mégacaryocytaire en l'absence de FOG la maturation terminale.

Chez la drosophile, la régulation des gènes responsables de la répartition des poils sensoriels est contrôlée par le gène de type GATA *Pannier*. Celui-ci interagit également avec un facteur structurellement semblable à FOG : Ushaped (*ush*). Contrairement au couple GATA-1/FOG-1, Ush exerce un contrôle négatif sur la transcription dépendante de *Pannier* (Haenlin et al., 1997; Heitzler et al., 1996).

De façon identique, le couple FOG-2/GATA-4 est capable d'inhiber la transcription dépendante de GATA. Cette activité de répression n'est pas directement dépendante de la capacité de FOG-2 à fixer le co-répresseur de la transcription CtBP2 (C-terminal Binding Protein-2). En effet, la répression de la transcription dépendant de GATA-4 serait médiée via l'activité répressive d'un domaine N-terminal des facteurs FOG-1 et FOG-2.

De plus, *in vitro*, le couple GATA-1/FOG-1 est capable d'agir comme répresseur. Chez la drosophile, la perte de fonction de Ush conduit à une surproduction de cellules à cristaux, alors que l'expression forcée de ce même facteur inhibe leur prolifération (Fossett et al., 2001).

Dans les cellules T naïves, FOG réprime l'expression de gènes des cytokines spécifiques à l'engagement vers la voie Th2, qui dépend de GATA-3, et c'est la baisse de son niveau d'expression qui permet l'induction de la différenciation Th2, via l'activation de GATA-3 (Kurata et al., 2002).

En conclusion, les expériences menées *in vitro* et *in vivo* dans les différents modèles indiquent que les changements de niveau d'expression des facteurs FOG permettent de moduler la fonction des facteurs GATA et donc le devenir de cellules vers une voie de différenciation.

GATA-2 et le complexe lmo2/SCL/Tal-1 : L'analyse d'inactivations géniques chez la souris a permis de mettre en évidence des facteurs jouant un rôle critique dans l'hématopoïèse embryonnaire. Certains d'entre eux comme lmo2 et SCL/Tal-1 sont individuellement indispensables à la fois à l'hématopoïèse primitive et définitive. Ces deux gènes sont exprimés dans les îlots sanguins à partir de 7,5 jdg et dans l'AGM jusqu'au stade du foie fœtal (voir Introduction, chapitre 4). GATA-2, contrairement à GATA-1 qui est essentiellement impliqué dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (Martin et al., 1990; Romeo et al., 1990), est présenté comme un gène ayant une fonction plus en amont dans la hiérarchie hématopoïétique, puisqu'il est nécessaire à l'amplification et à la survie des progéniteurs les plus

immatures (Tsai and Orkin, 1997). De même, GATA-3 est largement impliqué dans l'hématopoïèse, puisque son invalidation génique conduit à une réduction de l'hématopoïèse au stade du foie fœtal (Pandolfi et al., 1995), mais il est surtout indispensable à la différenciation lymphoïde T (Ranganath and Murphy, 2001; Ting et al., 1996). Comme GATA-2 (Minegishi et al., 2003), GATA-3 est exprimé par les CSH de l'embryon (Bertrand et al., 2005b). Tous ces facteurs sont susceptibles de former un complexe transcriptionnel commun (Ono et al., 1998; Wadman et al., 1997). Dans ce complexe (Figure 3A), lmo2 n'interagit pas avec l'ADN, mais permettrait la formation d'un pont entre SCL/Tal-1 et un facteur GATA (Wadman et al., 1997), qui eux interagissent directement avec l'ADN. La conservation de ce type de complexe dans l'hématopoïèse dans différents modèles comme le Xénope (Mead et al., 2001) ou le poisson zèbre (Gering et al., 2003), suggère fortement qu'il puisse être impliqué dans les différentes étapes de la différenciation hématopoïétique, néanmoins, ceci n'est pas directement prouvé.

Cependant, comme nous allons le voir ci-dessous, l'existence de ce type d'interaction est également déduite de l'observation des étapes initiales de la différenciation du système nerveux central.

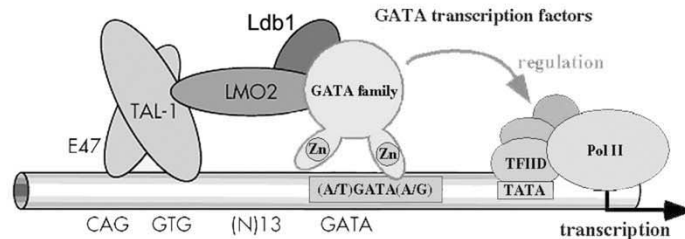
Un complexe dans le système nerveux en développement ? : SCL et certains facteurs GATA sont co-exprimés dans le système nerveux en développement et adulte (Elefanty et al., 1999; Green et al., 1992; Sinclair et al., 1999). Il est, par ailleurs, intéressant de noter que l'expression de GATA-2 précède celle de SCL/Tal-1 dans les précurseurs nerveux immatures. En effet, au moins chez le poulet, le transcrite de GATA-2 est détecté avant celui de SCL/Tal-1. Son expression décroît ensuite au cours de la maturation, alors que l'expression de SCL/Tal-1 persiste dans les neurones post mitotiques (Herberth et al., 2005).

Par ailleurs, GATA-2 et GATA-3 apparaissent co-exprimés dans le système nerveux en développement (Kornhauser et al., 1994; Nardelli et al., 1999) (Karis et al., 2001) et dans certains neurones de la moelle épinière (Smith et al., 2002) (Nardelli et al., 1999). Dans ce contexte neuronal, GATA-2 est capable de réguler l'expression de GATA-3, puisque celle-ci est abolie dans les embryons GATA-2^{-/-} (Nardelli et al., 1999).

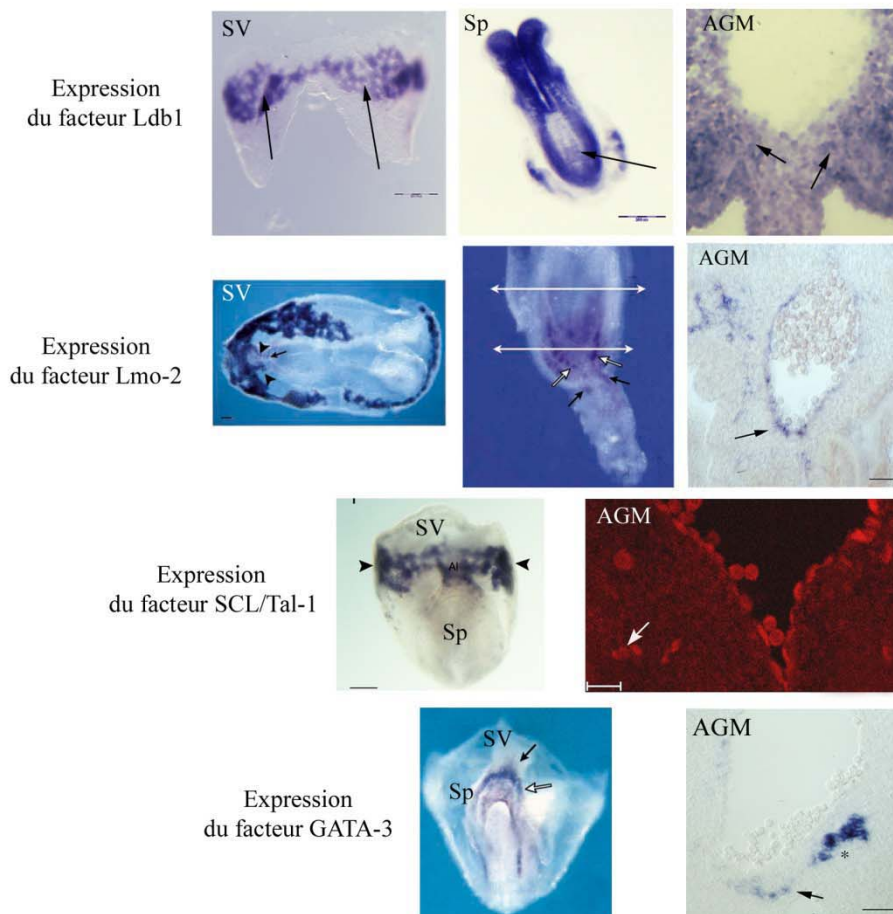
La co-localisation de SCL et GATA-2 laisse supposer que ces deux facteurs pourraient jouer un rôle dans la formation de certains tissus nerveux, peut-être via un complexe transcriptionnel similaire à celui déjà décrit pour jouer un rôle clé dans la régulation de l'hématopoïèse. Néanmoins, l'existence d'un complexe complètement identique est peu probable, au moins dans les stades précoces du développement, du fait que lmo2 n'est pas co-exprimé avec GATA-2 et SCL/Tal-1 dans le système nerveux à ces stades, tant chez la souris (Manaiia et al., 2000) que chez le poulet (Herberth et al., 2005), alors qu'il l'est à des stades plus

tardifs de la gestation (14 jdg : (Feroni et al., 1992) et chez l'adulte (Hinks et al., 1997). Cependant, d'autres facteurs lmo, en particulier lmo4, sont exprimés dans le système nerveux précoce et pourraient jouer une fonction similaire à celle de lmo2 (Lee et al., 2005).

Figure 2: Les différents composants du complexe transcriptionnel impliquant les facteurs GATA sont exprimés dans les sites hématogènes



A/ Composition du complexe transcriptionnel



B/ Expression de différents éléments du complexe transcriptionnel aux sites d'émergence des PH de l'embryon : Les facteurs Ldb1, Lmo2 et SCL/Tal-1 sont exprimés à la fois dans le SV, la Sp et l'AGM. Seul GATA-3 montre une expression restreinte au site hématogène intra-embryonnaire (Sp/AGM). AGM: les flèches indiquent les plages sous-aortiques.

c) GATA-3 et détermination des CSH de l'embryon

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que le facteur GATA-1 était principalement impliqué dans des étapes de différenciation terminale. Dans les systèmes nerveux et hématopoïétiques, SCL/Tal-1 et GATA-2 sont co-exprimés et apparaissent comme déterminants dans la transition précurseurs ou progéniteurs immatures/cellules différenciées. Par ailleurs, l'exemple du facteur de transcription *serpent* chez la drosophile nous a permis de démontrer que le même facteur pouvait à la fois être impliqué dans la spécification de lignage et la différenciation des cellules hématopoïétiques.

C'est sur la base de ces informations que je vais enfin introduire le facteur GATA-3. Nous verrons dans un premier temps que GATA-3 est principalement impliqué dans la différenciation terminale des lymphocytes T. De manière assez inattendue, il semble également jouer un rôle dans la migration des lymphocytes, via des modifications post-traductionnelles impliquant son acétylation. Nous verrons ensuite que, comme les facteurs Irf2 et SCL/Tal-1, qui sont co-exprimés dans les sites extra- et intra-embryonnaires, GATA-2 et GATA-3 sont également co-exprimés, à l'exception de GATA-3 qui n'est pas exprimé dans le sac vitellin (Figure 3B). C'est sur ce constat que je présenterai les résultats obtenus lors de l'expression ectopique de GATA-3 dans le SV.

L'invalidation génique de GATA-3 : Le facteur de transcription GATA-3 a été cloné pour la première fois en 1994 par l'équipe de Douglas Engel (George et al., 1994). Les souris invalidées pour ce gène meurent *in utero* à 11 jdg, suite à un syndrome d'anémie, à des hémorragies abdominales (Pandolfi et al., 1995), ainsi que des anomalies de développement du système nerveux sympathique (Lim et al., 2000). Au regard des résultats obtenus pour l'invalidation de GATA-1 et GATA-2, la létalité embryonnaire de ces embryons pouvait présager de l'implication de GATA-3 dans les étapes responsables de la mise en place de l'hématopoïèse définitive. Néanmoins, la sévérité du défaut nerveux ne permettait pas de conclure réellement. C'est à partir de l'analyse du potentiel des cellules ES GATA-3^{-/-} que l'implication de GATA-3 dans l'hématopoïèse fut confirmée. Dans ces souris, les cellules GATA-3^{-/-} participent à la formation de tous les types cellulaires hématopoïétiques à l'exception des cellules lymphoïdes T (Hendriks et al., 1999; Ting et al., 1996). D'autre part, l'analyse du développement des CSH chez les embryons GATA-3^{-/-} n'a pas mis en lumière de défauts qualitatifs majeurs, puisque ces CSH peuvent être dérivées des AGM mutantes à 10, 5 jdg. Par ailleurs, la viabilité des embryons peut être prolongée par un traitement de la mère à la L-Dopa, qui a pour effet de compenser pour un temps le défaut de développement neural des embryons.

Les CSH provenant du FF de tels embryons à 12 jdg montrent une activité RLT, mais sont moins nombreuses que chez les témoins sauvages (Samson et al., 2003).

GATA-3 et la différenciation lymphocytaire : La spécificité de l'activité de GATA-3 dans le développement du lignage lymphoïde T a initialement été déduite de sa capacité à fixer l'enhancer du récepteur aux cellules T (TCR)(Henderson et al., 1994; Ho et al., 1991; Joulin and Richard-Foy, 1995; Ko et al., 1991). GATA-3 est indispensable à la progression de la différenciation thymocytaire en aval du stade double négatif CD4⁻CD8⁻. Il exerce son rôle sur les lymphocytes CD4⁺ en induisant la transcription des gènes codant pour les interleukines 4, 13 et 5.

L'invalidation de GATA-3 induit un blocage du développement des thymocytes au stade double négatif (CD44⁺ CD25⁻ CD4⁻ CD8⁻) (Hendriks et al., 1999). GATA-3 est également important dans des étapes ultérieures du développement T, puisqu'il est impliqué dans la transition des cellules CD4⁺ des cellules naïves CD4⁺ en cellules T helper de type 2 (Th2) (Zheng and Flavell, 1997) (Ouyang et al., 2000; Ouyang et al., 1998). En effet, GATA-3 est capable d'inhiber l'expression des cytokines de type Th1 par des mécanismes indépendants de l'induction de l'interleukine 4 (Ouyang et al., 1998).

Parmi les défauts engendrés par la délétion de GATA-3 figure également une altération du lignage NK. Les cellules NK sont bien générées chez les mutants, mais elles sont déficientes dans la production d'interféron- γ , et sont moins aptes à protéger, *in vivo*, des receveurs Rag^{-/-} γ c^{-/-} contre l'infection bactérienne (par la listeria). De façon intéressante, les cellules NK GATA-3^{-/-} montrent aussi un défaut de domiciliation vers le foie fœtal, impliquant ce facteur dans des phénomènes de migration (Samson et al., 2003).

L'acétylation des facteurs GATA : L'acétylation correspond à un mode de modification post-traductionnelle qui neutralise la charge positive et modifie la taille de la chaîne latérale des résidus lysine, induisant un changement de conformation des protéines modifiées, et en particulier leur mode d'interaction avec l'ADN chargé négativement. Elle s'effectue par l'addition d'un groupement CH₃-C=O sur les résidus lysine en position N-terminale ou au sein de la chaîne polypeptidique. Cette réaction, catalysée par des acétyltransférases, est réversible et le clivage du groupement CH₃-C=O est alors catalysé par des déacétylases.

Ce petit paragraphe sur l'acétylation des protéines GATA va me permettre d'introduire l'existence du dominant négatif GATA-3-KRR, dont nous reparlerons dans les résultats complémentaires à la surexpression de GATA-3 dans le SV. Comme nous le verrons ci-dessous, le mutant GATA-3-KRR se comporte comme un dominant négatif et les souris transgénique

pour ce gène présentent un phénotype vis-à-vis de la différenciation Th2 identique aux souris GATA-3^{-/-}. On peut d'ailleurs noter à ce propos que, de façon similaire, une hypoacétylation de GATA-1 a des conséquences biologiques importantes, puisque le facteur de transcription devient alors incapable d'induire la maturation des proérythroblastes (Boyes et al., 1998).

La stratégie utilisée pour analyser les conséquences d'une hypoacétylation de GATA-3 a consisté à muter les résidus lysines (Smith et al., 1995). Dans le cas de GATA-3, six mutants ont été étudiés, correspondant aux six résidus lysine. *In vitro*, ces mutations n'affectent ni la fixation à l'ADN, ni l'activité transactivatrice de GATA-3, hormis pour le mutant dominant négatif KRR.

Les effets *in vivo* de la mutation KRR ont été évalués dans des souris transgéniques dont l'expression, inductible, est restreinte aux stades tardifs de la différenciation lymphocytaire T (vecteur d'expression *lck-rtTA*). Dans un contexte de stimulus allergique, l'expression du mutant *GATA-3-KRR* s'accompagne d'une diminution des transcrits codant pour l'IL-4 et l'IL-5 ainsi que d'une inhibition totale de la réponse Th2 (Zhang et al., 1999).

De plus, de façon très intéressante, les auteurs de ces travaux ont décrit un défaut de répartition des lymphocytes CD4⁺ accumulé dans la rate aux dépens des ganglions, surtout mésentériques, impliquant ce facteur de transcription dans le contrôle d'une fonction de migration (Yamagata et al., 2000).

GATA-3 est toujours associé à l'hématopoïèse définitive

Aux stades de la détermination des PH: Dans les premières étapes du développement embryonnaire (du stade OB au stade 5 somites), le transcrit de GATA-3 n'est pas détecté dans les feuilletts embryonnaires composant le SV. En revanche, dès 8-8,5 jdg (0-5 somites), il est exprimé à la fois dans le mésoderme et l'endoderme de la Sp (Manaia et al., 2000), au moment de la détermination des cellules souches intra-embryonnaires. Les facteurs *lmo2* et *SCL/Tal-1* et *Ldb1* (*CLIM-1*) et *GATA-2*, sont exprimés pendant toute la période de détermination des PH, puis de leur différenciation, aussi bien au niveau des îlots sanguins du SV, qu'à celui du mésoderme de la Sp (Elefanty et al., 1998; Manaia et al., 2000) (Voir aussi Résultats, Partie I, Article 1 et Figure 3B). La seule différence notable entre les deux sites hématogènes, en ce qui concerne l'expression des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement hématopoïétique, est bien l'absence d'expression de GATA-3 dans le sac vitellin.

Pendant toute la phase de génération des CSH intra-embryonnaires : Le pic de production des CSH dans l'embryon a lieu à 10.5 jdg. Elles sont retrouvées à la fois dans les « clusters intra-aortiques » de la paroi latéro-ventrale de l'aorte et au niveau du mésenchyme sous-jacent à l'aorte, dans les plages sous-aortiques (Bertrand et al., 2005b; Manaia et al., 2000).

L'analyse de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse démontre que *lmo2*, *SCL/Tal-1*, *GATA-2* et *GATA-3* sont exprimés pendant toute la phase de production des CSH, à la fois au niveau des « clusters » et des plages sous-aortiques (Bertrand et al., 2005b; Manaia et al., 2000). *GATA-3* et *GATA-2* sont également les facteurs de transcription les plus fortement exprimés par les CSH purifiées à partir de l'AGM (Bertrand et al., 2005b). L'expression de *GATA-3* par les CSH semble maintenue chez l'adulte puisque des expériences de micro-array ont montré que ce facteur est qualitativement plus exprimé dans les PH ayant une activité de renouvellement à long terme que dans celles qui reconstituent à court terme (Zhong et al., 2005).

Dans le SV et la Sp (puis dans la Sp-PA/AGM), *SCL/Tal-1*, *lmo2*, *Ldb-1*, et *GATA-2* sont exprimés au moment de la détermination des PH. A la lumière du patron d'expression de *GATA-3* et de son rôle potentiel dans les CSH de l'adulte, les différences d'expressions de ce facteur dans les deux sites hémogéniques indiquent qu'il pourrait être impliqué dans les mécanismes responsables des différences de potentiels des PH intra- et extra-embryonnaires.

II/ Résultats : Evaluation du rôle de GATA-3 dans les PH de l'embryon :

Pour effectuer l'analyse fonctionnelle de *GATA-3* au cours de l'ontogenèse du système hématopoïétique, mon travail a consisté dans un premier temps à mettre en place un protocole d'analyse fonctionnelle des différents types de précurseurs (mésodermiques ou hématopoïétiques) du SV. Ces travaux préliminaires m'ont permis de disposer de protocoles permettant de transduire ces précurseurs entre 7 et 8 jdg. Toutes les mises au point ont été effectuées avec des vecteurs vides. Le pEGFP-C1 pour l'électroporation *in situ* et le MSCV *Migr1* pour l'infection rétrovirale. C'est donc à partir de ces vecteurs de bases que toutes les constructions nécessaires à l'analyse de la fonction de *GATA-3* ont été réalisées, sous la direction avisée du Dr Olivier Albagli.

Nous avons débuté l'analyse de la fonction de *GATA-3* par des expériences d'infection rétrovirale. Cette technique, plus classique et moins difficile à mettre en œuvre que l'électroporation *in situ*, nous semblait la plus pertinente pour une première approche. Initialement, le vecteur rétroviral *Migr-1* disponible au laboratoire ne contenait que de très peu de sites uniques de restrictions pour permettre d'effectuer facilement des clonages de types directionnels. Lorsque j'ai débuté la construction de mes vecteurs, Olivier travaillait à la réalisation d'un vecteur *Migr-1* disposant d'un site de multiclonaire (SMC) plus conséquent. C'est à cette occasion que j'ai pu assister et en partie participer à la construction de ce nouveau vecteur. Très rapidement, il s'est avéré présenter le désavantage de ne plus permettre d'obtenir

une expression de la GFP équivalente au vecteur d'origine, soit après transfection transitoire, soit après infection rétrovirale. Comme nous pourrions le voir, ceci était dû à la nature de l'IRES du vecteur utilisé pour apporter le site de multiclonage. Ce problème résolu, j'ai alors pu disposer d'un vecteur efficace pour la réalisation de mes différentes constructions. En parallèle, j'ai également construit le vecteur plasmidique pour l'approche par électroporation *in situ*, ainsi que d'autres permettant l'analyse de la fonction de GATA-3 dans le site intra-embryonnaire.

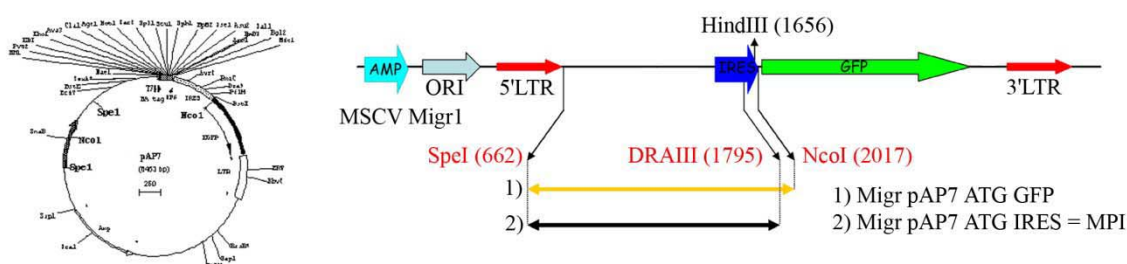
Je vais donc vous présenter ci-dessous toutes ces réalisations, leur validation et leur utilité pour l'analyse de la fonction de GATA-3 au cours de l'ontogenèse du système hématopoïétique.

a) Construction des vecteurs rétroviraux et plasmidiques

Caractéristique du site interne d'initiation de la traduction (IRES) du vecteur Migr-1 : Pour mettre au point un vecteur Migr-1 avec un SMC plus conséquent (Migr pAP7), toute la partie 5' en aval du premier LTR jusqu'en 3' de l'IRES a été remplacée par la partie équivalente du vecteur pAP7 (Martin et al, BMC Bio tec, 2006) contenant un SMC plus « développé » (Figure 4 A). Le vecteur obtenu dispose de plus d'une dizaine de sites directement utilisables pour le clonage d'un ADNc. Néanmoins, après transfection transitoire dans la lignée 293T HEK, il s'est avéré qu'il ne présentait plus les mêmes caractéristiques que le vecteur d'origine. En effet, l'intensité de GFP dans les cellules transfectées était très largement inférieure à celle obtenue avec Migr-1 (Figure 4C). Puisque l'introduction d'un ADNc 1000 bp dans ce type de vecteur réduit d'au moins une unité logarithmique l'intensité de fluorescence de la GFP dans les cellules, il était difficilement envisageable d'utiliser ce vecteur dans de bonne condition pour mes expériences. Après séquençage, l'alignement des séquences des IRES de Migr-1 et de Migr pAP7 a montré qu'elles n'étaient pas totalement identiques : l'introduction d'un site HindIII dans l'IRES de Migr pAP7 avait fait disparaître un ATG en phase avec celui de la GFP (Figure 4B).

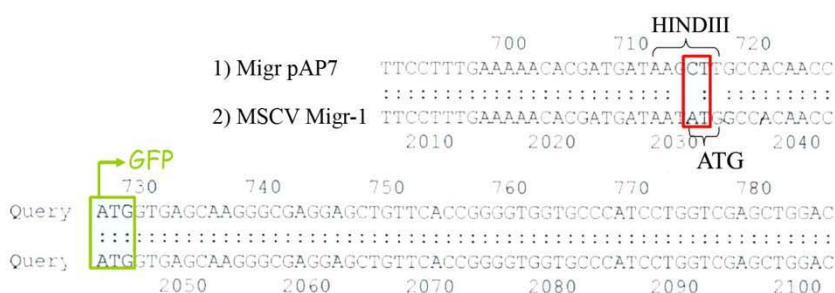
Une seconde génération de vecteur a donc été préparée. Dans cette version, l'intégrité de l'IRES d'origine a été conservée en effectuant une digestion immédiatement en amont de l'IRES, au site DraIII commun aux deux vecteurs Migr pAP7 et Migr-1 (Figure 4A). Le vecteur obtenu (Migr pAP7 ATG IRES ou MPI) présentait toutes les caractéristiques du vecteur Migr-1 initial (Figure 4C) et m'a permis d'effectuer tous mes clonages en utilisant des stratégies de types directionnelles beaucoup plus fiables et efficaces. Des études complémentaires, réalisées par P. Martin et O. Albagli, ont montré que l'ATG de l'IRES constituait un élément essentiel à une bonne initiation de la traduction du gène de la GFP (Martin et al., 2006).

Figure 4 : Vecteur rétroviral utilisé pour le clonage des ADNc d'intérêts



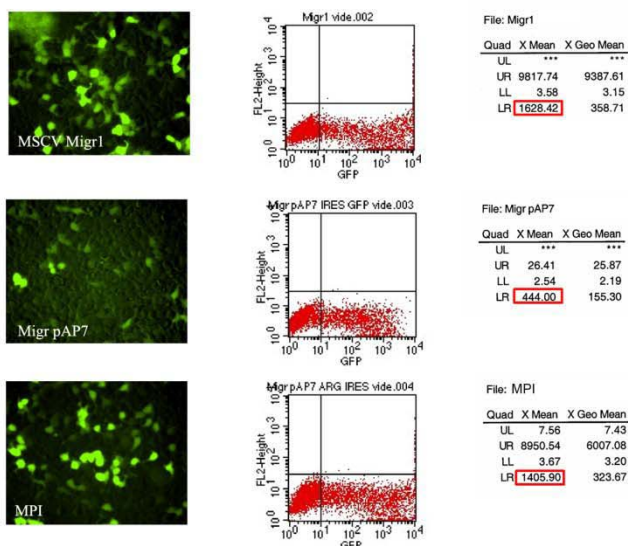
A/ Introduction du MCS du vecteur pAP7 dans le vecteur MSCVMigr1:

- 1) Le vecteur MPI ires faible est obtenu par clonage du MCS du pAP7 dans les sites SpeI/NcoI du MSCVMigr1,
- 2) Le vecteur MPI ires forte est obtenu par clonage du MCS du pAP7 dans les sites SpeI/DRAIII du MSCVMigr1



B/ Comparaison de séquence des IRES des vecteurs Migr pAP7 et MSCV Migr-1 :

L'IRES du vecteur Migr pAP7 provient du vecteur pAP7. L'introduction du site HINDIII dans ce vecteur à fait disparaître l'ATG en phase avec l'ATG de la GFP.



C/ Comparaison de l'activité transcriptionnelle de MSCV Migr1, Migr pAP7 et MPI :

L'analyse en cytométrie de flux de cellules NIH 3T3 transfectées avec les trois types de constructions démontre que l'efficacité de l'IRES du vecteur Migr pAP7 issue du pAP7 est moins efficace que celle du MSCV Migr 1 également contenue dans le MPI

Construction du vecteur MPI mGATA-3 : Afin d'effectuer l'expression ectopique de GATA-3 dans les PH du SV, nous nous sommes procuré l'ADNc murin de GATA-3 (Donné par Frank Grosveld). Cet ADNc a été introduit dans le vecteur MPI par clonage directionnel aux sites Not-

I/Sal-1 (Figure 5A). La taille de l'insert étant un élément crucial pour l'efficacité d'encapsidation de l'ARN lors de la production de particules infectieuses, nous avons tiré parti de la présence d'un site unique juste en aval du codon stop pour supprimer environ 400 nucléotides d'ADN non codant en 3' de la séquence de GATA-3.

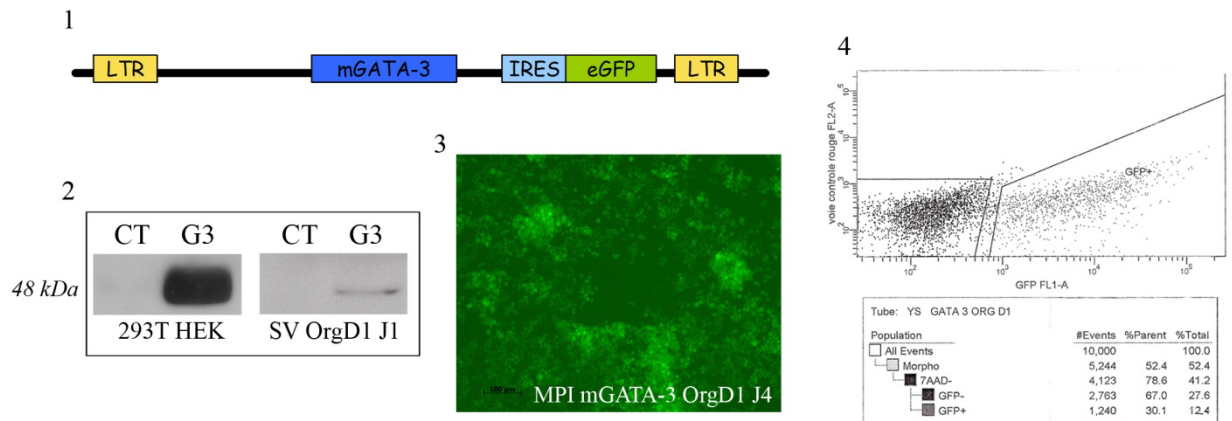
Après séquençage, j'ai testé l'efficacité de cette construction en transfection transitoire dans les cellules 293T HEK. L'analyse en Western blot de ces cellules a permis de montrer que la protéine GATA-3 était effectivement produite à partir de ce vecteur (Figure 5A). Des cellules de SV de 8 jdg mises au contact de particules virales sont également capables de produire la protéine GATA-3 (Figure 5A). Je disposais donc d'un vecteur efficace pour effectuer l'expression ectopique de GATA-3 dans le SV.

Construction du vecteur MPI rGATA-5 : De nombreux travaux ayant décrit des possibilités de redondance fonctionnelle entre les différents vecteurs GATA, nous devions disposer d'un contrôle permettant d'évaluer la spécificité des effets de l'expression de GATA-3 dans les PH du SV. Nous avons pour cela choisi d'utiliser le facteur GATA-5. En effet, GATA-5 est un facteur GATA de type endodermique-cardiaque, qui est exprimé dans des dérivés mésodermiques (Charron and Nemer, 1999; Molkenin, 2000), mais reste indétectable dans le SV (Morrisey et al., 1997). Pour construire le vecteur MPI GATA-5, nous nous sommes procuré l'ADNc du facteur GATA-5 de rat (donné par Mona Nemer). L'utilisation d'un ADNc de rat ne pose pas de problèmes, puisque les protéines codées par les gènes de rat et de souris présentent quasiment 100% d'homologie. L'ADNc a été introduit dans le vecteur MPI par clonage directionnel dans les sites EcoRI/XhoI (Figure 5B). Comme pour MPI GATA-3, nous avons testé l'efficacité de ce vecteur en transfection transitoire et en infection rétrovirale (Figure 5B). Les analyses effectuées en Western blot nous ont montré que ce vecteur permettait la production d'une protéine GATA-5 de taille attendue (Figure 5B).

Construction du vecteur pEGFP-GATA-3 : Pour effectuer l'analyse de l'expression ectopique et transitoire de GATA-3 dans les SV à 7 jdg par électroporation *in situ*, nous avons décidé de cloner GATA-3 dans le pEGFP-C1 (Clontech) afin de produire une protéine de fusion GFP-GATA-3. Comme il n'existe pas de sites de restrictions utilisables suffisamment proches de l'ATG initiateur de GATA-3, nous nous sommes orientés vers une stratégie utilisant la PCR. L'amorce utilisée en 5' nous a permis d'introduire un site de restriction directement en amont de l'ATG initiateur de GATA-3 pour permettre son clonage en phase avec le gène de la GFP (Figure 6A). La transfection de ce vecteur pEGFP-GATA-3 dans des cellules 293T HEK a

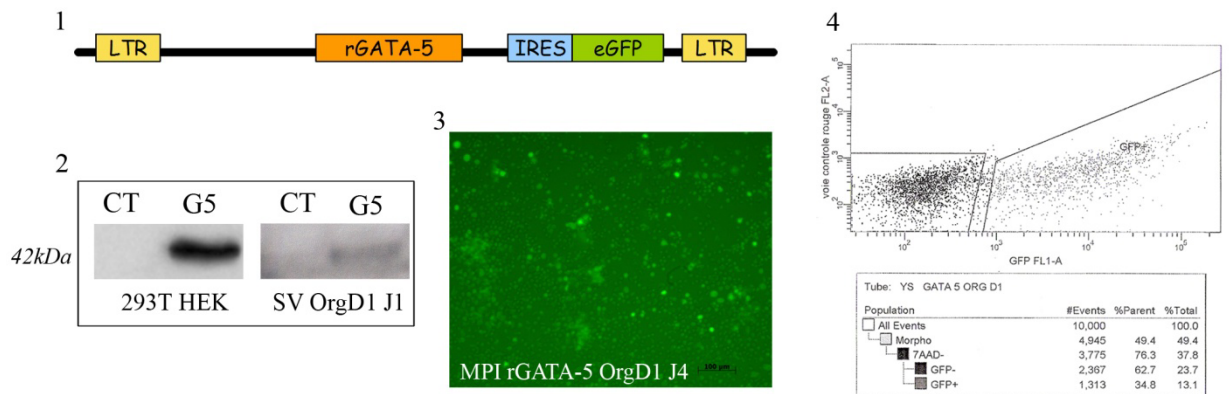
montré que la protéine GFP-GATA-3 obtenue (75,5kDa : GFP + GATA-3) était capable de se localiser dans le noyau (Figure 6A).

Figure 5 : Vecteurs pour l'analyse fonctionnelle de GATA-3



A/ Vecteur MPI mGATA-3 :

- 1) L'ADNc murin de GATA-3 est cloné dans le vecteur MPI aux sites Not-1/Sal-1.
- 2) Western blot anti-mGATA-3 réalisés soit après transfection de la lignée 293T HEK (J2, 10000 cellules) soit après infection de Sacs Vitellins (J1, 10000 cellules).
- 3) Expression de la GFP quatre jours après infection dans des cellules de Sacs Vitellins triées à J1.
- 4) 24 heures après l'infection, en moyenne 30 à 35 % des cellules sont transduites.



B/ Vecteur MPI rGATA-5 :

- 1) L'ADNc de rat de GATA-5 est cloné dans le vecteur MPI aux sites EcoRI/XhoI
- 2) Western blot anti-mGATA-5 réalisés soit après transfection de la lignée 293T HEK (J2, 10000 cellules) soit après infection de Sac Vitellin (J1, 10000 cellules).
- 3) Expression de la GFP quatre jours après infection des cellules de Sac Vitellin triées à J1.
- 4) Après un jour de culture organotypique, en moyenne 30 à 35 % des cellules sont transduites.

Construction des vecteurs MEREX GFP-GATA-3 et MPI DsredMono-GATA-3 : Pour permettre la localisation de la protéine GATA-3 surexprimée dans les cellules infectées, j'ai également construit sur la base du pEGFP-GATA-3 deux vecteurs rétroviraux codant respectivement pour les protéines de fusion GFP-GATA-3 et DsRed monomérique-GATA-3.

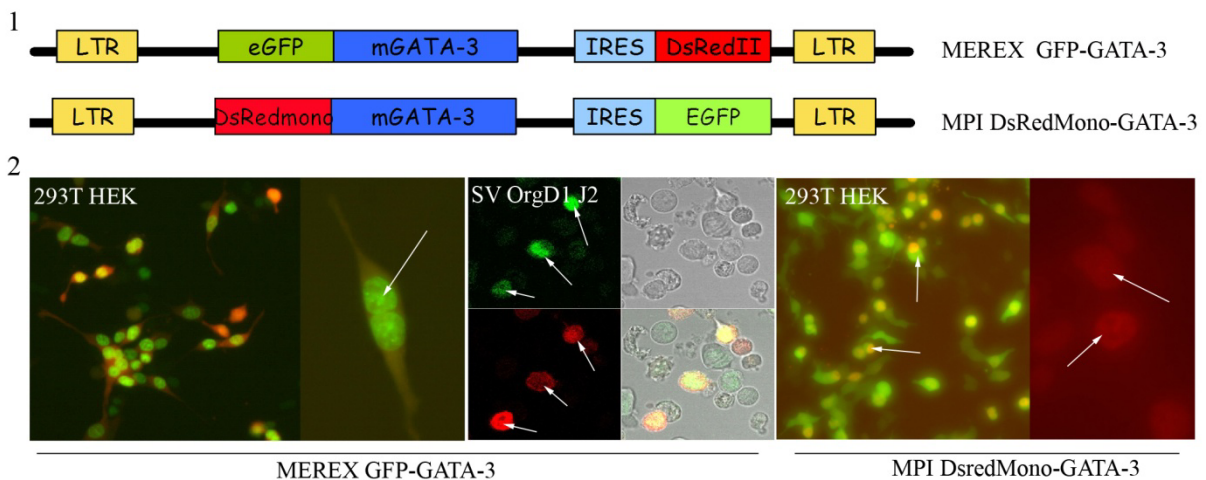
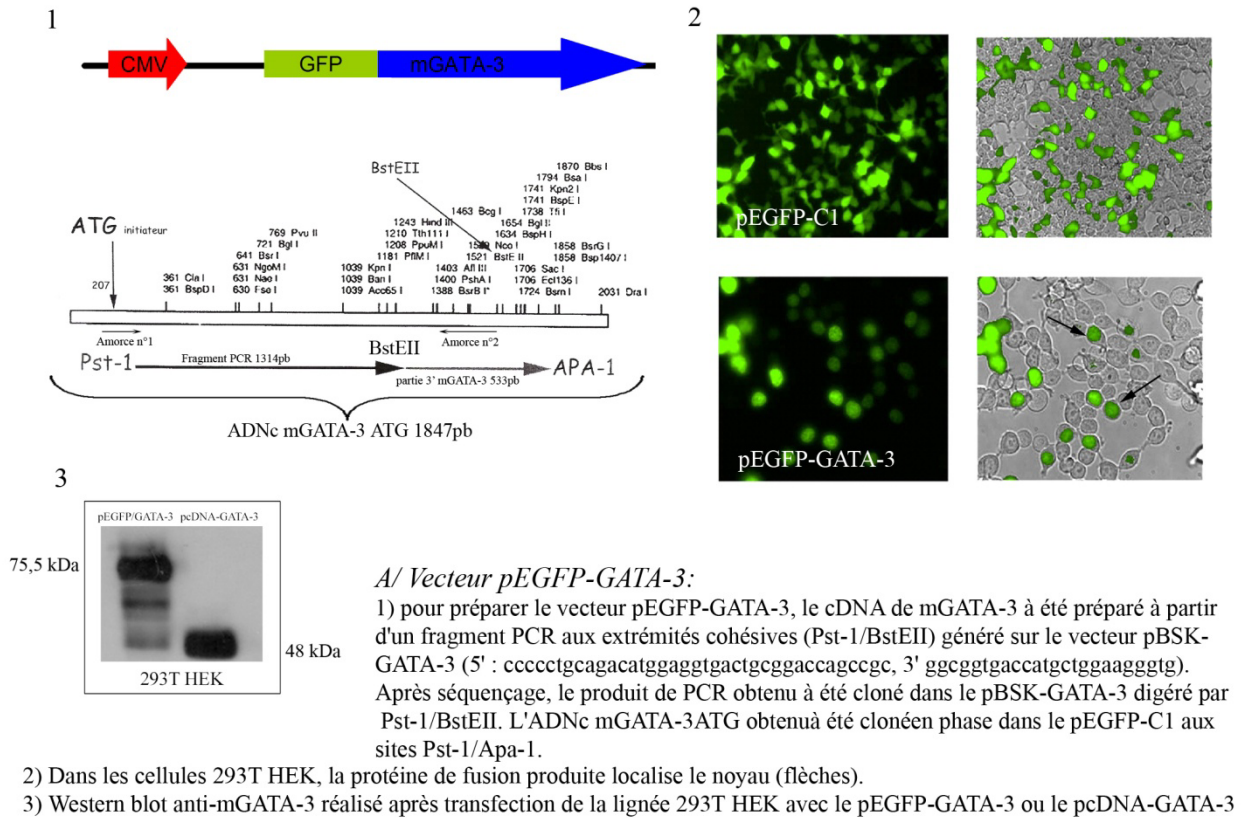
Dans les deux cas, les protéines fluorescentes utilisées permettent d'éviter la formation de structures multimériques. Ces vecteurs rétroviraux ont été construits à partir des vecteurs MEREX (IRES-DsRedII) et MPI. Dans les deux cas, comme pour le vecteur pEGFP-GATA-3, la protéine GATA-3 se localise dans le noyau des cellules transfectées (293T HEK) et infectées (cellules de SV) (Figure 6B).

Dans les cellules 293T HEK transfectée, les niveaux d'expression du gène rapporteur en fusion avec GATA-3 et du rapporteur en 3' de l'IRES apparaissent proportionnels. De façon assez inattendue, dans les cellules du SV, l'expression du gène rapporteur en 3' de l'IRES ne se superpose pas systématiquement à celle de la protéine de fusion. De plus, les niveaux d'expression des deux protéines ne sont pas proportionnels. Des articles de la littérature ont déjà rapporté un lien étroit entre la dynamique du cycle cellulaire, la différenciation et les niveaux d'expression du facteur GATA-1 (Dubart et al., 1996; Pan et al., 2005; Rylski et al., 2003). L'expression de la protéine GATA-3 pourrait être régulée également en partie par le cycle dans les PH transduits du SV.

Construction des vecteurs rétroviraux pour l'analyse de la fonction de GATA-3 dans les CSH de l'AGM : Pour effectuer l'analyse fonctionnelle de GATA-3 dans l'AGM, nous envisageons deux stratégies. La première consiste à effectuer la surexpression dans ce site au moment de la génération des CSH. Pour cela, nous avons construit un vecteur MPI HA-GATA-3, le reporter HA permettant d'évaluer le niveau de surexpression de GATA-3.

La seconde stratégie repose sur l'utilisation d'un dominant négatif pour l'ensemble des facteurs, le GATA-3-KRR précédemment décrit. Cette protéine permet théoriquement de réguler négativement à la fois l'expression de GATA-3 et de GATA-2 (Smith et al., 1995). Ces deux gènes étant co-exprimés dans les CSH de l'AGM (Bertrand et al., 2005b), l'utilisation d'une telle construction permettra peut-être (en fonction de l'efficacité de la construction dans ce type cellulaire) d'évaluer les effets combinés de leur down régulation sur la génération des CSH dans l'AGM. Le vecteur MPI KRR a été construit à partir de l'ADNc de GATA-3-KRR obtenus d'Astar Winoto.

Figure 6 : Vecteurs pour l'analyse de la localisation de GATA-3 dans le noyau



B/ MEREX GFP-GATA-3 et MPI DsredMono-GATA-3:

- 1) Les vecteurs rétroviraux MEREX GFP-GATA-3 et MPI DsredMono-GATA-3 ont été préparés à partir du vecteur pEGFP-GATA-3. Pour le MEREX GFP-GATA-3, le pEGFP-GATA-3 a été digéré par Eco47III/Bsp120I et cloné dans le pAP7 aux sites PvuII/ NotI. Le pAP7-GFP-GATA-3 obtenu a ensuite été digéré par SnaBI/MfeI et cloné dans le MEREX ouvert avec les mêmes enzymes.
- Pour le MPI DsredMono-GATA-3, le vecteur pDsredMonomère digéré par Age-I/EcoR1 a permis d'introduire la DsredMonomère dans le vecteur MPI ouvert par NgomIV/EcoRI. Le vecteur pEGFP-GATA-3 a ensuite été digéré par EcoRI/BglII pour introduire l'ADnc de GATA-3 dans le vecteur MPI DsRedMono aux mêmes sites.
- 2) Après transfection dans la lignée 293T les protéines de fusion GFP-GATA-3 ou DsredMono-GATA-3 localise le noyau .
- 3) Les Sacs Vitellins infectés avec des surnageants produits à partir du MEREX GFP-GATA-3 présentent le même type de localisation de la protéine de fusion. Contrairement au transfection, l'expression du gène rapporteur de la DsRedII n'est pas proportionnelle à celle de la protéines de fusion GFP3.

b) Analyse *in vitro* des effets de GATA-3 sur le devenir des PH du SV

Pour analyser la fonction de GATA-3 dans les PH du site extra-embryonnaire, des embryons entre 8 et 8,25 jdg (0-3 somites) sont disséqués et les SV sont placés en culture organotypique pendant un jour, comme rapporté dans l'article 1 de la partie 1 des résultats. A l'issue de cette culture, les SV sont dissociés pour obtenir une suspension cellulaire qui est mise au contact des différents types de surnageant viraux (MPI, MPI-GATA-3, MPI-GATA-5, et, dans certaines expériences, le vecteur Migr-1-GATA-1-GFP fourni par O. Bernard et S. Malingre (Hôpital Necker)). Après 12h de contact, les cellules GFP⁺ issues de SV infectées sont triées sur la base de l'expression de la GFP, et ensemencées sur le stroma OP9 pour des cultures en milieu liquide, avant d'être analysées par différents tests que nous définirons au fur et à mesure de la progression de la présentation des résultats.

1- Evolution du nombre de cellules au cours de la culture : La suspension cellulaire infectée après l'étape de culture organotypique est relativement hétérogène en terme de types cellulaires (cellules de l'endoderme, endothéliales, mésodermiques et PH). Pour ces raisons, dans les embryons de 0 à 3 somites, le nombre de PH, rapporté au nombre de cellules totales, est relativement hétérogène alors que le nombre de PH par SV reste constant. Nous avons démontré, dans l'article précédent, qu'il n'y avait pas de distorsion dans la répartition des PH dans les cellules GFP⁺ et GFP⁻ au moment du tri. En effet, directement après le tri, le potentiel clonogénique en culture en méthylcellulose de ces deux fractions est identique (Voir Article 1, Partie II). A l'issue du tri, le pourcentage de cellules infectées dans la fenêtre morphologique contenant les cellules hématopoïétiques est donc proportionnel au pourcentage de PH infectés par SV. Par ailleurs, le nombre de SV utilisés dans les différentes expériences d'infection est toujours le même (10 SV). Au regard de ces informations, j'ai systématiquement présenté les résultats en rapportant les quantifications à des « valeurs » par SV équivalent.

A 24 heures post infection, le nombre de cellules par SV dans chacune des conditions (MPI, GATA-3 et GATA-5) est constant et compris entre 10500 et 11000 cellules. En revanche à partir de J4, on assiste, dans les trois conditions, à une croissance du nombre de cellules, qui correspondant à l'amplification et à la différenciation des précurseurs érythromyéloïdes présents dans les SV. C'est précisément à ce stade de la culture que se manifeste un premier effet de GATA-3. Dans les cultures de PH infectées par GATA-3 (que nous appellerons dorénavant PH-GATA-3⁺), l'amplification du nombre de cellules est spectaculaire puisqu'elle est 10 fois plus importante que dans les cultures témoins. L'expression forcée de GATA-5 produit également un

effet sur l'évolution du nombre de cellules à J4 puisque ce nombre est multiplié par 8 par rapport au témoin (Figure 7A1).

A J8, les cultures sont principalement composées de cellules érythroïdes et myéloïdes terminalement différenciées (Cumano et al., 1996). La production cellulaire liée à la différenciation terminale est alors très importante dans les cultures témoins. A ce stade, le nombre de cellules dans les cultures issues de PH-GATA-3⁺ reste trois fois plus important que dans les cultures témoins, mais avec un tassement du différentiel de prolifération par rapport au témoin qui montre une production cellulaire trois fois plus importante (x 6 pour GATA-3 et x 18 pour MPI par rapport à J4) (Figure 7A1). Comparativement, le nombre de cellules dans les cultures de PH infectés avec GATA-5 (que nous appellerons dorénavant PH-GATA-5⁺), n'a pas évolué et est resté similaire à celui observé à J4.

Dans les SV infectés avec GATA-3 et GATA-5, on assiste donc initialement à une amplification massive de la production cellulaire qui précède légèrement celle observée dans le témoin. Dans les cultures de PH-GATA-3⁺, on peut observer la formation de nombreux foyers de prolifération dès le troisième jour de culture (Figure 7A2), alors qu'ils ne sont détectables qu'à J4 dans les cultures témoins. A l'issue de la culture, le coefficient d'expansion total des PH-GATA-3⁺ (x 54) est trois fois supérieur à celui des cellules infectées par MPI (x 18).

Dans le cas de GATA-5, l'amplification initiale de la production cellulaire ne se maintient pas. On assiste même à une mort massive des cellules dès J6. L'analyse de l'activité Tunnel (Matériel et Méthodes) dans les trois conditions de cultures, révèle que la chute du nombre de cellules issues des PH-GATA-5⁺ est le reflet d'une mort par apoptose (Figure 7B).

L'expression ectopique de GATA-3 dans les PH du SV a donc pour effet d'amplifier massivement la production cellulaire. De plus, contrairement à GATA-5, cette amplification se maintient au moins jusqu'à J8.

2- GATA-3 amplifie le nombre de précurseurs clonogéniques : Pour déterminer les modalités d'action de l'effet d'amplification de GATA-3 (augmentation de la prolifération terminale ou bien du contingent de précurseurs), nous avons réalisé des tests du potentiel clonogénique par des cultures en méthylcellulose. Ces tests ont été réalisés aux moments clés de la culture, définis par la cinétique de production cellulaire : à J1, directement après le tri, à J4, lors de l'amplification du nombre de cellules dans les cultures témoins, et finalement, à J8.

De façon assez inattendue, alors que le nombre de cellules par SV n'est modifié à 24h post infection, dans aucune des trois conditions (MPI, MPI-GATA-3, MPI-GATA-5), le nombre de

précurseurs capables de former des colonies est multiplié par 2,3 dans les SV transduits avec GATA-3. Dans les cultures impliquant des PH-GATA-5⁺, le nombre de précurseurs clonogéniques n'est pas significativement modifié par rapport au témoin. Quatre jours après l'infection, les précurseurs clonogéniques restent très nombreux dans la progénie des PH-GATA-3⁺, puisqu'ils sont six fois plus nombreux que chez les témoins MPI. Dans les cultures de PH-GATA-5, le nombre de colonies diminue, même si cette tendance n'est pas significative (Figure 7C).

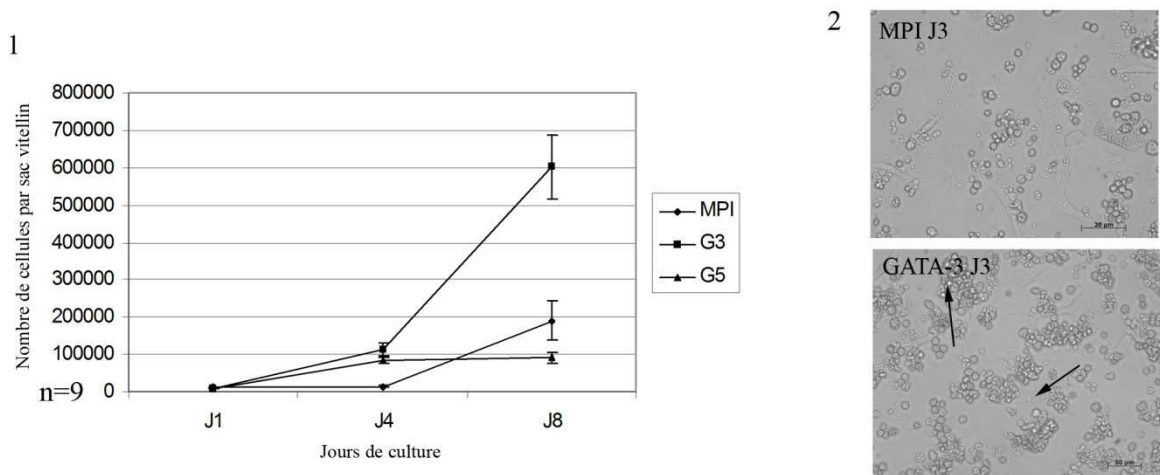
Comme mentionné précédemment, la production de précurseurs érythromyéloïdes à partir des SV s'épuise très rapidement en culture (Cumano et al., 1996). Pourtant, dans les SV transduits par GATA-3, le nombre de précurseurs clonogéniques reste très important à J8. Nous reviendrons plus en détail sur la nature des PH-GATA-3⁺ responsables de cette augmentation. Par ailleurs, il est d'ores et déjà nécessaire de préciser qu'à J8, le nombre de précurseurs monopotents de type mastocytaire est très important, reflétant probablement une expansion liée à l'utilisation du Stem Cell Factor dans nos cultures (Yee et al., 1994). Ceci a pour effet d'augmenter considérablement le nombre de colonies totales par SV et de masquer partiellement le fait que les cultures témoins s'épuisent rapidement. On peut tout de même noter qu'à ce stade de la culture, le nombre de précurseurs clonogéniques obtenus à partir des PH-GATA-3⁺ est multiplié par deux par rapport au témoin MPI (Donnée non illustrée).

La confrontation des résultats de l'analyse du potentiel clonogénique avec ceux de l'évolution du nombre de cellules au cours de la culture et, en particulier, la comparaison GATA-3/GATA-5 est riche d'informations.

Alors que l'augmentation de la production cellulaire chez le témoin reflète la différenciation des PH, l'augmentation subite, à partir de J4, du nombre de cellules dans les cultures de SV exprimant GATA-3, n'a pas pour cause unique l'augmentation de la différenciation des PH présents initialement dans le SV. En effet, contrairement à l'expression ectopique de GATA-5 qui conduit à une prolifération accrue en culture, mais sans augmentation du nombre initial de PH (à J1 post-infection), l'expression ectopique de GATA-3 conduit à une augmentation très significative du nombre total de précurseurs clonogéniques dès 24h après l'infection.

Cette amplification des progéniteurs immatures dès J1 (et maintenue au moins jusqu'à J4), observée lors de l'expression forcée de GATA-3, a pour conséquence une augmentation très importante à la fois du potentiel clonogénique à J4 (de 6 fois, par rapport au témoin MPI) et de la production cellulaire entre J4 et J8 due à la différenciation différée de ces PH-GATA-3⁺.

Figure 7 : Analyse in vitro des effets de GATA-3 sur le devenir des PH du SV



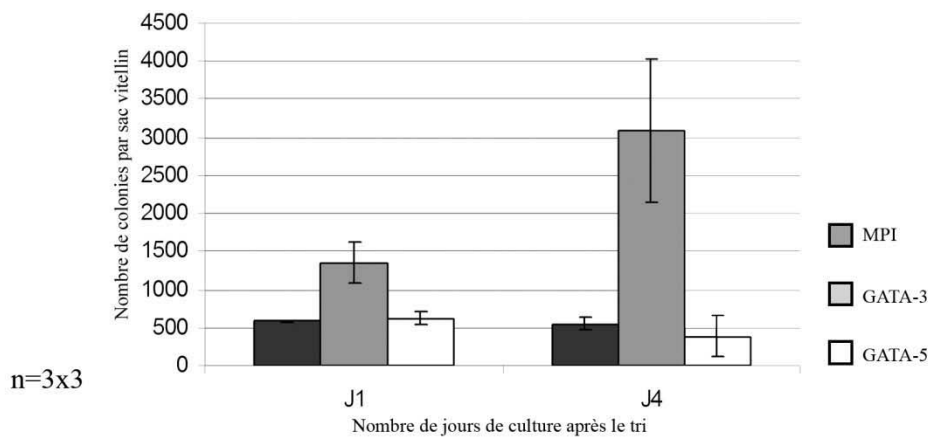
A/ Analyse de la prolifération en milieu liquide :

- 1) Production cellulaire obtenue à partir de PH-MPI, de PH-GATA-3⁺ et de PH-GATA-5⁺
- 2) Culture de cellules de sac vitellin, les flèches montrent les très nombreux foyers de prolifération dans les cultures avec les PH-GATA-3⁺.



B/ Analyse de l'apoptose par Tunnel :

Quatre jours post-infection, dans les cultures de PH-GATA-5⁺, on observe une activité de la terminale transférase, traduisant l'apoptose massive de ces cellules qui se traduit par l'apparition de granules dans le noyau.



C/ Analyse du potentiel clonogénique au cours de la culture :

Dans les sacs vitellins transduits avec GATA-3, le nombre de précurseurs clonogéniques est significativement augmenté à J1 et J4, alors que dans les cultures avec les PH-GATA-5⁺ celui-ci n'est pas modifié.

3- Effet qualitatif de GATA-3 sur les PH du SV.

Les facteurs GATA, et en particulier GATA-1 et GATA-2 sont très intimement liés à la différenciation érythroïde (Cantor and Orkin, 2002). En particulier, GATA-1 permet la régulation positive des promoteurs de gènes érythroïdes comme l'hémoglobine ou le récepteur à l'érythropoïétine. En son absence, la production de globules rouges est impossible (Pevny et al., 1995). Des expériences réalisées sur des cellules ES GATA-1^{-/-} ont montré que la protéine GATA-1 pouvait être remplacée par celle d'un autre membre de la famille, tels que GATA-2 ou GATA-3 (Tsai et al., 1998), mais aussi par des facteurs GATA hétérologues (Blobel et al., 1995). Ces résultats démontrent l'existence d'un effet GATA pro-érythroïde générique, au moins lors des phases précoces de l'érythropoïèse. Cet effet pourrait être médié par le doigt de zinc carboxyterminal, qui pourra jouer un rôle « biologique » et se substituer à la spécificité du facteur GATA normalement impliqué (Blobel et al., 1995).

GATA-1 est également impliqués dans les phases tardives de la différenciation érythroïde, puisqu'il régule progressivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Gregory et al., 1999).

Effet de GATA-3 sur le lignage érythroïde: Nous avons ensuite quantifié le nombre de précurseurs érythroïdes (CFU-E à J3 et BFU-E à J8). A 24h post-infection, le nombre de BFU-E obtenues à partir des PH-GATA-3⁺ est multiplié par 3 par rapport au témoin. Un effet similaire, mais quantitativement moins important (augmentation d'un facteur deux par rapport au témoin), est également observé pour les PH-GATA-5⁺ (Figure 8A-1). Cet effet de GATA-3 sur le nombre de précurseurs est doublé d'un effet sur leur prolifération puisque les BFU-E issues des PH-GATA-3⁺ sont beaucoup plus grosses que celles des témoins. Par contre, les BFU-E issues des PH-GATA-5⁺ sont de petites taille et plus ou moins lytiques (Figure 8A-3).

Dans nos conditions de cultures, nous n'avons jamais observé de colonies érythroïdes de type CFU-E à partir de PH à J1 post-infection (Figure 8A-2). Cette observation est en accord avec les données de la littérature qui montrent une absence de CFU-E dans les SV d'embryons de 8 jdg (Palis et al., 1999). Elle montre aussi que la culture organotypique ne permet pas le développement de ce type de précurseurs. De façon intéressante, des expériences complémentaires nous ont permis de montrer qu'il était possible d'obtenir des CFU-E à J1, mais uniquement lors de la surexpression de GATA-1 dans les PH du SV (140 colonies par SV, en moyenne ; données non illustrées).

L'expression forcée de GATA-3 dans les précurseurs du SV permet donc une amplification des BFU-E à J1 post-infection, mais ne mime pas l'effet de la surexpression de GATA-1, qui permet l'apparition de CFU-E. De même, GATA-5 montre un effet pro-érythroïde qui se traduit,

comme pour GATA-3, par une augmentation du nombre de BFU-E, néanmoins ces colonies ne sont pas typiques et leur différenciation semble altérée (Figure 8A-2, -3).

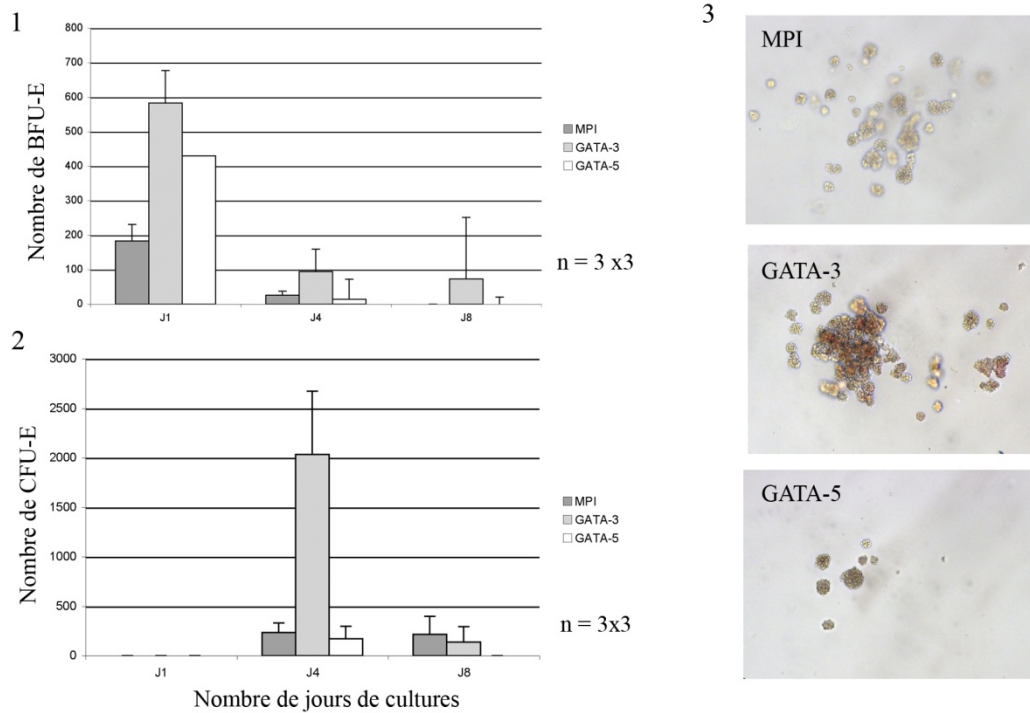
A J4 post-infection, l'effet pro-érythroïde de GATA-3 se manifeste par une forte augmentation du nombre de CFU-E (10 fois plus nombreuses que dans le témoin), qui résulte probablement de la différenciation des BFU-E amplifiées à J1 post-infection. De plus, les BFU-E continuent à être très fortement amplifiées (6 fois plus que dans le témoin). Par contre, l'effet pro-érythroïde de GATA-5 ne s'exerce plus à J4, puisque le nombre de BFU-E n'est plus augmenté. De plus, le nombre de CFU-E devient légèrement inférieur au témoin, démontrant l'incapacité des BFU-E amplifiées à J1 post-infection à effectuer une différenciation terminale. Ce blocage de la différenciation érythroïde des PH-GATA-5+ pourrait rendre compte de la petite taille des BFU-E et de l'épuisement rapide des cultures, déjà mentionné.

Il apparaît clairement que les facteurs GATA sont capables de se substituer plus ou moins efficacement pour participer à différentes étapes de la différenciation érythroïde. Néanmoins, GATA-3 apparaît jouer son rôle très en amont dans la séquence de différenciation des précurseurs érythroïdes. En effet, il n'est pas directement impliqué dans les étapes de la différenciation terminale, car contrairement à GATA-1 qui permet la différenciation de CFU-E dès J1 post infection, il ne semble exercer son action que sur les BFU-E. De même, GATA-5 n'est pas directement impliqué dans la différenciation terminale, puisque, même s'il amplifie le nombre de BFU-E à J1, le nombre de CFU-E à J4 est normal.

GATA-5, comme GATA-3, est capable d'exercer une action sur les précurseurs immatures, mais contrairement à GATA-3 et GATA-1, il est incapable de promouvoir la différenciation terminale, comme l'indique l'effet pro-apoptotique révélé à J6 par des marquages Tunnel, et l'absence d'augmentation du nombre de CFU-E à J4 post infection par rapport au témoin. Au niveau de l'érythropoïèse, la protéine GATA-1 est une des cibles de la caspase-3. Son clivage induit un arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation et la différenciation érythroïde (Zermati et al., 2001). Ainsi, GATA-5 pourrait exercer son effet pro-apoptotique sur les BFU-E en interférant sur la fonction naturelle de GATA-1, ce qui n'est pas le cas de GATA-3.

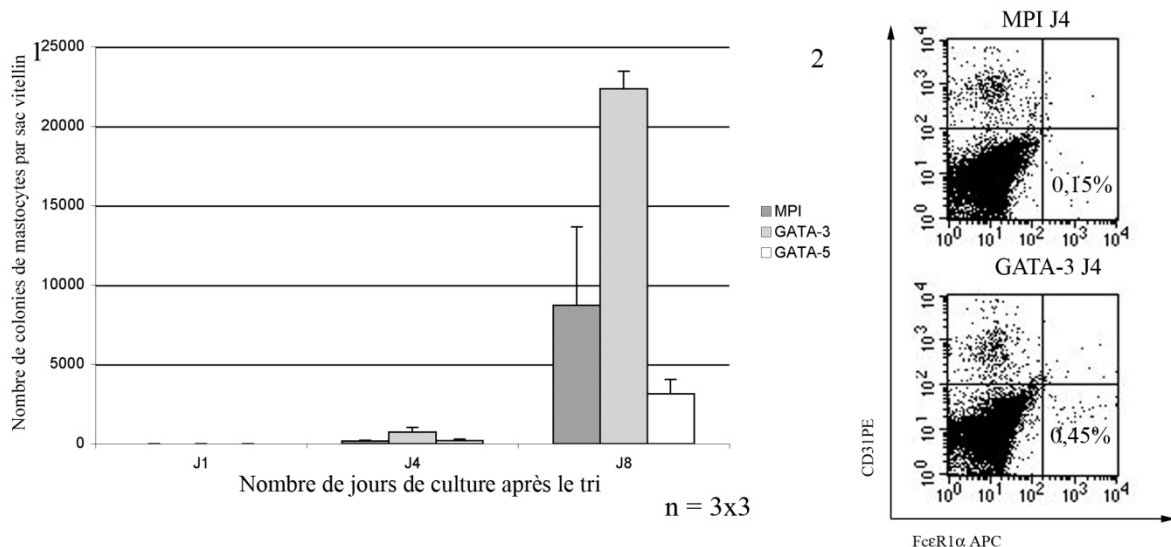
Effet de GATA-3 sur précurseurs monopotents myéloïdes et mégacaryocytaires : Le nombre des précurseurs clonogéniques macrophagiques et mégacaryocytaires n'est pas modifié de façon significative durant toute la durée de culture des PH-GATA-3⁺. GATA-5 ne semble pas non plus exercer de rôle spécifique sur ce type de précurseurs (Données non illustrées).

Figure 8 : Effet de GATA-3 sur les progéniteurs monopotents érythroïdes et myéloïdes



A/ Analyse du potentiel érythroïde :

- 1) L'analyse du nombre de CFU-E au cours de la culture montre que ce type de colonies est augmenté uniquement dans les PH-GATA-3⁺.
- 2) Dans les cultures de PH-GATA-3⁺, le nombre de BFU-E est augmenté à J1, et, contrairement aux sac vitellins transduits avec GATA-5, cette augmentation se maintient jusqu'à J4.
- 3) La morphologie des colonies de BFU-E à J1 post infection montre que celles ci sont plus grosse dans les cultures de PH-GATA-3⁺, contrairement à celle obtenues avec les PH -GATA-5⁺ qui sont plus petites et apparaissent lytiques.



- B/Amplification de colonies de mastocytes :*
- 1) Quatre jours après l'infection, des colonies de mastocytes apparaissent. Leur nombre est significativement augmenté dans les PH-GATA-3 (x2,5), et cet effet se maintient à J8.
 - 2) Dès J4, l'analyse en cytométrie des cultures montre que le pourcentage de mastocytes (FcRγ⁺) est trois fois plus important dans les cultures de PH-GATA-3⁺ par rapport au témoin.

En revanche, au cours de la culture, on assiste à une augmentation significative du nombre de clones de mastocytes dans les cultures de PH-GATA-3⁺. Cette augmentation est significative dès le quatrième jour de culture, puisque ces clones mastocytaires sont quatre fois plus nombreux

que dans les cultures de témoins PH-MPI, et elle se maintient à J8 (Figure 8B-1). Le type d'effet n'est pas observé lors de l'expression forcée de GATA-5 dans les PH du SV. Dans les cultures de PH-GATA-3⁺ sur la lignée OP9, on observe également une augmentation de la quantité des mastocytes, caractérisés par l'expression de FcεR1α (Figure 8B-2). La différenciation des mastocytes dépend pour une large part du ligand de c-kit (Yee et al., 1994). De façon intéressante, la différenciation de ce type cellulaire, au même titre que celle des cellules érythroïdes, est largement tributaire de l'expression des facteurs GATA-2 et GATA-1 (Harigae et al., 1998). Plus particulièrement, le facteur GATA-2 a été décrit comme étant très exprimé par les précurseurs mastocytaires en prolifération (Jippo et al., 1996) et les facteurs de la famille GATA (GATA-1, -2 et -3) sont capables de fixer des promoteurs spécifiques du lignage mastocytaire (Zon et al., 1991a). Dans ce lignage, comme dans le lignage érythroïde, GATA-3 promeut l'amplification et :ou la différenciation prolifération, ce qui n'est pas le cas de GATA-5.

Effet de GATA-3 sur les précurseurs multipotents : Jusqu'à présent, nous n'avons analysé que l'effet de GATA-3 sur les précurseurs clonogéniques monopotents. Ces résultats tendent à impliquer GATA-3 dans les étapes permettant l'amplification de précurseurs déjà engagés dans une voie de différenciation. Les progéniteurs multipotents en amont de la détermination vers le lignage érythroïdes constituent également des cibles potentielles lors de l'expression forcée de GATA-3 dans le SV.

Nous n'avons pas détecté d'augmentation significative du nombre de précurseurs érythromyéloïdes, dans les cultures de PH-GATA-3⁺ à J1 post infection (Figure 9A). Pourtant, la taille des colonies érythromyéloïdes est très largement influencée par l'expression ectopique de GATA-3 ou GATA-5 (Figure 9C). Comme pour les BFU-E, les colonies issues des PH-GATA-3⁺ se distinguent par leur plus grande taille par rapport à celles obtenues à partir des PH-MPI. L'ensemble des composants de la colonie (érythroïdes et myéloïdes) semble avoir subi une expansion plus massive. Dans le cas des PH-GATA-5⁺, l'effet est opposé, car non seulement la taille des colonies est nettement réduite, mais leur nombre est aussi significativement diminué, (trois fois moins nombreuses que dans le témoin). L'effet sur la taille des colonies est maintenu dans les cultures de PH-GATA-3⁺ à J4 post infection, alors que les cultures de PH-GATA-5⁺ sont totalement dépourvues de précurseurs multipotents. Comme dans le cas de l'absence de CFU-E à J4, l'absence de colonies érythromyéloïdes dans les cultures de PH-GATA-5⁺ pourrait résulter de l'apoptose massive observée à J6 en culture en milieu liquide.

Dans le système hématopoïétique, et dans l'érythropoïèse en particulier, les étapes initiales de la différenciation semblent relativement indifférentes au type de facteurs GATA utilisés pour

la restauration du phénotype (effet générique) (Takahashi et al., 2000) (Hosoya-Ohmura et al., 2006). Néanmoins, comme le prouve le rôle essentiel de GATA-1 dans la différenciation terminale des érythrocytes (entre autre, par l'inhibition de l'apoptose), certaines étapes de la différenciation sont dépendantes de l'expression d'un facteur GATA spécifique. En faveur de cette hypothèse, une très récente étude, réalisée par l'équipe de Yamamoto, démontre que GATA-4 est capable de partiellement restaurer le phénotype des souris GATA-1,05/Y (Hosoya-Ohmura et al., 2006), mais est incapable de promouvoir la différenciation terminale, contrairement aux facteurs GATA-2 et 3 (Takahashi et al., 2000).

Le nombre de précurseurs érythromyéloïdes n'est donc pas modifié par l'expression forcée de GATA-3 dans les PH du SV (Figure 9A). Pourtant, au terme de la culture à J8, nous détectons encore ces précurseurs de façon significative, alors qu'ils ont totalement disparu des cultures de PH-MPI et de PH-GATA-5⁺. De façon identique, les précurseurs myéloïdes multiples se maintiennent à J8 dans les cultures de PH-GATA-3⁺, alors qu'ils sont indétectables dans les autres conditions (Figure 9B). Enfin, contrairement aux précurseurs érythromyéloïdes, les précurseurs myéloïdes multiples sont très significativement augmentés à J1, même si cet effet ne se maintient pas à J4.

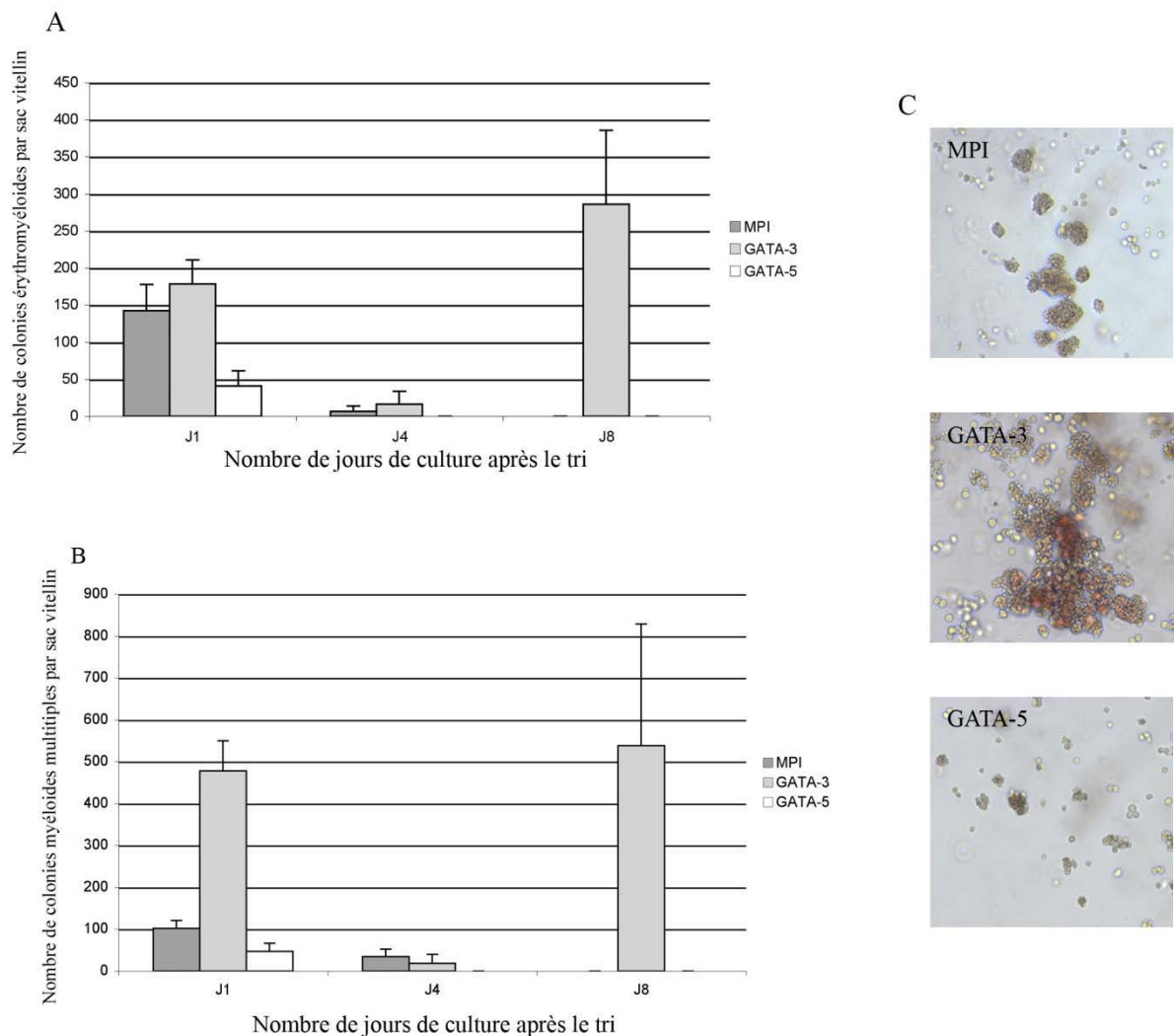
Nature des précurseurs maintenus et amplifiés par l'expression forcée de GATA-3 : Nous avons procédé à l'analyse phénotypique des cellules transduites, que nous avons corrélé avec la quantification des différents types de précurseurs au cours de la culture, afin de préciser la nature des précurseurs cibles de GATA-3.

A J1 post infection, nous avons déjà vu (Figure 7 A-1) que le nombre de cellules issues de SV transduits n'était pas significativement modifié (MPI : 1496±150 ; MPI-GATA-3 : 1352±230 ; MPI-GATA-5 : 1461± 55 ; n=5). Nous avons également constaté, lors de l'analyse du potentiel clonogénique à ce stade de la culture, un doublement du nombre de précurseurs clonogéniques (Figure 7C), qui pourrait être expliqué, en partie ou en totalité, par l'augmentation du nombre de BFU-E (Figure 8A-1) et de précurseurs myéloïdes multiples (Figure 9B). Cependant, cet effet ne suffit pas à rendre compte du maintien de production de précurseurs multipotents à J8 de culture (Figure 9A et B).

Les premières cellules hématopoïétiques, qui se différencient à partir du mésoderme (CD31⁺ c-kit⁻ CD45⁻) progressent d'un phénotype pré-hématopoïétique (CD31⁺ c-kit⁺ CD41⁺ CD45⁻) puis vers un phénotype CD31⁺ c-kit⁺ CD41⁺ CD45⁺ (Figure 10B-1). L'analyse phénotypique des cultures à J1 post-infection n'a pas mis en évidence de modification du pourcentage des

différentes sous-populations analysées entre les cellules témoins et celles issues de PH-GATA-3⁺.

Figure 9 : Effet de GATA-3 sur les précurseurs multipotents



Analyse des colonies multipotentes :

A) L'analyse des colonies érythroïdes au cours de la culture montre une expansion et une persistance uniquement dans les cultures de PH-GATA-3⁺.

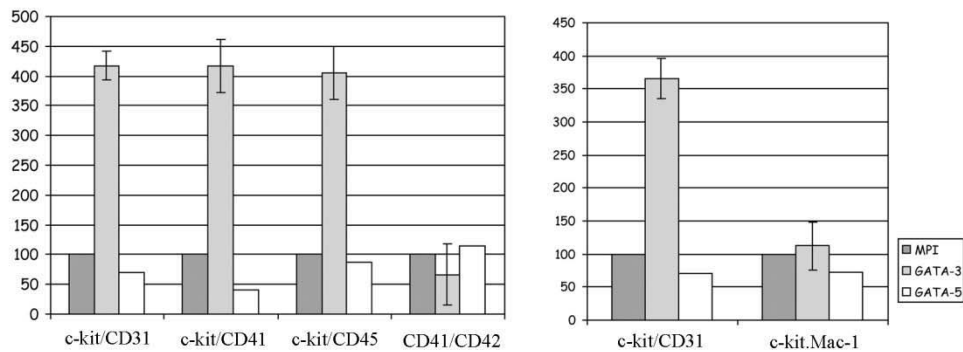
B) L'évolution du nombre de précurseurs myéloïdes multiples suit la même cinétique.

C) Les PH-GATA-3⁺ montre un taux de prolifération élevé caractérisé par l'obtention de colonies de plus grande taille. L'effet inverse est observé dans les PH-GATA-5⁺.

A J4 post infection, on assiste à une forte augmentation, dans les cellules issues de PH-GATA-3⁺, de toutes les sous-populations hématopoïétiques exprimant c-Kit et CD45 (Figure 10A gauche). Ces populations sont susceptibles de contenir des précurseurs de différents lignages ou des cellules différenciées. Par exemple, le phénotype c-kit⁺ CD45⁺ CD31⁺ peut correspondre à des précurseurs macrophagiques, qui expriment également Mac-1. Or, la

population c-kit⁺ Mac-1⁺, n'est pas augmentée (Figure 10A droite). Cette observation corrèle

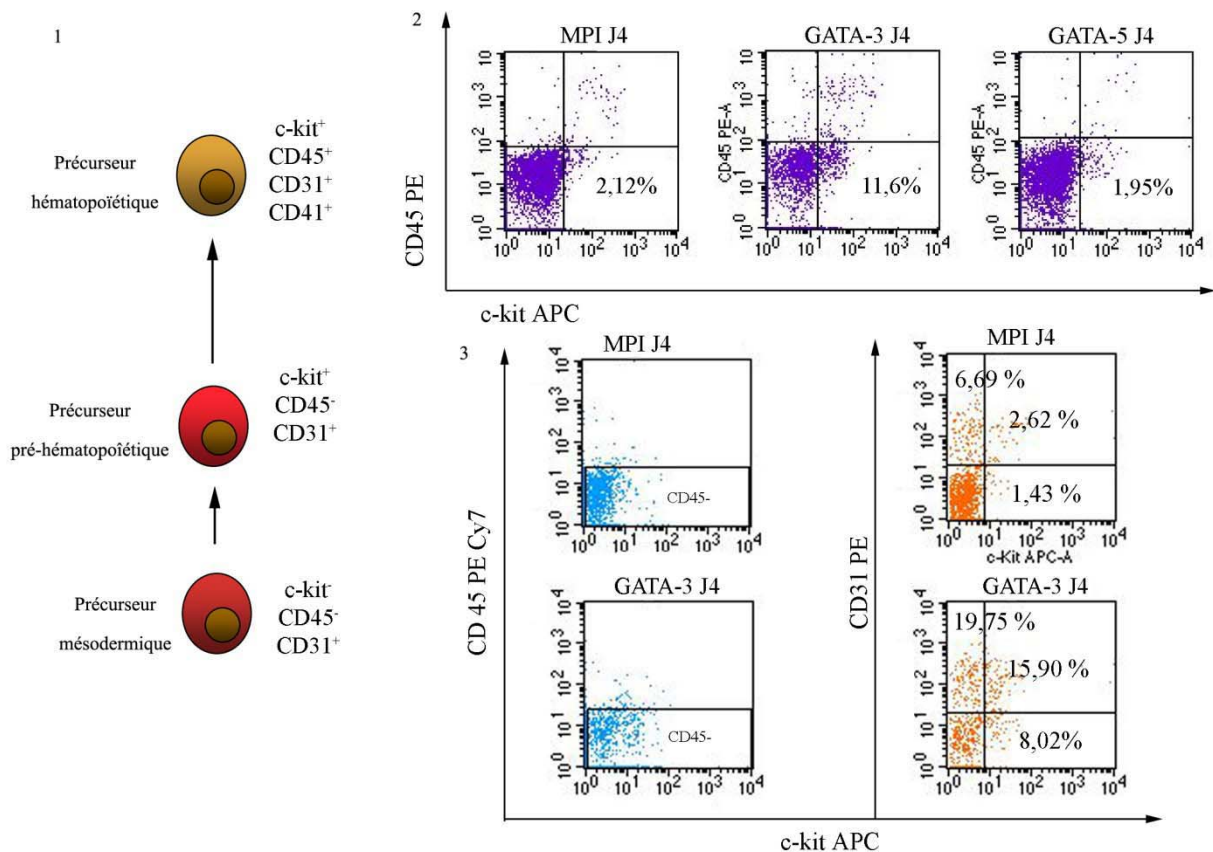
Figure 10 : Nature des précurseurs maintenus et amplifiés par GATA-3



A/ Identification phénotypique des précurseurs immatures ciblés par l'expression ectopique de GATA-3:

Le phénotype c-kit/CD31/CD41/CD45 positif correspond aux cellules amplifiées, qui ne correspondent ni aux mégacaryocytes (CD41/CD42 positifs), ni aux précurseurs macrophagiques (c-kit/CD31/Mac-1 positifs). Ces cellules correspondent à des PH immatures (CD45⁺).

NB : moyenne des % obtenus pour chaque populations analysée à J4 en cytométrie en flux.



B/ Amplification des précurseurs pré-hématopoïétiques :

- 1) Séquence d'évolution phénotypique du mésoderme vers les précurseurs hématopoïétiques.
- 2) On observe lors de l'expression forcée de GATA-3 dans le SV une importante amplification des précurseurs pré-hématopoïétiques, que nous caractérisons par un phénotype c-kit⁺/CD45⁻ (analyse dans la même culture qu'en A).
- 3) Au sein des cellules CD45⁻, l'expression forcée de GATA-3 provoque, en plus de l'augmentation du nombre de cellules c-kit⁺/CD31⁺, l'augmentation de la sous-population c-kit⁺/CD31⁺, qui pourrait correspondre à des précurseurs mésodermiques.

avec le résultat des tests clonogéniques qui montrent une absence de modification du lignage macrophagique dans les cellules issues des PH-GATA-3⁺. Les cellules amplifiées ne correspondent donc pas à des précurseurs macrophagiques. Il en est de même pour la population c-kit⁺ CD45⁺ CD41⁺, qui pourrait correspondre aux précurseurs mégacaryocytaires : 1) la population de mégacaryocytes CD41⁺ CD42⁺ n'est pas modifiée (Figure 10A Gauche), et 2) les tests clonogéniques montrent une absence de modification du nombre de précurseurs de ce lignage. Les résultats de l'analyse phénotypique corroborent ceux des tests clonogéniques, montrant une amplification par GATA-3 du contingent de précurseurs hématopoïétiques présents au moment de l'infection. Il est cependant probable que cette amplification touche également des précurseurs plus immatures également présents au moment de l'infection, dont l'effet se manifesterait par le maintien des précurseurs multipotents à J8 (Figure 9A). Nous avons donc recherché la trace de ces précurseurs immatures (« mésodermiques » et pré-hématopoïétiques) dans la sous-population CD45 négative à J4 post infection. De fait, cette analyse montre que des cellules de types pré-hématopoïétiques (c-Kit⁺ CD45⁻) sont 5 fois plus nombreuses dans les cultures issues de PH-GATA-3⁺, alors que leur nombre n'est pas modifié par l'expression ectopique de GATA-5 (Figure 10B-2 et 3). De plus, nous observons, toujours dans la fraction CD45 négative, une représentation plus importante des cellules CD31⁺ c-kit⁻, qui pourraient correspondre à des cellules mésodermiques, ce qui reste à démontrer en analysant spécifiquement le potentiel de ces cellules triées. L'augmentation du potentiel clonogénique entre J1 et J4, associée à la persistance des précurseurs à J8, a pour conséquence un maintien de la production de cellules érythroïdes et myéloïdes dans les cultures de PH-GATA-3⁺ au moins jusqu'à J18.

4- Analyse du potentiel de différenciation lymphoïde B et T

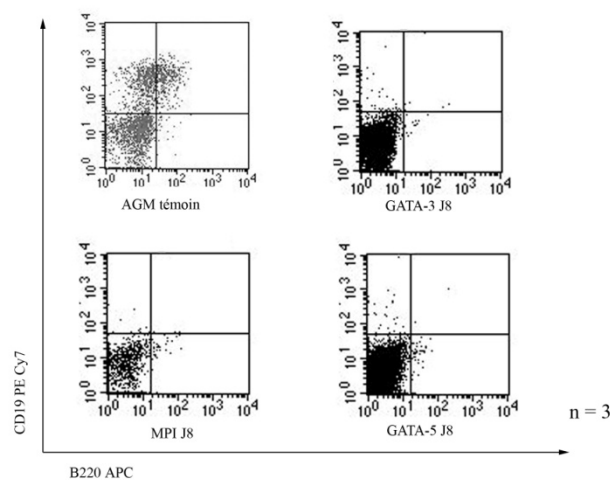
Les expériences précédentes ayant montré que l'expression ectopique de GATA-3 dans les précurseurs du SV exerçait un effet positif sur le potentiel de maintenance des précurseurs immatures, nous avons évalué un effet possible sur leur potentiel de différenciation, en testant l'acquisition éventuelle d'un potentiel lymphoïde.

Potentialité lymphoïde B : Les analyses clonogéniques et les phénotypages, rapportés ci-dessus, ont été effectués à partir de cellules GFP⁺ cultivées en milieu liquide sur stroma OP9 en présence des cytokines SCF, Flt-3-Ligand et Epo (comme décrit dans l'article n°1 de la Partie II). Pour analyser l'émergence éventuelle d'un potentiel lymphoïde à partir des PH-GATA-3⁺, les cultures ont été effectuées en présence de la cytokine pro-lymphoïde IL7. Ces conditions de culture sont permissives à l'émergence de cellules lymphoïdes B à partir des précurseurs intra-embryonnaires

de la Sp-PA/AGM (Bertrand et al., 2005a). Néanmoins, nous n'avons jamais observé un tel potentiel à partir des PH du SV, y compris ceux transduits par GATA-3 ou GATA-5. Nous avons également effectué la culture de cellules triées à J1 en présence uniquement du cocktail de cytokine Flt-3 Ligand/Il-7. A l'issue de trois expériences indépendantes, nous avons dû constater qu'aucun lymphocyte ne se développait dans ces cultures (Figure 11A).

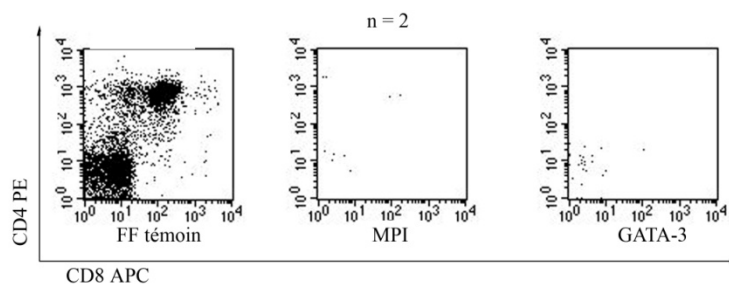
Potentialité lymphoïde T : Pour tester le développement éventuel d'un potentiel lymphoïde T à partir de ces mêmes cultures, des expériences de colonisation de lobes thymiques fœtaux (Fetal Thymus Organ Culture ou FTOC) ont été réalisées. Les lobes thymiques d'embryons de souris C57Bl/6 (Ly5.2) de 14 jdg ont été irradiés. Après tri à J1, les cellules GFP⁺ issues de SV de souris Ly5.1 infectés avec GATA-3 ou MPI ont été mis en contact avec ces lobes thymiques (10000 cellules par lobes). Deux expériences indépendantes ont été réalisées avec respectivement 6 et 8 lobes thymiques par condition. Dans tous les cas, aucun lymphocyte T CD4⁺/CD8⁺, CD8⁺/CD4⁻ ou CD4⁺/CD8⁻ n'a été détecté à l'issue de la culture, alors que les contrôles effectués avec des cellules de FF (10⁴ cellules par lobes) ont permis de caractériser une progénie lymphoïde T typique (Figure 11B).

Figure 11 : Analyse du ptentiel lymphoïde B et T



A/ Analyse du potentiel lymphoïde B :

En culture en présence d'IL7, l'AGM témoin produit des cellules B CD19/B220 positives. Dans les cultures de PH-GATA-3⁺ ou GATA-5⁺ aucunes des cellules transduites n'a ce potentiel, comme les SV témoins.



B/ Analyse du potentiel lymphoïde T :

Les cellules de foie foetal produisent des cellules T CD4/CD8 positives, les PH-MPI et PH-GATA3⁺ n'ont pas ce potentiel.

c- Analyses des potentialités *in vivo*

Les résultats des cultures de SV infectés avec GATA-3 ayant révélé le maintien de précurseurs multipotents en culture en méthylcellulose au moins jusqu'à J8 post infection, nous avons voulu tester *in vivo* les potentialités de ces cellules.

Test des colonies spléniques : Dans une première approche, nous avons voulu évaluer si l'expression ectopique de GATA-3 pouvait améliorer la capacité des PH du SV à former des colonies spléniques (CFU-S pour colony forming unit in the spleen) chez des souris létalement irradiées. D'après la littérature (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Medvinsky et al., 1996; Metcalf and Moore, 1971), la capacité du SV à fournir des précurseurs capables de former des colonies spléniques observables à jour 8 (CFU-S₈) ou 11 (CFU-S₁₁) apparaît assez tardivement, puisqu'elles ne sont facilement mises en évidence qu'à partir de 10 jdg (31-34S). Elles peuvent cependant être détectées à partir de SV plus précoces à condition d'effectuer des cultures organotypiques.

Je voudrais d'ores et déjà préciser que l'ensemble des expériences *in vivo* a été handicapée par le fait que l'irradiateur à rayon X de l'IGR s'est révélé délivrer des doses d'irradiation non contrôlables, soit en excès, soit en défaut et parfois adéquates. L'identification de ce problème a pris du temps et l'irradiateur est désormais en cours de remplacement. Les résultats présentés sont donc essentiellement qualitatifs, mais nous ont permis de faire des observations intéressantes.

Dans une première expérience, nous avons injecté à des receveurs C57Bl/6 (Ly5.1) irradiés, des PH-GATA-3⁺ ou des PH-MPI triées à J1, à raison de 1 SV-équivalent, avec pour témoin positif des souris injectées avec 5 x10⁵ cellules de moelle (5 souris par lot). L'observation des rates à J8 et J10 a montré une absence de colonies, sauf dans les rates témoins (environ 25 CFU-S₈). Nous avons précédemment montré que l'incapacité des cellules d'embryons de moins de 10 jdg à s'implanter dans un receveur immuno-compétant pouvait être lié à l'absence d'expression d'antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Jaffe et al., 1991), qui en fait la cible des cellules NK (Cumano et al., 2001). Nous avons donc effectué le même type d'expérience (injection de cellules triées à J1 post infection) en utilisant des receveurs Rag-2^{-/-}γc^{-/-} irradiés sublétalement (5 souris par lot). Par ailleurs, il est possible d'obtenir des CFU-S à partir d'AGM à condition d'effectuer une culture organotypique. Nous avons considéré qu'il était possible que les précurseurs du SV puissent acquérir un potentiel CFU-S au cours de la culture organotypique. Nous avons donc injecté également des receveurs conventionnels avec des cellules triées à J4 post infection (MPI, GATA-3 à 1 SV équivalent, avec le même témoin ; 15 souris par lot). Ces expériences ont montré :

1) Que des CFU-S₈ étaient présentes dans des SV avant 10 dpc, mais qu'elles ne pouvaient être détectées que dans des receveurs Rag-2^{-/-}γc^{-/-}. Nous n'avons pas observé de différence entre les lots (5 à 10 CFU-S par rate pour MPI et GATA-3). Nous n'avons pas pu analyser la présence de précurseurs plus immatures (CFU-S₁₂), puisque ces souris (irradiées sub-létalement : 600 rad) sont mortes entre 7 et 9 jours après l'irradiation.

2) Que les cellules triées à J4 pouvaient également donner naissance à des CFU-S₈, mais à des taux extrêmement variables (2 à 11, avec une répartition non significativement différente entre MPI et GATA-3). Compte tenu du taux de mortalité des souris (à partir de J5 post irradiation), ces données ne sont pas conclusives. Elles montrent cependant la faisabilité de l'approche, qui sera de nouveau réalisée quand le nouvel irradiateur sera disponible.

En conclusion, ces résultats mettent pour la première fois en évidence la présence de CFU-S₈ à partir de SV précoce, ce qui reflète la présence de précurseurs érythromyéloïdes dans les SV à ces stades. Les expériences effectuées après culture sur stroma OP9 ou en utilisant des receveurs Rag-2^{-/-}γc^{-/-} suggèrent que l'absence de CFU-S précédemment observée à partir de cellules fraîches et dans des receveurs conventionnels relève, au moins en partie, de l'absence d'expression du CMH de classe I par les cellules de l'embryon précoce.

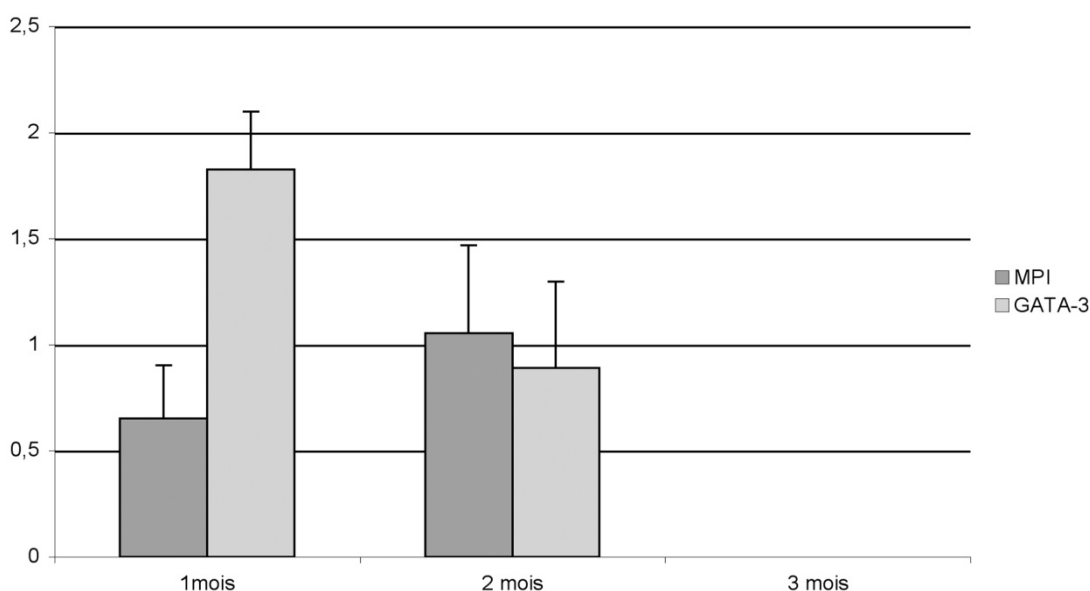
Test de reconstitution *in vivo* : En parallèle des expériences de CFU-S, nous avons analysé la capacité des cellules à reconstituer l'hématopoïèse de souris Rag2^{-/-} γC^{-/-} ayant subi une irradiation sub-létale. Dans la première expérience, quatre groupes de souris ont été constitués. Le groupe témoin positif de l'expérience comprenait 4 souris injectées avec 2 équivalents AGM par souris. Le groupe témoin d'irradiation comprenait 3 souris. Les souris des deux autres groupes ont été injectées avec : 1) des SV infectés avec le vecteur témoin MPI (2,5 SV par souris dans 7 souris), 2) des SV infectés par GATA-3 (2,5 SV par souris dans 7 souris).

Au cours de cette expérience, les souris témoins ont survécu, en majorité. L'analyse du chimérisme à 1 mois a été réalisée sur 5 souris MPI et 7 souris GATA-3. Dans les deux cas, le chimérisme mesuré était faible, néanmoins, de façon reproductible, les souris injectées avec GATA-3 présentaient un chimérisme deux fois plus important que celui observé dans le groupe des souris témoins MPI (Figure 12). A 2 mois, seules 3 souris MPI et 3 souris GATA-3 avaient survécu et le taux de chimérisme était d'environ 1% dans les deux cas. L'analyse du sang périphérique et des organes hématopoïétiques (moelle et rate) effectuée à 2,5 mois montrait la disparition des cellules de type donneur dans les deux groupes (MPI et GATA-3). Ce résultat

montre que l'expression forcée de GATA-3 ne modifie pas la cinétique de reconstitution par des précurseurs du SV.

Dans une seconde série expérimentale, nous avons injecté, dans des groupes constitués de la même manière, les cellules issues de SV transduit avec MPI et GATA-3. A la différence de la première série, les cellules ont été injectées sans tri préalable pour optimiser le nombre de cellules injectées. Cette approche permettait aussi d'intégrer la contribution des cellules transduites qui n'expriment la GFP qu'au bout de 24 à 48h (évaluée à environ 20%, comme l'a montré l'analyse présentée dans Résultat, partie II, article 1). Dans cette série expérimentale, la plupart des souris sont mortes d'un excès d'irradiation.

Figure 12 : Analyse des potentialités *in vivo*



Test *in vivo* du potentiel de reconstitution des cellules triées 24 heures post-infection à partir de SV transduits par MPI ou GATA-3 (receveurs Rag γ c). L'analyse du taux de chimérisme à 1 mois montre que celui-ci est plus important dans les souris injectées avec les PH-GATA-3⁺.

III/ Discussion :

L'existence chez l'embryon de deux vagues de génération de précurseurs hématopoïétiques présentant des potentialités de différenciation et de maintenance pose la question des mécanismes qui pourraient être à l'origine de ces différences. L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse permet de mettre en évidence l'existence de gènes différenciellement exprimés dans les deux sites hématogènes, au moment de la détermination du mésoderme vers la voie hématopoïétique, et lors de la génération des PH (Manaiia et al., 2000). Par exemple, GATA-3 n'est pas exprimé dans le SV au moment de la

détermination du mésoderme vers la voie hématopoïétique (7 jdg), ni plus tard dans les PH résultant de cet événement de génération (8-8,5 jdg). Il est en revanche présent dans le site embryonnaire durant les phases de détermination (Sp : 8 jdg) et de génération (9-11,5 jdg) des CSH de l'embryon. Nous avons donc entrepris l'analyse fonctionnelle de ce facteur en pratiquant une expression ectopique dans le SV, au moment de la génération des PH à 8 jdg.

Deux facteurs GATA sont normalement exprimés dans le SV où ils exercent deux fonctions distinctes sur les précurseurs hématopoïétiques. GATA-2 est fortement exprimé par les précurseurs immatures du SV et les expériences d'inactivation ont montré qu'il était impliqué dans le maintien et l'amplification de ces précurseurs (Tsai et al., 1994). Dans le SV, GATA-1 est exprimé par les cellules de la lignée érythro-mégacaryocytaire et est impliqué principalement dans leur différenciation terminale (Pevny et al., 1995). De plus, ces deux facteurs sont co-exprimés par les cellules du SV, ce qui constitue un caractère général pour cette famille. Par exemple, les motoneurones ou les cellules des plages sous-aortiques co-expriment GATA-2 et GATA-3. Par ailleurs, nous avons déjà mentionné le fait que les facteurs GATA sont largement interchangeables, puisque l'expression d'un facteur GATA permet de restaurer plus ou moins complètement le phénotype de souris ou de cellules ES invalidées pour un autre facteur GATA (Blobel et al., 1995; Hosoya-Ohmura et al., 2006). Nous avons donc effectué en parallèle l'expression forcée de GATA-5 dans les PH du sac vitellin, comme contrôle additionnel pour définir la spécificité d'action de GATA-3. C'est dans ce contexte que nous devons interpréter les résultats obtenus à la suite de l'expression forcée de GATA-3 dans les PH du SV.

L'expression ectopique de GATA-3 dans les PH du SV conduit à une augmentation massive du nombre de cellules en culture à J4 post infection. Cet effet est la conséquence d'une augmentation du nombre de précurseurs clonogéniques, apparente dès le premier jour de culture, et qui se maintient au moins jusqu'à J8. L'analyse du type de précurseurs amplifiés a montré que GATA-3 exerçait son action sur les précurseurs érythroïdes en favorisant la production de BFU-E. De plus, les précurseurs myéloïdes constituent également une cible de GATA-3 puisque le nombre de précurseurs mastocytaires et les précurseurs myéloïdes multiples sont également augmentés. Enfin, nous avons mis en évidence un maintien plus important de la production de précurseurs dans les cultures de PH-GATA-3⁺, qui indique un effet sur les précurseurs encore plus immatures. GATA-3 ne modifie pas le potentiel de différenciation des précurseurs transduits.

Effet de GATA-3 dans le lignage érythroïde et mégacaryocytaire :

Dans le lignage érythroïde, l'amplification des précurseurs immatures est sous la dépendance de l'expression de GATA-2, qui est capable de maintenir son expression par l'intermédiaire

d'une boucle d'auto-activation. GATA-2 induit progressivement l'expression de GATA-1 qui va être le facteur déclenchant des étapes ultérieures de la différenciation (Ohneda and Yamamoto, 2002). En effet, GATA-1 régule négativement l'expression de GATA-2. Cet effet dépend de la capacité de GATA-1 à déplacer GATA-2 sur son promoteur et à inhiber sa transcription (Figure 13A). Alors que GATA-2 forme un complexe capable d'activer la transcription, GATA-1 recrute un complexe inhibiteur. Cette fonction distincte est probablement associée à la nature biochimique différente de ces deux facteurs (Grass et al., 2003).

La surexpression de GATA-2 dans les progéniteurs érythroïdes ou les proérythroblastes induit leur amplification. Celle-ci s'effectue au dépens de la différenciation terminale qui est bloquée (Briegel et al., 1993) (Figure 13B).

Nos expériences montrent que GATA-3 est capable d'amplifier le nombre de BFU-E dès le premier jour post infection. Cet effet se maintient à J4 et s'accompagne d'une augmentation du nombre de CFU-E qui résulte probablement de l'augmentation initiale du nombre de BFU-E. Le nombre de BFU-E dans les cultures PH-GATA-5⁺ est également augmenté à J1 post infection. Néanmoins, à J4 le nombre de cellules en apoptose est très important et ceci a pour conséquence de considérablement réduire le nombre de précurseurs clonogéniques et en particulier le nombre de CFU-E qui est inférieur au témoin à ce stade de la culture.

A J1, l'effet pro-érythroïde consécutif à l'expression forcée de GATA-5 et GATA-3 pourrait être le reflet d'un effet de type surexpression de GATA-1. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué la surexpression de GATA-1 dans les précurseurs du SV. Nos résultats montrent que dès J1, les PH-GATA-1⁺ sont capables de former des CFU-E. De façon intéressante, aucune CFU-E n'est jamais observée dans les cultures de PH-MPI, GATA-3 et GATA-5. La surexpression de GATA-1 induit donc une modification de la cinétique de différenciation des précurseurs érythroïdes du SV, qui effectuent une maturation accélérée (Figure 13C).

L'analyse des effets de la surexpression de GATA-1 dans le SV démontre que les effets pro-érythroïdes liés à l'expression forcée de GATA-3 et GATA-5 ne sont pas superposables à un effet de type GATA-1. A J1 post infection, GATA-3 et GATA-5 ont en commun de promouvoir l'amplification des BFU-E. Nous n'avons pas obtenu de données sur l'effet de la surexpression de GATA-1 sur la production de BFU-E. Des expériences complémentaires sont donc indispensables pour comparer les effets de GATA-1, -3 et -5 sur ce type de précurseur.

A J4, seul GATA-3 est permissif à la maturation normale des BFU-E. Au moins dans les phases initiales, il est possible d'associer les effets de l'expression forcée de GATA-3 et GATA-5 à un effet de type GATA-2 sur l'amplification des précurseurs (Figure 13, A, D-E). Nous n'avons pas réalisé de surexpression de GATA-2 dans les PH du SV. Comme mentionné ci-dessus, la surexpression de GATA-2 conduit à l'amplification des proérythroblastes (Briegel et

al., 1993). Lors de l'expression forcée de GATA-3 et GATA-5 dans les PH du SV, le même type d'effet est observable pour les PH-GATA-5⁺. Alors que les BFU-E sont amplifiées au début de la culture, la différenciation terminale est bloquée.

Dans les PH transduits, l'expression de GATA-3 et GATA-5, sous le contrôle des LTR n'est à priori pas soumise à la régulation. Leurs effets sur la prolifération des BFU-E est attribuable à leur capacité à se fixer sur les promoteurs des gènes cibles de GATA-2. Dans les PH-GATA-5⁺, contrairement aux PH-GATA-3⁺, GATA-1 ne serait plus capable d'interférer avec l'effet activateur « de type GATA-2 ». Dans les PH-GATA-3⁺, la différenciation érythroïde est normale, suggérant que GATA-3 est capable d'induire l'expression de GATA-1 et de GATA-2, ou de se substituer à leur fonction. Dans ces conditions, les mécanismes d'inhibition de l'expression de GATA-2 par GATA-1 ne sont pas perturbés et l'effet sur la prolifération est lié à la dose de GATA-3 initialement présente dans les précurseurs immatures.

Par ailleurs, la surexpression de GATA-2 induit une différenciation mégakaryocytaire dans une lignée érythroblastique (Ikonomi et al., 2000). Dans nos expériences d'expression forcée de GATA-3 ni le nombre de précurseur mégakaryocytaire, ni le pourcentage de cellules CD41⁺/CD42⁺ ne sont modifiés.

Il résulte de cet ensemble d'observation que GATA-3 dans le lignage érythroïde exerce une action qui lui est propre (Figure 13E), c'est-à-dire une amplification des précurseurs, sans altération de leur potentiel de différenciation.

Effet de GATA-3 dans le lignage myéloïde

L'expression forcée de GATA-3 favorise la production des précurseurs mastocytaires. Contrairement au lignage érythroïde où GATA-3 n'est pas exprimé, GATA-3 est exprimé dans le lignage mastocytaire au moment de la différenciation. De plus, GATA-1 et 2 sont également exprimés dans ce lignage (Zon et al., 1991a). De façon intéressante, dans ce contexte, la surexpression de GATA-3 conduit aux mêmes effets que dans le lignage érythroïde, c'est-à-dire à une augmentation de la prolifération sans blocage, ni modification de la cinétique de différenciation. Dans ce lignage, GATA-2 est de nouveau exprimé par les précurseurs immatures (Jippo et al., 1996). On peut donc supposer que les modalités d'action de GATA-3 puissent passer initialement par un effet « de type GATA-2 ».

Effet de GATA-3 dans les précurseurs immatures

Dans les cultures de PH-GATA-3⁺, les précurseurs myéloïdes multiples sont amplifiés dès le début de la culture. Par contre, à J8 post infection, ils ne sont plus présents que dans les cultures de SV transduits par GATA-3. Par ailleurs, le nombre de précurseurs érythromyéloïdes n'est pas

modifié à J1 et J4 post-infection, mais il est maintenu tout au long de la culture. En conséquence, ces précurseurs érythromyéloïdes sont toujours présents à J8 post-infection dans les cultures issues de PH-GATA-3⁺, alors qu'ils ont disparu avant J8 des cultures témoins.

GATA-3 semble donc capable de maintenir un contingent de précurseurs immatures dans le SV. Cet effet s'ajoute à celui qui est exercé sur la prolifération, puisque le nombre de précurseurs érythromyéloïdes n'est pas significativement augmenté dans les premières étapes de la culture. En d'autres termes, GATA-3 agit initialement sur les précurseurs les plus immatures puisqu'il est capable de maintenir les précurseurs érythromyéloïdes au moins jusqu'à J8. Ces précurseurs s'engagent alors dans la différenciation et deviennent les cibles du second effet de GATA-3 qui consiste à les amplifier sans modifier leur différenciation terminale.

Nature des précurseurs cibles de GATA-3

L'analyse phénotypique des cultures de PH-GATA-3⁺ à J4 a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence l'action de ce facteur sur la prolifération des précurseurs hématopoïétiques (augmentation de la fraction c-kit⁺/CD31⁺/CD41⁺/CD45⁺). Dans ces mêmes cultures, il est également possible de mettre en évidence une augmentation du pourcentage de cellules correspondant à un phénotype mésodermique/pré-hématopoïétique (CD45⁻/CD31⁺/c-kit⁻ et CD45⁻/CD31⁺/c-kit⁺). Nous devons tester la capacité de ces cellules à effectuer une différenciation hématopoïétique après leur mise en culture sur stroma OP9, qui permet la différenciation des cellules mésodermiques. Néanmoins, il est possible d'émettre une hypothèse quant à la signification de l'augmentation de la taille de cette population cellulaire. Dans la MO, le contingent de CSH est établi et leur engagement dans la différenciation dépend principalement de contraintes liées au maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique. Dans le SV, au début du développement, ces contraintes (demande en cellules différenciées) sont extrêmes. On observe d'ailleurs, une différenciation accélérée des PH, en particulier dans la voie érythroïde.

Une fonction possible de GATA-3 serait de compenser l'appauvrissement en précurseurs imposé par la « demande » en cellules différenciées. L'absence de GATA-3 dans le SV pourrait, dans cette hypothèse, être à l'origine de l'épuisement de la production de cellules différenciées dans ce site. Cependant, nos premières expériences de reconstitution ne montrent pas de différence de maintien *in vivo*. D'autre part, le potentiel de différenciation n'est pas qualitativement modifié. Dans les précurseurs hématopoïétiques à ce stade de développement, nous ne pouvons donc pas associer directement l'expression de GATA-3 à l'ensemble des propriétés des CSH. Il est possible que l'effet de GATA-3 puisse être différent en ciblant spécifiquement des précurseurs plus précoces, par l'électroporation *in situ*. Ces expériences, couplées à l'analyse des

potentialités des « cellules de types mésodermique/pré-hématopoïétiques » conservées dans les cultures de PH-GATA-3, nous permettrons de raffiner les données obtenues jusqu'à présent.

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour, montre cependant que l'expression ectopique de GATA-3 dans le SV pourrait conduire à l'acquisition d'une des propriétés des CSH qui est de maintenir le contingent des précurseurs.

IV/ Matériel et méthodes

a) Souris et embryons

Les embryons sont obtenus en croisant des mâles et des femelles C57BL/6. La présence du bouchon vaginal signale le début de la gestation, compté comme 0,5 jours de gestation (jdg). Après avoir sacrifié les souris gestantes par dislocation cervicale, les embryons sont prélevés, l'enveloppe musculaire utérine est retirée et l'embryon est dégagé de ses annexes. Le SV est disséqué suivant le protocole décrit dans Résultats, Partie III, article 3. Le stade de développement des embryons est donné par comptage du nombre de somites à partir de 8 jdg, et selon les critères définis par Downs et Davis (1993) pour les stades présomitiques (EHF : bourrelets neuraux précoces et LHF : bourrelets neuraux tardifs). A 10,5 jdg, la région AGM est disséquée comme décrit dans Résultats, Partie III, article 3 et le stade de développement est précisé par comptage du nombre de somites (entre 30 et 40 somites).

b) Production des surnageant rétroviraux

Des cellules de la lignée 293 HEK sontensemencées dans des boîtes de culture de 100 mm de diamètre (12×10^6 cellules) dans le milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF). Le jour suivant, les cellules (entre 30 et 40 % de confluence) sont co-transfectées avec le vecteur d'intérêt (MPI, MPI-GATA-3 ou MPI-GATA-5) et les plasmides pCMV-GagPol et pCMV-ENV pour produire les particules virales. Dès 48 heures post-infection et jusqu'à 96 heures, les surnageants sont prélevés deux fois par jour, filtrés (0,2 μ m) et concentrés (CentriconPlus-20 ; MICON Bioseparation), avant d'être aliquotés et stockés à -80°C. La titration des surnageant (1 μ l) est effectuée par transduction de cellules 3T3 (10^5 cellules par puits d'une plaque 6 puits) en présence de 4 μ g/ml de polybrène. Après 4 jours de culture, le pourcentage de cellules exprimant la GFP est analysé en cytométrie de flux.

c) Culture organotypique de Sac Vitellin

Les SV sont prélevés avant circulation (0-3S) et mis en culture en plaque 6 puits contenant 2 mL de milieu Opti-MEM complémenté avec 10 % de SVF, mais sans cytokines. Les explants isolés sont incubés à 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 1 jour.

d) Infection rétrovirale

Après un jour de culture organotypique pour les SV, ou directement après prélèvement pour les AGM, les explants sont dissociés et ensemencés en plaque 48 puits dans 1 ml de milieu Opti-MEM®+Glutamax™ (Gibco™, Life Technology) + 10% SVF, 0,1% pénicilline et streptomycine et 5.10⁻⁵M de 2-mercaptoéthanol. Le milieu de culture est complémenté avec du Stem Cell Factor (100 ng/ml), de l'interleukine 7 (50 U/mL), de l'érythropoïétine (EPO), à 10³ U/mL, et du ligand de Flt-3 (20 ng/mL). Le surnageant est ajouté au milieu de culture pour obtenir une concentration finale égale à une particule virale par cellule avec 4 µg/ml de polybrène. Après 12 heures d'infection, les cellules sont triées sur l'expression de la GFP et ensemencées sur le stroma OP9 comme décrit ci-dessous.

e) Culture sur stroma OP9

Les cellules triées sont mises en culture à 37°C sous 5 % de CO₂ sur une monocouche de cellules stromales OP9 (10⁴ cellules par puits d'une plaque 12 puits) dans le milieu OptiMEM décrit ci-dessus. Après quatre jours de culture, les cellules transplantées sur un nouveau stroma et le milieu est changé. Pour les cultures destinées à révéler un potentiel lymphoïde B, les cellules sont cultivées en présence uniquement d'interleukine 7 (50 U/mL) et du ligand de Flt-3 (20 ng/mL).

f) Marquage des cellules en apoptose par la méthode tunnel

Les marquages sont effectués sur 10⁵ cellules issues des cultures infectées par MPI, MPI-GATA-3 ou GATA-5 à J4 post infection. Des cytocentrifugations sur lames sont réalisées (1 min à 500 rpm) et séchées pendant 5 min à température ambiante avant stockage à -20°C. Les lames décongelées sont séchées pendant 15 min à température ambiante, fixées 10 minutes dans du paraformaldéhyde à 4%, et perméabilisées 2 min dans une solution de Triton à 0,1%. La fragmentation de l'ADN, consécutive à l'apoptose, est détectée en utilisant l'activité de la terminale transférase en présence de dUTP biotynilés. Les fragments d'ADN néosynthétisés sont détectés après couplage de la biotine à une streptavidine-peroxydase révélée par le substrat DAB (protocole décrit dans le kit ApopDETEK® de chez Enzo).

g) Analyse en cytométrie de flux

A différents temps au cours de la culture, les cellules sont préparées comme décrit ci-dessous. Pour le phénotypage de la progénie des cellules triées, le contenu des puits est prélevé. Après centrifugation (900g pendant 10 minutes), la première étape du marquage consiste à incuber les cellules pendant 10 minutes à 4°C avec des anticorps bloquant l'activité Fc (CD16/CD32 ; FcBlock ; Pharmingen). Après un nouveau lavage, les cellules sont incubées dans 30 µL de la solution d'anticorps à l'obscurité pendant 20 min à 4°C. La plupart des anticorps utilisés, provenant de Pharmingen, sauf indication contraire, sont directement couplés à un fluorochrome : CD45-PE (30F11), CD31-PE (MEC13.3), CD42-PE (Xia.G5 ; M-Fret), c-kit-APC (2B8), CD4-PE (L3T4), CD8-APC (Ly-2), CD19-PE (ID3), B220-APC (RA3-6B2), CD45.1 Ly5.1 (A20.17) et CD45.2 Ly5.2 (104.2). Les anticorps dirigés contre CD41 (MWreg30) et FcεR1α (MAR-1, E-bioscience) sont biotinylés et sont révélés par couplage avec une streptavidine (couplée à l'APC, au PECy7 ou au Cy7), pendant 10 min à 4°C, après le lavage des cellules. Immédiatement avant le début de l'analyse, les cellules mortes sont marquées par l'intermédiaire du DAPI. L'acquisition des données est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux (LSRII ou FACS calibur). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel CellQuest Pro.

h) Analyse du potentiel clonogénique et culture en méthylcellulose

Après transduction, le potentiel clonogénique des cellules GFP⁺ issues de SV ou d'AGM, cultivés sur stroma OP9, est analysé en culture en méthylcellulose (comme décrit dans Résultats, Partie II, Article 1). Les cellules sont ensemencées en triplicat à 1000 cellules par puits. Les cultures, placées à 37°C sous 5 % de CO₂, sont analysées au cours de la culture pour dénombrer les différents types de colonies (CFU-E à J3 et J7 pour les autres types de colonies). Le nombre de colonies est ensuite rapporté en colonies par explants.

i) Analyse du potentiel de différenciation T : Culture en FTOC

Des lobes thymiques d'embryons de 14 jdg issus de souris C57Bl/6 Ly5.1 sont irradiés (2500 rad). Les cellules à tester, provenant d'embryon C57Bl/6 Ly5.2, sont cultivées en goutte pendante avec ces lobes, en plaque de Térasaki pendant un jour, pour permettre la colonisation du lobe thymique (10⁴ cellules par lobe). Les lobes sont cultivés 14 jours en culture organotypique sur des filtres placés sur du milieu Opti-MEM®I+Glutamax™ + 10% SVF, 0,1% pénicilline et streptomycine et 5.10⁻⁵M de 2-mercaptoéthanol. A l'issue de la culture, les lobes sont dissociés et analysés en cytométrie de flux au moyen des anticorps CD8 et CD4, selon le protocole précédemment décrit, dans la fenêtre donneur, définie par le marquage CD45-Ly5.2.

j) Analyse du potentiel *in vivo* :

Test des colonies spléniques (CFU-S) : Des souris C57Bl/6 Ly5.1 létalement irradiées sont injectées via le sinus rétro-orbital avec des cultures de sac vitellin, cultivées quatre jours sur stroma OP9 (1 équivalent-SV, provenant d'embryon C57Bl/6 Ly5.2). A 10 ou 12 jours post irradiation les souris sont sacrifiées, les rates sont prélevées et fixées au liquide de Bouin. Le nombre de colonies spléniques est alors compté.

Analyse du potentiel de reconstitution *in vivo* : Des souris Rag2^{-/-}γC^{-/-} (Ly5.1), sont irradiées sublétalement (650 rad) et injectées avec 2,5 sac vitellin équivalent, provenant d'embryon C57Bl/6 Ly5.2. A 1, 2 et 3 mois, 200 µl de sang sont prélevés et le taux de chimérisme est analysé en cytométrie en flux après marquage avec les anticorps Ly5.1 et Ly5.2. Après une lyse ACK des cellules rouges, les cellules sont lavées et marquées selon le protocole précédemment décrit.

Résultats 3^{ème} partie

Article n°1

Articles en collaborations

Contributions à des ouvrages

Inhibition of Angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells

S. Charrier, A. Michaud, S. Badaoui, S. Giroux, E. Ezan, F. Sainteny, P. Corvol, W.Vainchenker.

I/L'effet radioprotecteur d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I sur l'hématopoïèse passe par la voie de l'angiotensine II

Participation dans le cadre d'un projet de recherche à l'unité INSERM 362/790, Institut Gustave Roussy à Villejuif.

Introduction : Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IEC) peuvent moduler le niveau plasmatique de plusieurs régulateurs de l'hématopoïèse, via plusieurs substrats de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I que sont l'angiotensine II, la bradykinine et l'AcSDKP. Après avoir démontré l'effet protecteur du périndopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, sur le tissu hématopoïétique dans des modèles murins d'irradiation non létale et létale, il nous a semblé intéressant d'étudier le mécanisme d'action impliqué en utilisant AcSDKP ou le Telmisartan qui est un antagoniste du récepteur AT1 de l'angiotensine II.

Résultats : La reconstitution hématopoïétique a été étudiée de J1 à J30 chez les souris B6D2F1 après irradiation corporelle totale à la dose létale de 8,3 Gy, et l'évaluation de la survie a été effectuée de J1 à J48. AcSDKP (7,2 µg par souris) a été injecté à raison de 2 injections par jour pendant 3 jours en commençant 48 heures avant l'irradiation. Le périndopril (Coversyl®) et le telmisartan (Micardis®) ont été injectés par voie sous-cutanée à la dose de 30 mg/kg/injection à raison de 2 injections par jour, pendant 4 jours et en commençant 48 heures avant l'irradiation. Le groupe témoin a été irradié à la même dose et a reçu de l'eau en injection sous-cutanée. Les irradiations induisent une toxicité hématologique avec un nadir pour la moelle à J3, les polynucléaires neutrophiles à J7, les plaquettes à J10 et les globules rouges à J18. La durée et la profondeur de l'aplasie sont dose-dépendantes.

Après traitement par périndopril ou telmisartan, une augmentation significative de la survie a été observée chez les souris irradiées par rapport aux souris seulement irradiées ou traitées avec AcSDKP ($p < 0.001$). Nous avons observé un taux de survie à J30 de $40 \pm 9,05$ % pour les souris irradiées, $53,3 \pm 9,1$ % pour les souris irradiées et traitées avec AcSDKP, versus $96,3 \pm 3,6$ % pour les souris irradiées traitées avec périndopril et 100 % pour les souris irradiées et traitées avec Telmisartan. Comme pour le périndopril, nous avons également observé une reconstitution hématologique périphérique plus rapide pour les plaquettes et les globules rouges chez les souris irradiées et traitées par Telmisartan, par rapport aux souris seulement irradiées. Ces résultats

suggèrent que l'effet hémoprotecteur induit par les IEC agit par la voie de l'angiotensine II et non par la voie d'AcSDKP.

blood

2004 104: 978-985
Prepublished online Apr 22, 2004;
doi:10.1182/blood-2003-11-3828

Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells

Sabine Charrier, Annie Michaud, Sabrina Badaoui, Sébastien Giroux, Eric Ezan, Françoise Sainteny, Pierre Corvol and William Vainchenker

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/104/4/978>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:
[Hematopoiesis](#) (2297 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>



Inhibition of angiotensin I–converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells

Sabine Charrier, Annie Michaud, Sabrina Badaoui, Sébastien Giroux, Eric Ezan, Françoise Sainteny, Pierre Corvol, and William Vainchenker

Angiotensin I–converting enzyme (ACE) inhibitors can affect hematopoiesis by several mechanisms including inhibition of angiotensin II formation and increasing plasma concentrations of AcSDKP (acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro), an ACE substrate and a negative regulator of hematopoiesis. We tested whether ACE inhibition could decrease the hematopoietic toxicity of lethal or sublethal irradiation protocols. In all cases, short treatment with the ACE inhibitor perindopril protected against irradiation-induced death. ACE inhibition accelerated hematopoietic recovery and

led to a significant increase in platelet and red cell counts. Pretreatment with perindopril increased bone marrow cellularity and the number of hematopoietic progenitors (granulocyte macrophage colony-forming unit [CFU-GM], erythroid burst-forming unit [BFU-E], and megakaryocyte colony-forming unit [CFU-MK]) from day 7 to 28 after irradiation. Perindopril also increased the number of hematopoietic stem cells with at least a short-term reconstitutive activity in animals that recovered from irradiation. To determine the mechanism of action involved,

we evaluated the effects of increasing AcSDKP plasma concentrations and of an angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist (telmisartan) on radioprotection. We found that the AT1-receptor antagonism mediated similar radioprotection as the ACE inhibitor. These results suggest that ACE inhibitors and AT1-receptor antagonists could be used to decrease the hematopoietic toxicity of irradiation. (Blood. 2004;104:978-985)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

Irradiation and most chemotherapies result in marked hematopoietic toxicity by destroying hematopoietic progenitors, leading to bone marrow failure. The recent development of autografts from mobilized peripheral blood stem cells has led to more intensive therapy and reduced toxicity by providing cell support while awaiting marrow reconstitution. These procedures, however, are expensive and not always feasible.

Negative regulators of hematopoiesis may act as potent myeloprotectors by mediating G0/G1 arrest.¹⁻⁶ In this way, they may prevent DNA breakage during the S phase and subsequent apoptosis. One of these negative regulators, the tetrapeptide AcSDKP (acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro), has been evaluated in preclinical studies.⁷⁻¹² The clinical application of this peptide has, however, been limited by its short half-life, due to its rapid degradation by an endogenous peptidase, angiotensin I–converting enzyme (ACE), the key molecule of the renin-angiotensin system.¹³⁻¹⁵

The renin-angiotensin system is an important determinant of vascular and fluid homeostasis as well as blood pressure regulation.¹⁶ In addition, it regulates cellular growth in a variety of tissues through its principal effector, angiotensin II, and its 2 receptors, AT1 and AT2.¹⁷ ACE is a tissue-bound enzyme with 2 catalytic domains. It converts angiotensin I into angiotensin II and can cleave other peptides such as bradykinin and AcSDKP.¹⁸ AcSDKP is almost exclusively degraded by the N-terminal domain of ACE,¹⁵ whereas the other substrates are almost equally cleaved by the 2

ACE domains.¹⁹ ACE inhibitors inhibit the formation of angiotensin II and prevent the degradation of AcSDKP thus increasing its concentration in plasma and urine.^{20,21} Thus, pharmacologic inhibition of ACE strongly affects the concentrations of AcSDKP and angiotensin II, 2 molecules involved in hematopoiesis. Indeed, angiotensin II not only synergizes the effects of erythropoietin on erythroid progenitors but also affects myeloid progenitor growth. Angiotensin II receptors (type AT1) have been detected on both erythroid and CD34⁺ cells.^{22,23}

ACE inhibitors prevent the entry of murine hematopoietic stem cells into the cell cycle after irradiation²⁴ and inhibit the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in long-term bone marrow culture.^{25,26} Thus, pharmacologic inhibition of ACE may interfere with hematopoiesis.

To determine whether ACE inhibitors can prevent myelotoxicity, we evaluated the radioprotective effect of an ACE inhibitor, perindopril, on survival and on bone marrow hematopoiesis in a mouse model after lethal and sublethal doses of irradiation. To dissect the mechanisms by which ACE inhibition mediates this myeloprotection, we investigated the effects of 3 molecules on radioprotection: (1) AcSDKP; (2) RXP 407, a selective blocker of the N-terminal catalytic site of ACE involved in AcSDKP hydrolysis but with no or minimal effect on the conversion of angiotensin I into angiotensin II²⁷; and (3) telmisartan, an antagonist of the AT1 receptor.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Hématopoïèse et Cellules Souches, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; INSERM, Pathologie Vasculaire et Endocrinologie Rénale, Collège-de-France, Paris, France; and Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Saclay, Gif-Sur-Yvette, France.

Submitted November 13, 2003; accepted March 22, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, April 22, 2004; DOI 10.1182/blood-2003-11-3828.

Supported by a grant from Servier (Suresnes, France).

Reprints: William Vainchenker, INSERM U362, Hématopoïèse et Cellules Souches, Institut Gustave Roussy PR-1, 39/53, Rue Camille Desmoulins, 94 805 Villejuif Cedex, France; e-mail: verpre@igr.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology

Materials and methods

Mice

Specific pathogen-free female (C57BL/6J × DBA2) F1 mice, weighing 20 to 22 g, were purchased from Janvier CERJ (Le Genest-St-Isle, France) and quarantined in our institute for at least 7 days prior to use. Mice received commercial rodent food and neutral pH water ad libitum. Mice were handled and housed in accordance with French laws for animal experimentation (Decree 87-848; October 19, 1987).

In vivo treatments

Mice were placed in ventilated plexiglas containers and exposed to an x-ray source at a dose rate of 0.43 Gy/minute. Mice were exposed (total body irradiation [TBI]) to a single dose of 5 or 7 Gy (nonlethal protocol) or to a single dose of 8.3, 8.7, 9.1, 9.5, or 10 Gy (a lethal protocol). Placebo (water) or perindopril was administered subcutaneously at 10, 30, or 90 mg/kg twice a day for 4 days starting 48 hours before the irradiation (Figure 1A). This protocol was based on that already reported for the protective effect of AcSDKP in a model of doxorubicin-induced myelotoxicity.¹² To check the specificity of perindopril, we tested an inactive isomer of perindoprilate (the active metabolite of perindopril). The enantiomer (S-11579), kindly given by the Servier Institute (Suresnes, France), was administered at the dose of 30 mg/kg in the same conditions as perindopril. RXP 407, a selective blocker of the N-terminal ACE catalytic site, and telmisartan, an antagonist of AT1 receptors, were administered subcutaneously at 30 mg/kg twice a day for 4 days starting 48 hours before the irradiation (the same schedule as for perindopril). AcSDKP was administered subcutaneously, as previously described,¹² at 7.2 μg/mouse, twice a day for 3 days starting 48 hours before irradiation.

Peripheral blood analysis

Each mouse was anesthetized with isoflurane and then bled by retro-orbital puncture from day 3 (d3) to day 38 (d38). Blood (90 μL) was collected in vials containing 10 μL of 3.8% trisodium citrate solution. Lymphocytes, neutrophils, red blood cells, and platelets were counted automatically on a MS-9 Vet hematology analyzer (Melet Schloesing, Cergy-Pontoise, France).

Bone marrow analysis

After isoflurane anesthesia, mice were killed by cervical dislocation and their femurs and tibiae removed. Flushed bone marrow cells (5×10^4) were plated in 1 mL methyl-cellulose medium (MethoCult M3134; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with recombinant

cytokines (interleukin 3 [IL-3] 10 ng/mL, thrombopoietin [TPO] 10 ng/mL, and erythropoietin [EPO] 2 U/mL) for colony assays of murine cells. Duplicate cultures were incubated for 7 days at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Erythroid burst-forming unit (BFU-E) and megakaryocyte colony-forming unit (CFU-MK) assays were performed in a fibrinogen-based serum-free medium. Briefly, fibrinogen (F8630; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) was added (1 mg/mL) immediately before plating the cells with the serum-free medium consisting of Iscove modified Dulbecco medium (IMDM) plus deionized bovine serum albumin (BSA; 15 mg/mL), calcium chloride (370 ng/mL), L-glutamine (2×10^{-3} M), asparagine (20 μg/mL), β-mercaptoethanol (10^{-4} M), lipid mixture (40 ng/mL, including cholesterol, oleic acid, and phosphatidyl choline), human insulin (10 ng/mL; Sigma, St Louis, MO), and transferrin (300 μg/mL; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The serum-free medium was supplemented with a cytokine cocktail containing 10 ng/mL TPO, 1 U/mL EPO, 10 ng/mL IL-3, and 25 ng/mL stem cell factor (SCF) at final concentrations. After 7 days in a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂ in air), cultures were dehydrated and fixed with 5% glutaraldehyde. Megakaryocytic and BFU-E colonies were counted after immunostaining with acetyl cholinesterase and benzidine, respectively.

Short-term repopulating ability of bone marrow cells after reconstitution

To determine whether perindopril was able to protect the hematopoietic stem cell compartment, we compared the repopulating ability of bone marrow cells from perindopril-treated and irradiated mice with that of bone marrow cells from irradiated and untreated mice. Bone marrow cells were obtained from 3 donor mice 46 days after the beginning of irradiation (8.3 Gy) and injected intravenously at concentrations of 1×10^5 , 3×10^5 , and 1×10^6 cells into lethally irradiated recipient mice ($n = 10$ per group; Figure 1B). Recipient mice were exposed to a single dose of 10 Gy using an x-ray source at a dose rate of 0.43 Gy/minute.

Immunophenotyping by flow cytometry

Three months after grafting, the recipient mice were killed and Lin⁻ Sca⁺ c-Kit⁺ cells were identified by indirect and direct immunofluorescence. To obtain the lineage-negative (Lin⁻) fraction, cell suspensions prepared from femurs and tibiae were indirectly stained for 30 minutes at 4°C in the dark by a cocktail of CD45/B220 (clone RA3-6B2), CD4 (clone GK.1.5), CD5 (clone 53-7.3), Ly-6/GR1 (clone RB6-8C5), CD11/Mac-1 (clone M1/70), and TER 119 monoclonal antibodies (Mabs; Pharmingen, San Diego, CA) and revealed by a sheep antirat kappa light-chain phycoerythrin-conjugated immunoglobulin G (IgG). After addition of rat IgG and washes, fluorescent

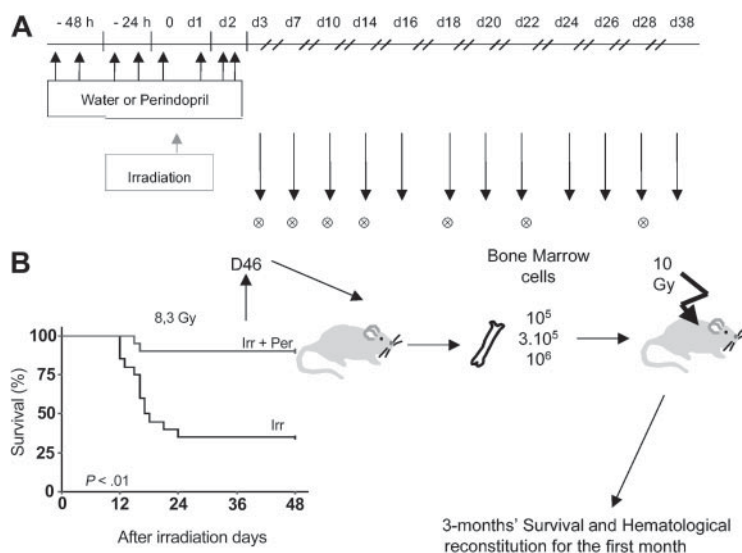


Figure 1. Protocol used to assess survival and hematopoietic recovery. Water or perindopril (10, 30, or 90 mg/kg) was administered (↑) subcutaneously twice a day for 4 days beginning 48 hours before exposure to irradiation (gray arrow; single dose of either 7 Gy [nonlethal regimen] or 8.3, 8.7, or 9.1 Gy [lethal regimen]). (A) Peripheral blood (↓) and bone marrow (⊗) samples were collected every 2 or 3 days. Schematic representation of the experiments used to evaluate the short-term repopulating ability of bone marrow cells after reconstitution by survival and hematopoietic recovery (B). On day 46, bone marrow from 3 mice per group was grafted into 10 lethally irradiated mice.

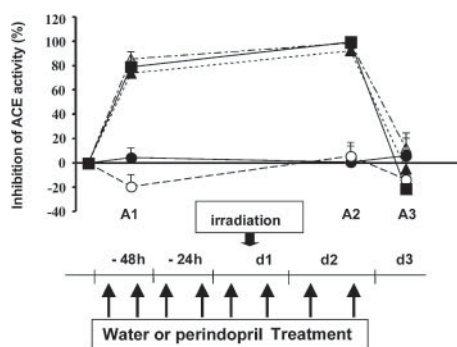


Figure 2. Inhibition of plasma ACE activity by perindopril in mice irradiated with 8.3 Gy. Blood samples were collected from control and irradiated mice before administration of water or perindopril 1 hour after the first administration (A1), 1 hour after the injection on day 2 (A2), and on day 3, 12 hours after the last administration (A3). ACE activity was measured. Results are expressed as the percentage of ACE inhibition compared with water-treated controls. ● indicates water-treated nonirradiated mice; ○, water-treated irradiated mice; ▲, irradiated mice treated with 10 mg/kg perindopril; △, irradiated mice treated with 30 mg/kg perindopril; and ■, irradiated mice treated with 90 mg/kg perindopril. All irradiated mice received a single dose of 7 Gy. Error bars indicate standard deviation.

isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-Sca-1 and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-c-Kit rat Mabs (Pharmingen) were added for 30 minutes at 4°C in the dark. After washing, cells were analyzed on a FACSsort apparatus equipped with a laser and a diode set at 488 nm and 610 nm, respectively. Data were analyzed with Cellquest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

ACE assay

Plasma-ACE activity was measured using Hip-His-Leu (HHL) as a substrate, as previously described.¹⁹ The production of hippuric acid was detected after hydrolysis at 37°C for 30 minutes with 5 μ L plasma. The reaction product was resolved and quantified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC).

Statistical analysis

Results are reported as mean \pm SD and expressed according to the postirradiation day. Survival was recorded daily for 48 days and survival data were analyzed by Kaplan-Meier plots and log-rank tests. Differences in the day-30 survival rate were evaluated by the chi-square test. Hematologic effect was assessed by studying the kinetics of blood cell and hematopoietic progenitor recovery. In each experiment ($n = 5$), blood samples ($n = 3$) were analyzed every 2 days. Differences between the mean values were analyzed by the Kruskal-Wallis test and multiple analysis of variance analysis (MANOVA).

Table 1. Radioprotective effect of perindopril (30 mg/kg) on mice irradiated with 8.3, 8.7, and 9.1 Gy

Irradiation dose	No. of mice	3-day survival rate		P
		Irradiated mice, %	Irradiated mice treated with ACE I, %	
8.3 Gy				
Experiment no. 1	40	25 \pm 9.7	55 \pm 11.1	< .05
Experiment no. 2	40	35 \pm 6.7	90 \pm 10.1	< .001
Experiment no. 3	60	46.7 \pm 9.1	93.3 \pm 4.5	< .001
Experiment no. 4	60	56.7 \pm 9.1	86.7 \pm 6.2	< .01
8.7 Gy				
Experiment no. 5	40	5 \pm 4.9	40 \pm 10.9	< .01
Experiment no. 6	40	30 \pm 10.2	65 \pm 10.7	< .02
9.1 Gy				
Experiment no. 7	40	0 \pm 4.9	20 \pm 11.1	< .001

Each experiment shows the 30-day survival rate of mice after exposure to a single dose of irradiation.

Results

Effect of ACE inhibition on mice survival after irradiation

We first determined the sensitivity of B6D2F1 mice to radiation. Fifty percent of mice were still alive 30 days after receiving 8.3 Gy (LD50/30) and a LD100/30 was obtained at 9.1 Gy. We then determined the subcutaneous dose of perindopril necessary to inhibit plasma ACE activity fully. ACE was fully inhibited 1 hour after administration of 10, 30, and 90 mg/kg perindopril and returned to pretreatment level 12 hours after the last perindopril administration (Figure 2). We found that 10 mg/kg perindopril did not confer significant radioprotection ($P < .08$; Figure 3A), whereas the 2 higher doses (30 mg/kg and 90 mg/kg; Figure 3B-C) induced a marked and highly significant radioprotection with more than 85% of mice still alive 48 days after perindopril treatment ($P < .01$). The inactive isomer of perindoprilate had no radioprotective effect, showing that survival is dependent on ACE activity (data not shown).

To confirm these results, we performed 3 subsequent experiments with 30 mg/kg perindopril (Table 1 experiments 2-4). In all these experiments, perindopril had a significant radioprotective effect. To extend these results, we increased the irradiation dose to 8.7 Gy (Table 1 experiments 5-6) and 9.1 Gy (Table 1, experiment 7) and again found a statistically significant protective effect ($P < .02$ and $P < .001$, respectively). At 9.1 Gy, nearly no mice survived in the control group compared with 20% of those in the perindopril group.

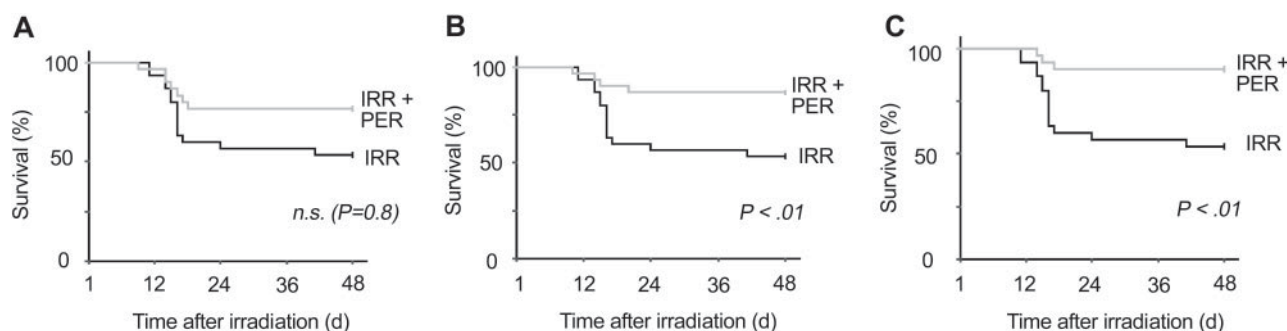


Figure 3. Improvement of survival following treatment of irradiated mice with perindopril. B6D2F1 mice (30 per group) received a single dose of 8.3 Gy plus 10 mg/kg (A), 30 mg/kg (B), or 90 mg/kg (C) of subcutaneous perindopril twice a day for 4 days beginning 48 hours before exposure to irradiation. Survival was scored daily for 48 days. Log-rank tests and survival curves showed that irradiated mice given perindopril survived significantly ($P = .08$, $P < .01$, and $P < .01$ for the 3 doses, respectively) longer than irradiated mice that received water. IRR indicates irradiated; PER, perindopril; and NS, not significant.

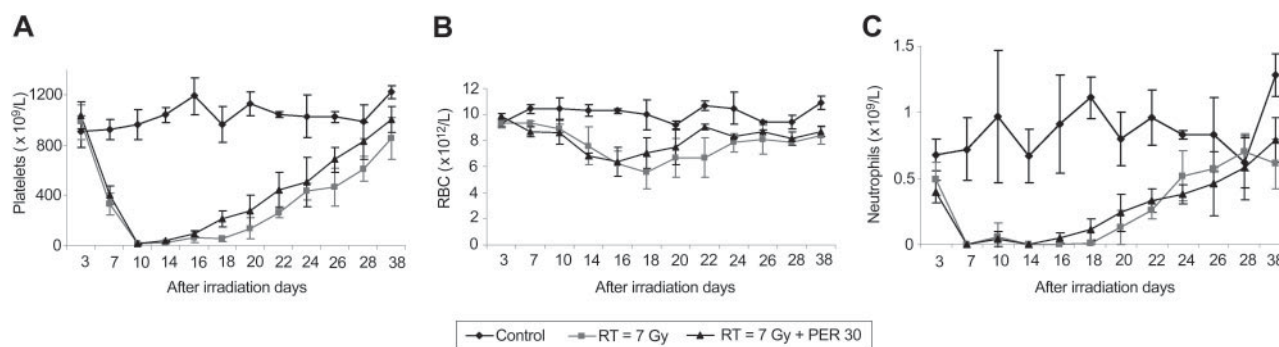


Figure 4. Effects on blood cells following sublethal irradiation. Effects of perindopril on platelet (A), red blood cell (RBC) (B), and neutrophil (C) count following sublethal irradiation. B6D2F1 mice ($n = 30$) received a single dose of 7 Gy or 8.3 Gy plus either a placebo or 10, 30, or 90 mg/kg perindopril. Each data point represents the mean \pm SD of 3 mice per experiment ($n = 6$). The Kruskal-Wallis test was used to compare irradiated and perindopril-treated mice. See Tables 2-3. RT indicates irradiation treated.

The D0 (the dose that increases mouse survival along the exponential part of survival curve to 37% of the control value) was 7.8 Gy for irradiated mice compared with 8.9 Gy for perindopril-treated mice, yielding a DMF (dose-modifying factor, the ratio of the 2 D0 values) of 1.12. In a second set of experiments, we confirmed this DMF value (1.13) with an increase in D0 from 8.1 Gy for irradiated mice to 9.2 Gy for perindopril-treated mice.

Effects of ACE inhibition on hematopoietic recovery in irradiated mice

The lethality of irradiation doses of less than 10 Gy is related to the induction of profound and prolonged pancytopenia: animals usually die from infection or hemorrhage.²⁸ To measure the beneficial effect of perindopril, we determined blood cell counts every 2 or 3 days from 3 to 30 days after irradiation. In these experiments, we used first a nonlethal dose of irradiation (7 Gy) to avoid a possible bias in the results induced by the fact that only some mice survived when a sublethal irradiation protocol is used. At 10 mg/kg of perindopril, no significant effect was observed on platelet or red blood cell counts. This concentration also had no effect on survival. However, 30 or 90 mg/kg perindopril significantly accelerated platelet recovery (Figure 4A). A slight but significant effect was also observed on red blood cells for perindopril-treated irradiated mice compared with placebo-treated mice nonirradiated mice (Figure 4B; $P < .05$). In contrast, none of the doses of perindopril had any effect on the polymorphonuclear blood cell (PMN) count (Figure 4C). However, as the number of PMNs in the blood of mice is low in steady-state conditions and as most PMNs are located in tissues, we cannot rule out the possibility that blood cell counts were unable to detect differences in PMN counts. Similar findings for platelets and red blood cells were obtained when mice were given a lethal dose (8.3 Gy) of irradiation (Tables 2-3).

Table 2. Statistical significance of the effect of perindopril on platelet counts

Experiment no.	Irradiation dose, Gy	Perindopril dose, mg/kg	P
1	7	10	< .08 (NS)
2	7	30	< .001
3	7	30	< .01
4	7	90	< .03
5	8.3	30	< .001
6	8.3	30	< .001

The table shows the number of experiments in which platelet counts were significantly different for the 2 groups.

NS indicates not significant.

We determined the number of bone marrow cells and hematopoietic progenitors (colony-forming cells [CFCs]) every 3 or 4 days from day 3 until day 28 after irradiation in mice that received 7 Gy with or without 30 mg/kg perindopril. In both cases, the numbers of bone marrow cells and hematopoietic progenitors were markedly reduced by irradiation ($23 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ bone marrow cells/leg in normal mice versus $0.74 \times 10^6 \pm 0.17 \times 10^6$ bone marrow cells/leg in mice 3 days after irradiation and $51\,587 \pm 7108$ CFCs/leg in normal mice versus 367 ± 129 CFCs/leg in mice 3 days after irradiation). Perindopril induced a slight but significant increase in the total number of bone marrow cells (Figure 5A; $P < .01$). Results were also significant when all types of myeloid progenitors (Figures 5B-D) were included (2- to 3-fold increase; $P < .01$). Interestingly, under perindopril, the number of CFU-MKs (Figure 5D) increased to a greater extent than the number of other progenitor types. This was visible as early as day 7 after irradiation ($P < .01$). This increase in CFU-MKs following perindopril treatment preceded the increase in platelet count by about 4 or 5 days (Figures 4A and 5D).

ACE inhibition preserves short-term reconstituting cells (STRCs) following irradiation

As irradiation alters the hematopoietic stem cell (HSC) compartment, we evaluated the hematopoietic reconstituting activity of bone marrow cells from irradiated (8.3 Gy) mice treated or not with perindopril (30 mg/kg) in a radioprotective assay. Bone marrow cells from irradiated mice pretreated or not by perindopril were recovered after a complete normalization of their blood count (ie, 4 weeks after irradiation). Bone marrow cells from nonirradiated mice were used as control. Bone marrow cells (10^5 , 3×10^5 , and 10^6) from nonirradiated or irradiated mice treated with or without perindopril were injected into lethally irradiated mice (10 Gy).

Table 3. Statistical significance of the effects of perindopril on RBC counts

Experiment no.	Irradiation dose, Gy	Perindopril dose, mg/kg	P
1	7	10	NS
2	7	30	< .02
3	7	30	< .04
4	7	90	< .05
5	8.3	30	< .001
6	8.3	30	< .05

The table shows the number of experiments in which RBC counts were significantly different for the 2 groups.

NS indicates not significant.

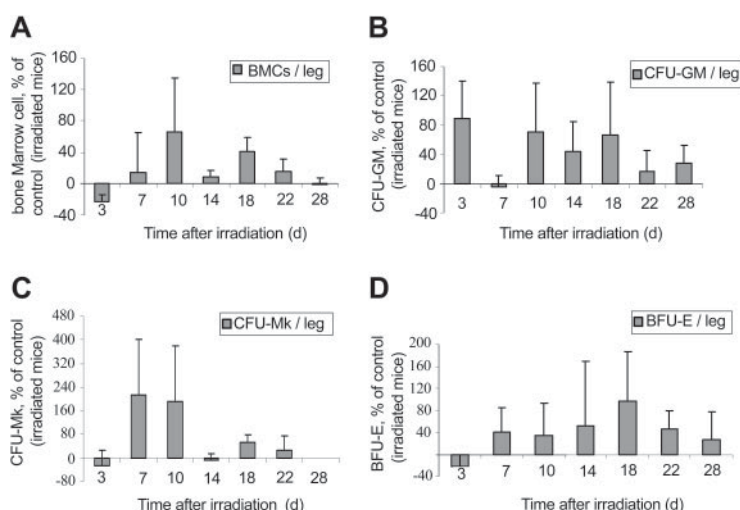


Figure 5. Perindopril improves the recovery of bone marrow cells and hematopoietic progenitor cells following sublethal irradiation. B6D2F1 mice ($n = 30$) received a single dose of 7 Gy and received placebo or perindopril (30 or 90 mg/kg). In each experiment, mice ($n = 3$) were killed at different times and bone marrow was collected and pooled to perform colony assays. Results are expressed as the percentage of increase for these 2 parameters compared with irradiated mice. Cell counts in irradiated mice and perindopril-treated mice were compared using Student *t* test. Total cell counts (A; $P < .001$), CFU-GM counts (B; $P < .001$), CFU-MK counts (C; $P < .01$), and BFU-E counts (D; $P < .02$) were significantly higher in perindopril-treated irradiated mice than in placebo-treated irradiated mice. BMCs indicates bone marrow cells. Error bars represent SD.

Complete radioprotection was observed when 3×10^5 cells were injected (Figure 6A). In contrast, 1×10^6 cells from non-perindopril-treated irradiated mice were necessary to obtain the same degree of radioprotection. The frequencies of competitive repopulating units (CRUs) in bone marrow from control mice, irradiated mice, and perindopril-treated mice were 1 per 19 000, 1 per 168 000, and 1 per 67 000, respectively (Figure 6B). This result clearly shows that perindopril preserves STRCs (2.5-fold more than in untreated irradiated mice).

To validate these data, we compared hematopoietic reconstitution in mice injected with 1×10^6 marrow cells from control mice, irradiated mice, or irradiated and perindopril-treated mice by analyzing the blood cell count at various times (Figure 7). Platelets, neutrophils, and red blood cells recovered more quickly in mice injected with bone marrow cells from perindopril-treated mice than in those that received bone marrow cells from irradiated mice. However, reconstitution was fastest with normal bone marrow cells.

Finally, we used flow cytometry to evaluate the reconstitution of primitive hematopoietic cells (Table 4). Mice injected with bone marrow cells derived from irradiated and perindopril-treated mice had significantly more Lin^- cells than those injected with cells derived from irradiated untreated mice, although the percentage of

Lin^- cells remained lower than in normal mice. Mice grafted with marrow cells from perindopril-treated mice also appeared to contain slightly more cells with a more primitive phenotype, $Lin^- Sca^+ c-kit^+$ (0.14%), than those grafted with bone marrow from irradiated mice ($P < .07$). However, the frequency of the $Lin^- Sca^+ c-kit^+$ cells remained 2-fold lower in mice grafted with marrow cells from mice treated with perindopril than in those grafted with normal bone marrow (0.31%).

An antagonist of the AT1 receptor reproduces the ACE inhibitory effect

To understand the mechanism of perindopril action, we studied the effects of increasing plasma AcSDKP concentration by either AcSDKP infusion or by using RXP 407, an N-domain ACE inhibitor, to block AcSDKP degradation selectively. We also investigated the effect of telmisartan, an antagonist of the AT1 receptor. No significant differences in 30-day survival rate were observed between control irradiated mice ($46.7\% \pm 9.05\%$) and irradiated mice treated with AcSDKP ($53.3\% \pm 9.1\%$; Figure 8A) or RXP407 ($56.6\% \pm 9.1\%$; Figure 8B).

Telmisartan had the same radioprotective effect as perindopril (Figure 8C): telmisartan and perindopril gave a 30-day survival

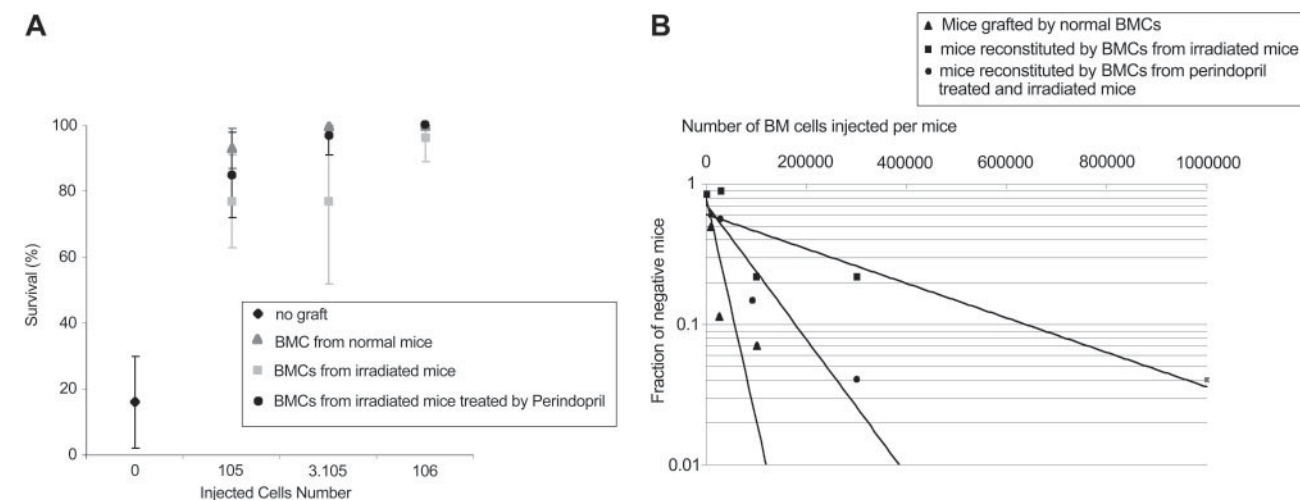


Figure 6. Perindopril improves the short-term repopulating ability of bone marrow cells after reconstitution. Lethally irradiated (10 Gy) mice were intravenously injected with various numbers of BMCs (10^5 , 3×10^5 , 10^6 cells). The survival of the recipients (A) was evaluated until 3 months after grafting. Frequencies of CRUs in murine bone marrow (B) represent the mean of 3 experiments with lethally irradiated mice. Error bars represent SD.

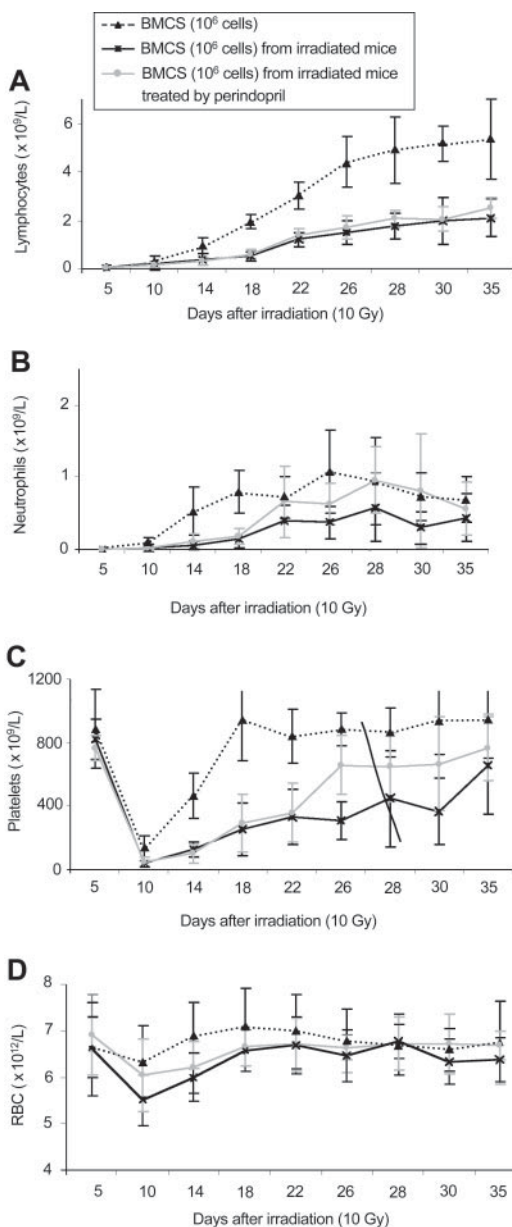


Figure 7. Perindopril improves neutrophil, platelet, and red blood cell recovery following lethal irradiation of grafted mice. B6D2F1 mice ($n = 30$) were irradiated with a single dose of 10 Gy and received 10^6 bone marrow cells from perindopril-treated irradiated mice, irradiated mice, or untreated mice. Each data point represents the mean \pm SD of 9 mice per experiments. The Kruskal-Wallis test was used to compare irradiated mice with perindopril-treated mice: lymphocytes (A; not significant [NS]; $P = .08$), neutrophils (B; $P < .01$), platelets (C; $P < .001$), and red blood cells (D; $P < .03$).

rate of 100% and $96.3\% \pm 3.6\%$, respectively, versus $56.7\% \pm 9.1\%$ for control irradiated mice. These results were confirmed in a second experiment with a 30-day survival rate of 100% for telmisartan, $93.1\% \pm 4.7\%$ for perindopril, and $34.5\% \pm 8.8\%$ for control irradiated mice.

Altogether, these results show that perindopril protects the STRCs from irradiation-related toxicity and that the increase in mice survival is mediated by inhibition of the angiotensin II pathway through the AT1 receptor and that the same effects can be obtained with an AT1 receptor antagonist.

Discussion

Myelosuppression is a major limiting factor in the treatment of cancers by chemotherapy and/or radiotherapy. In this study, we evaluated a novel approach to circumvent this problem by blocking the renin-angiotensin system in a model of ionizing radiation-induced myelotoxicity in mice. First, we tested the effect of perindopril, an ACE inhibitor. Irradiation was chosen for its severe and selective hematopoietic toxicity. Concentrations of perindopril, which totally inhibited plasma ACE activity, significantly protected mice from ionizing radiation toxicity and improved their survival at 3 lethal doses of irradiation (8.3, 8.7, and 9.1 Gy). Moreover, perindopril significantly and reproducibly improved mouse survival in a dose-dependent manner (60 mg/kg/d and 180 mg/kg/d). This improved survival was clearly correlated to reduced hematopoietic toxicity. At sublethal or nonlethal doses of irradiation, ACE inhibition significantly accelerated platelet recovery. The lowest platelet count was similar, but the platelet number was always higher during recovery from day 14 to day 28 in mice treated with perindopril than in irradiated mice. This difference may explain the improved survival because after a lethal irradiation regimen, mice essentially die from intracerebral microhemorrhage.²⁹ In addition, the lowest red blood cell count was also higher in treated mice. No difference was observed for the blood neutrophil count, whereas perindopril had a marked effect on the number of bone marrow cells and the number of granulocyte macrophage colony-forming units (CFU-GMs). This suggests that the neutrophil count in murine peripheral blood is not representative of their total pool. This hypothesis requires further investigations.

In contrast to many types of chemotherapy, ionizing radiation has a major toxic effect on all hematopoietic compartments as shown here by the very low number of bone marrow progenitors following treatment. The rate of hematopoietic recovery for both peripheral blood cells and bone marrow progenitors may be related to protection of the HSC compartment. Indeed, hematopoietic recovery is related to the entry into the cell cycle of some HSCs that

Table 4. Perindopril increases the size of the pool of Lin⁻ cells in the bone marrow of recipient mice irradiated with a sublethal dose 3 months after grafting

	n	% Lin ⁻	% MNC Lin ⁻	% LSK in Lin ⁻ cells	% LSK in total marrow
Control mice	6	5.93 ± 2.1	4 ± 1.33	7.68 ± 2.36	0.31 ± 0.14
Irradiated mice	2	3.24 ± 1.08	2.36 ± 0.74	4.88 ± 0.28	0.12 ± 0.04
Transplantation from normal mice	8	4.82 ± 1.08	3.12 ± 1.33	7.68 ± 2.36	0.31 ± 0.14
Transplantation from irradiated mice	8	3.63 ± 0.54	2.23 ± 0.51	5.08 ± 1.82	0.11 ± 0.05
Transplantation from ACEI treated irradiated mice	8	4.58 ± 1.24	2.84 ± 0.9	5.09 ± 2.05	0.14 ± 0.05
P	NA	NA	.03	NA	.07

B6D2F1 mice ($n = 8$) were irradiated with a single dose of 10 Gy and were injected with BMCs (10^6 cells) from perindopril-treated irradiated mice, irradiated mice, or untreated mice.

Each data point represents the mean \pm SD of 8 mice by experiments. The Student *t* test was used to compare irradiated mice with perindopril-treated mice.

MNC indicates mononuclear cell; LSK, Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺; and NA, not applicable.

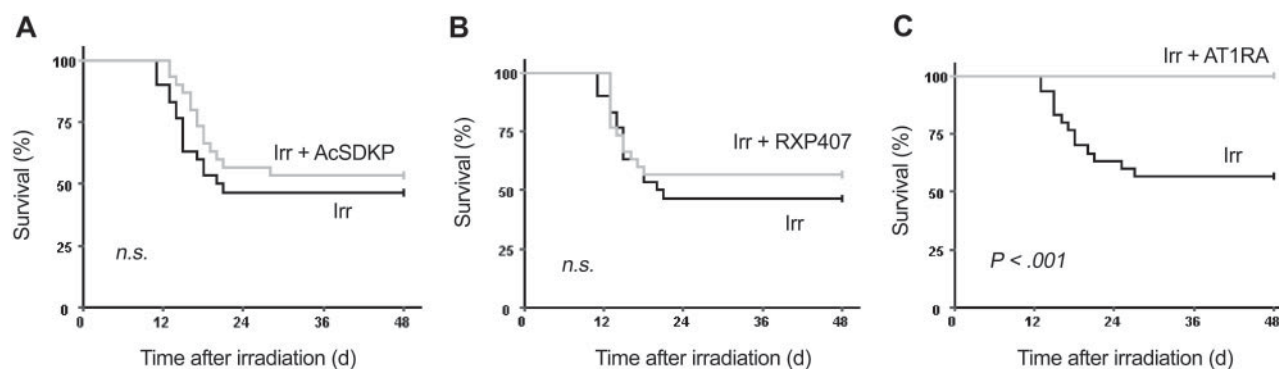


Figure 8. AT1-receptor blockade reproduces the effects of ACE inhibition on mouse survival. B6D2F1 mice (30 per group) received a single dose of 8.3 Gy plus AcSDKP (A), RXP407 (B), or telmisartan (C). RXP407 and telmisartan were injected subcutaneously twice a day for 4 days beginning 48 hours before irradiation. AcSDKP was administered by subcutaneous route twice a day for 3 days beginning 48 hours before the single exposure. Survival was scored daily for 48 days. Log-rank tests with survival curves showed that telmisartan-treated irradiated mice survived significantly longer ($P < .001$) than untreated irradiated mice. Irr indicates irradiated.

both self-renew and differentiate to rescue the different hematopoietic compartments. However, HSCs appear to have limited self-renewal capacities³⁰ and it has been shown that the stem cell pool is never entirely reconstituted after a graft with a limited number of stem cells or after a toxic insult.³¹ This may explain the additive toxicity of successive chemotherapy regimens on hematopoiesis. To investigate whether ACE inhibition could also protect the HSC compartment, we evaluated the short-term bone marrow reconstitutive activity of progenitor cells from mice whose blood count had returned to normal after irradiation. We found that perindopril increased this reconstitutive activity by about 3-fold compared with the control irradiated mice. However, the activity remained lower than in normal mice. This result correlates with the number of cells with a primitive phenotype ($\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{c-kit}^+$) found in the bone marrow of recipient mice. In these experiments, bone marrow cells from perindopril-treated and irradiated mice had the greatest radioprotective effect. They also seem to have greater long-term reconstitutive activity as shown by the blood cell counts after reconstitution of irradiated mice. These results suggest that perindopril exerts a protective effect on HSCs and could diminish the toxicity induced by successive chemotherapy or radiotherapy regimens by preserving short-term reconstitutive activity.

Several mechanisms may account for the effect of perindopril. First, AcSDKP, whose plasma concentration is markedly increased by ACE inhibition,^{7,20} exerts a direct myeloprotective effect.¹² This does not seem to be the case as neither administration of AcSDKP nor administration of RXP407, both of which selectively increase the plasma AcSDKP concentration without altering angiotensin II concentration, improved the survival of irradiated mice. It has already been demonstrated that AcSDKP is unable to decrease irradiation-induced mortality. In contrast, AcSDKP treatment is able to reduce doxorubicin-induced lethality. However, doxorubicin has a milder hematopoietic toxicity than irradiation. Thus, mortality following doxorubicin treatment may be mediated by nonhematopoietic toxicity.¹ Therefore, in our irradiation protocol, ACE inhibition exerted its hemoprotective effect through a mechanism other than an increase in AcSDKP concentration. The main physiologic role of ACE is the conversion of angiotensin I into angiotensin II, which apart from its effects on blood pressure, behaves as a cell growth factor. There is also increasing evidence that angiotensin II plays a role in the

regulation of hematopoiesis. It has been clearly demonstrated that angiotensin II acts synergistically with erythropoietin on erythroid progenitors²³ and may also affect other hematopoietic lineages.^{22,32} To check whether the renin-angiotensin system itself is involved in ACE inhibition, we inhibited the effect of angiotensin II by using an AT1-receptor antagonist, telmisartan. AT1-receptor blockade induced a marked increase in mice survival similar to that observed with perindopril. Therefore, the radioprotective effect induced by ACE inhibition seems to be essentially mediated by the inhibition of angiotensin II production. Further experiments will be required to determine the precise mechanisms by which this angiotensin II inhibition mediates its myeloprotective effect. Angiotensin II may directly act on the stem cell compartment by promoting entry into the cell-cycle entry.²⁴⁻²⁶ Alternatively, angiotensin II may indirectly regulate the stem cell compartment by acting on the hematopoietic niche. For example, inhibition of the angiotensin II signaling pathway reduces the production of several cytokines such as platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and transforming growth factor β 1 (TGF β 1).^{33,34}

In conclusion, this study shows that a short-term ACE inhibition induces marked hematopoietic radioprotection mediated by the angiotensin II pathway through AT1 receptors. It suggests that optimization of this treatment may be a way of reducing the hematopoietic toxicity of chemotherapy and radiotherapy in humans. It also opens new avenues of investigations on the role of angiotensin II on hematopoiesis.

Acknowledgments

The authors thank Patrice Ardouin and Annie Rouchès for taking care of the mice, Françoise Le Pesteur for her technical assistance, Christopher McNamara for improving the English of the manuscript, and Ferdinand Le Noble for critical reading of the manuscript. Enantiomer (S-11579) and perindopril were kindly provided by Servier Institute, and telmisartan was provided by Boehringer Ingelheim, France. RXP407 was given by J. Cotton and V. Dive (CEA, Saclay, France) and A. Yiotakis (University of Athens, Greece).

References

- Grzegorzewski K, Ruscetti FW, Usui N, et al. Recombinant transforming growth factor beta 1 and beta 2 protect mice from acutely lethal doses of 5-fluorouracil and doxorubicin. *J Exp Med*. 1994; 180:1047-1057.
- Parker AN, Pragnell IB. Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. *Blood Rev*. 1995;9:226-233.
- Guest I, Utrecht J. Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low-molecular-weight compounds. *Exp Hematol*. 2001;29:123-137.
- Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96:2022-2036.

5. Soma T, Yu JM, Dunbar CE. Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities. *Blood*. 1996;87:4561-4567.
6. Bonnet D, Lemoine FM, Najman A, Guigon M. Comparison of the inhibitory effect of AcSDKP, TNF-alpha, TGF-beta, and MIP-1 alpha on marrow-purified CD34+ progenitors. *Exp Hematol*. 1995;23:551-556.
7. Lenfant M, Wdzieczak-Bakala J, Guittet E, Prome JC, Sotty D, Frindel E. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:779-782.
8. Guigon M, Bonnet D, Lemoine F, et al. Inhibition of human bone marrow progenitors by the synthetic tetrapeptide AcSDKP. *Exp Hematol*. 1990;18:1112-1115.
9. Monpezat JP, Frindel E. Further studies on the biological activities of the CFU-S inhibitory tetrapeptide AcSDKP, I: the precise point of the cell cycle sensitive to AcSDKP: studies on the effect of AcSDKP on GM-CFC and on the possible involvement of T-lymphocytes in AcSDKP response. *Exp Hematol*. 1989;17:1077-1080.
10. Jackson JD, Yan Y, Ewel C, Talmadge JE. Activity of acetyl-n-ser-asp-lys-pro (AcSDKP) on hematopoietic progenitor cells in short-term and long-term murine bone marrow cultures. *Exp Hematol*. 1996;24:475-481.
11. Aidoudi S, Guigon M, Drouet V, Caen JP, Han ZC. The tetrapeptide AcSDKP reduces the sensitivity of murine CFU-MK and CFU-GM progenitors to aracytine in vitro and in vivo. *Int J Hematol*. 1998;68:145-155.
12. Masse A, Ramirez LH, Bindoula G, et al. The tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (Goralatide) protects from doxorubicin-induced toxicity: improvement in mice survival and protection of bone marrow stem cells and progenitors. *Blood*. 1998;91:441-449.
13. Rieger KJ, Saez-Servent N, Papet MP, et al. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem J*. 1993;296:373-378.
14. Ezan E, Carde P, Le Kerneau J, et al. Pharmacokinetics in healthy volunteers and patients of NAc-SDKP (seraspenide), a negative regulator of hematopoiesis. *Drug Metab Dispos*. 1994;22:843-848.
15. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 1995;270:3656-3661.
16. Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:395-412.
17. Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*. 1991;18:100-105.
18. Skidgel RA, Erdos GE. Biochemistry of angiotensin I-converting enzyme. In: Robertson JS, Nicholls MG, eds. *The Renin-Angiotensin System*. London, United Kingdom: Gower Medical Publishing; 1993:10.1-10.10.
19. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem*. 1991;266:9002-9008.
20. Azizi M, Rousseau A, Ezan E, et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *J Clin Invest*. 1996;97:839-844.
21. Azizi M, Ezan E, Nicolet L, Grognet JM, Menard J. High plasma level of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a new marker of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 1997;30:1015-1019.
22. Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells*. 2000;18:287-294.
23. Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest*. 1997;100:2310-2314.
24. Rousseau-Plasse A, Wdzieczak-Bakala J, Lenfant M, et al. Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, prevents entry of murine hematopoietic stem cells into the cell cycle after irradiation in vivo. *Exp Hematol*. 1998;26:1074-1079.
25. Chisi JE, Wdzieczak-Bakala J, Thierry J, Briscoe CV, Riches AC. Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in murine long-term bone marrow cultures. *Stem Cells*. 1999;17:339-344.
26. Chisi JE, Briscoe CV, Ezan E, Genet R, Riches AC, Wdzieczak-Bakala J. Captopril inhibits in vitro and in vivo the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation. *Br J Haematol*. 2000;109:563-570.
27. Junot C, Gonzales MF, Ezan E, et al. RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks in vivo the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297:606-611.
28. Herodin F, Bourin P, Mayol JF, Lataillade JJ, Drouet M. Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma-irradiation promotes survival. *Blood*. 2003;101:2609-2616.
29. Mouthon MA, Van der Meeren A, Gaugler MH, et al. Thrombopoietin promotes hematopoietic recovery and survival after high-dose whole body irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;43:867-875.
30. Geiger H, Van Zant G. The aging of lymphohematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2002;3:329-333.
31. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192:1273-1280.
32. Rodgers KE, Xiong S, diZerega GS. Accelerated recovery from irradiation injury by angiotensin peptides. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;49:403-411.
33. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, et al. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol*. 2000;76:523-532.
34. Moulder JE, Fish BL, Cohen EP. ACE inhibitors and AT1 receptor antagonists in the treatment and prevention of bone marrow transplant nephropathy. *Curr Pharm Des*. 2003;9:737-749.

Résultats 3^{ème} partie

Article n°2

Articles en collaboration

Contributions à des ouvrages

Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin

JY. Bertrand, S. Giroux, R. Golub, M. Klaine, A. Jalil, L. Boucontet, I. Godin and A. Cumano.

I/Purification et localisation *in situ* des Cellules Souches Hématopoïétiques intra-embryonnaires dans l'AGM à 10 jdg

Participation dans le cadre d'un projet de recherche en collaboration avec l'unité du développement des Lymphocytes, INSERM U668, Institut Pasteur de Paris

Introduction : L'embryon est le siège de la production des CSH au cours de l'embryogenèse. La plupart des études effectuées pour tenter de modéliser ou de localiser précisément le site d'émergence des CSH dans cette région se sont uniquement focalisées sur des analyses phénotypiques ou fonctionnelles de l'endothélium aortique et des clusters intra-aortiques. La région AGM est une structure composite, et l'originalité de ce travail repose sur l'utilisation d'une approche mixte d'analyse phénotypique et fonctionnelle. La corrélation de ces études (marqueurs de surface et analyse de transcrits), a permis de définir en quelque sorte la signature moléculaire des CSH de l'AGM. L'utilisation de l'immunohistochimie et de l'hybridation *in situ* sur coupes d'AGM a ensuite permis de localiser précisément les CSH dans l'AGM, et ainsi de présenter un nouveau modèle de production des CSH à partir du mésoderme de la région Sp/Sp-P/AGM.

Résultats : Les précurseurs multipotents de l'AGM sont contenus dans la fraction CD45^{-int} c-Kit⁺ AA4.1⁺ CD31⁺ CD41⁺ (1 :1,7 précurseurs multipotents). Cette fraction est la seule population cellulaire de l'AGM à posséder la capacité de RLT de receveurs Rag2^{-/-}γc^{-/-} sub-létalement irradiés. L'analyse en RT-PCR quantitative en temps réel a montré que seule cette fraction purifiée de CSH co-exprimait les facteurs LMO-2, GATA-2 et GATA-3. Par corrélation, ces analyses ont permis de définir un patron d'expression de CSH de l'AGM : AA4.1⁺ CD31⁺ CD41⁺ Flk-1^{-int} LMO-2⁺ GATA-2⁺ GATA-3⁺. L'analyse *in situ* de la localisation de ces cellules a montré qu'elles étaient localisées dans deux structures de l'AGM : les « clusters » intra-aortiques et les plages sous-aortiques. Dans cette mesure, il est désormais possible de proposer un modèle alternatif à l'endothélium hémogénique. Les CSH se différencient à partir d'un précurseur « mésodermique » situé dans le mésenchyme sous-aortique, avant de passer dans la circulation générale de l'embryon, donnant ainsi lieu à la formation des « clusters » intra aortiques.

Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin

Julien Y. Bertrand, Sébastien Giroux, Rachel Golub, Michèle Klaine, Abdelali Jalil, Laurent Boucontet, Isabelle Godin, and Ana Cumano

PNAS 2005;102;134-139; originally published online Dec 27, 2004;
doi:10.1073/pnas.0402270102

This information is current as of March 2007.

Online Information & Services	High-resolution figures, a citation map, links to PubMed and Google Scholar, etc., can be found at: www.pnas.org/cgi/content/full/102/1/134
Supplementary Material	Supplementary material can be found at: www.pnas.org/cgi/content/full/0402270102/DC1
References	This article cites 36 articles, 14 of which you can access for free at: www.pnas.org/cgi/content/full/102/1/134#BIBL This article has been cited by other articles: www.pnas.org/cgi/content/full/102/1/134#otherarticles
E-mail Alerts	Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or click here .
Rights & Permissions	To reproduce this article in part (figures, tables) or in entirety, see: www.pnas.org/misc/rightperm.shtml
Reprints	To order reprints, see: www.pnas.org/misc/reprints.shtml

Notes:

Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin

Julien Y. Bertrand*, Sébastien Giroux†, Rachel Golub*, Michèle Klaine†, Abdelali Jalil‡, Laurent Boucontet*, Isabelle Godin^{§5}, and Ana Cumano*^{§¶}

*Unité du Développement des Lymphocytes, Unité de Recherche Associée Centre National de la Recherche Scientifique 1961, Institut Pasteur, 25, Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; and †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U362 and ‡Service Commun de Microscopie Confocale, Institut Gustave Roussy, 39, Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

Edited by Irving L. Weissman, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved November 8, 2004 (received for review April 1, 2004)

Little is known about hematopoietic stem cell (HSC) development from mesoderm. To gain more information on the intraembryonic HSC site of origin, we purified multipotent hematopoietic progenitors from the aorta–gonads–mesonephros (AGM) of mice. This population, expressing c-Kit, AA4.1, CD31, and CD41, but not Flk1, and mainly negative for CD45, proved capable of long-term reconstitution in sublethally irradiated Rag2 γ c^{-/-} recipients. We assigned the expression of GATA-2, GATA-3, and lmo2 to AGM-HSC, whereas erythromyeloid progenitors express only GATA-2. This unique combination of surface markers and transcription factors could be allocated in the AGM to the intraaortic clusters and the subaortic patches underlying aortic endothelial cells. Taken together, those data indicate that embryonic HSCs (*i*) differ from their fetal liver and adult counterpart by the low expression of CD45, (*ii*) do not colocalize with aortic endothelial cells as previously thought, and (*iii*) are localized, at 10.5 days postcoitum, in the splanchnic mesoderm underlying aortic endothelial cells, within GATA-3⁺CD31⁺ cell clusters.

aorta–gonads–mesonephros | yolk sac

During mouse development, the first hematopoietic cells, consisting of precursors with erythroid and/or myeloid potential (1), appear in the yolk sac (YS) blood islands, from 7 days postcoitum (dpc). Before the establishment of circulation (8 dpc), the first progenitors endowed with long-term reconstitution (LTR) activity are generated in the intraembryonic splanchnopleura and are absent from the YS (2, 3). After circulation is established, multipotent precursors with LTR activity (4, 5) can be found in the blood (6) and in the YS (7). After 10 dpc the paraaortic splanchnopleura, which now comprises the aorta, gonads, and mesonephros, is called AGM. Hematopoietic precursors, present in the AGM after 10.5 dpc, have LTR capacity when transferred in adult normal recipient mice (4).

It was previously suggested that the floor of the aorta and/or the underlying splanchnic mesoderm is the site of origin of intraembryonic hematopoietic stem cells (HSCs) (8–12). Clusters of basophilic cells located within the floor of the aorta were detected from 10 to 10.5 dpc, further characterized as hematopoietic cells, and taken as a sign of ongoing hemogenesis. These hematopoietic intraaortic clusters (HIACs) have been described in all vertebrate embryos, including humans (for review, see ref. 13). Other structures potentially involved in intraembryonic HSC generation are the subaortic patches (SAPs), located below the aortic floor, which express the transcription factor GATA-3 (14) and the AA4.1 antigen (15). These SAPs are also present in human embryos (16, 17). In contrast to HIACs, which are detected only at the peak of intraembryonic HSC production (8), the SAPs are present in the intraembryonic hemogenic site for the duration of HSC generation. An involvement of both SAPs and HIACs in HSC generation is strengthened by the fact that

both structures disappear (11, 14) concomitantly with the cessation of AGM-HSC production at 12 dpc (8).

The understanding of the process leading to intraembryonic HSC generation is currently a matter of debate that can be clarified by precisely locating the structure where this generation occurs. In the avian and murine models as well as in human embryos, AGM-hematopoietic activity has been shown to derive from cells harboring markers shared by endothelial and hematopoietic lineages, which also lack the panhematopoietic marker CD45 (18–20). It has thus been proposed that the endothelium of the aortic floor displays “hemogenic” activity and is able to give rise to HSCs.

Here we correlated surface phenotype, *in vitro* differentiation potential, LTR activity, and gene expression of 10.5-dpc AGM populations. We show that CD45⁺ cells contain only macrophage precursors. CD45^{-lo}c-Kit⁺AA4.1⁺ cells from either AGM or YS are differentially enriched for two distinct types of progenitors. Erythromyeloid precursors are found at a frequency of 1:2 in YS. Multipotent precursors are present at frequencies higher than 1:3 in AGM, representing more than 80% of total multipotent cells in this site. LTR activity in alymphoid recipients was strictly ascribed to CD45^{-lo}c-Kit⁺AA4.1⁺ AGM cells that can therefore be considered as HSCs.

HSCs purified according to these criteria express a number of cell surface markers (CD31, c-Kit, and AA4.1) and transcription factors (lmo2 and GATA-2) common to cells of both hematopoietic and endothelial lineages. However, they may be distinguished from endothelial cells (ECs) by the lack of Flk1 and the expression of CD41 (21–23) and GATA-3. The phenotype and gene expression profile of purified HSCs were compared with those obtained by *in situ* hybridization and immunostaining of the AGM (ref. 14 and present work). Coexpression of GATA-2, GATA-3, lmo2, CD41, and CD31 was observed exclusively in two distinct anatomical structures, the HIAC and the SAP (14). We propose that HSCs are generated in the SAP before they form the aortic clusters and before they enter blood circulation.

Materials and Methods

Animals and Dissections. Two C57BL/6 congenic lines (H2^b) bearing the Ly5.1 and Ly5.2 alleles of the CD45 marker and their F₁ progeny were used in this study. Rag2 γ c^{-/-} B10BR mice (H2^k) were used as recipients for LTR assays. Embryonic development was estimated by considering the day of vaginal

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: dpc, days postcoitum; AGM, aorta–gonads–mesonephros; YS, yolk sac; HSC, hematopoietic stem cell; EC, endothelial cell; HIAC, hematopoietic intraaortic cluster; SAP, subaortic patch; LTR, long-term reconstitution.

[§]I.G. and A.C. contributed equally to this work.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: cumano@pasteur.fr.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

plug observation as 0.5 dpc. Embryos between somite stages (S) 30S and 40S (10.5 dpc) were staged by somite counting. Dissections of 10.5-dpc YS and AGM were done as described (8).

Flow Cytometry Analysis and Cell Sorting. Flow cytometric analyses were performed in a LSR with the CELLQUEST software (Becton Dickinson). The following antibodies (Pharmingen) were used: CD45.1 (A20), c-Kit (2B8), AA4.1 (493), CD41 (MWRReg30), CD31 (MEC13.3), Flk1 (Avas12 α 1), Gr-1 (RB6-8C5), Mac-1 (M1/70), B220 (RA3-6B2), CD19 (1D3), Ter119, H2-K^b (AF6-88.5), NK1.1 (PK136), TcR β (H57), and TcR $\gamma\delta$ (GL3). To test acetylated low-density lipoprotein (AcLDL), uptake cells conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) were incubated for 2 h at 37°C with 10 μ M AcLDL. Cell sorting was performed with a MoFlo cell sorter (Cytomation, Ft. Collins, CO). The single-cell dispenser robot (Cyclone) was used for deposition of single cells on culture plates.

Differentiation Potential Assay. Sorted YS and AGM cells were cultured for 14 days on irradiated S17 stromal cells (kindly provided by K. Dorshkind, University of California, Riverside) (2, 3) or OP9 stromal cells (from S.-I. Nishikawa and T. Nakano, Riken Center for Developmental Biology, Kobe, Japan), supplemented with Flt3-ligand, a kind gift from R. Rottapel (Ontario Cancer Institute, Toronto). All cultures were done in 96-well plates in medium supplemented with cytokines, as described (2, 3).

Reconstitution Experiments. Sorted 10.5-dpc AGM cells were injected into Rag2 γ c^{-/-} mice. For LTR analysis, recipients were killed at 6 months, and the bone marrow, spleen, and intestines were analyzed by cytometry for the presence of H2^b T, B, natural killer, and myeloid cells. Animals that had donor-derived myeloid and B cell precursors in the bone marrow were considered long-term reconstituted.

Gene Expression Analysis. Cells were lysed in TRIzol (GIBCO/BRL), and total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol. Oligo(dT)-primed cDNA was prepared from 6,000–25,000 cells by using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (GIBCO/BRL) in a 20- μ l reaction volume. cDNA from 15-dpc Ter119-depleted fetal liver cells was used as a standard for the transcript quantification. cDNA from S17 cells was used as a negative control.

Quantitative RT-PCRs were performed on the GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), in a 25- μ l total volume, using 1 μ l of cDNA, 1 μ l of each primer (10 μ M), and 12.5 μ l of Sybr Green PCR Master Mix 2 \times (Applied Biosystems). Each sample was tested in triplicate. For each independent experiment, hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) expression was scored in each population. Finally, the signals detected in each population for each transcript were normalized to HPRT and shown as percentages of the expression found in control populations (considered as 100%). Primers: HPRT-for, 5'-GACTGAAAGACTTGCTCGAG-3'; HPRT-rev, 5'-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA-3'; L-plastin-for, 5'-ACATCAGCTGCAATGAGC-3'; L-plastin-rev, 5'-TATCCAGTTGACGAAGGC-3'; CD45-for, 5'-AACACCTACACCCAGTGATG-3'; and CD45-rev, 5'-TTGGCTGCTGAATGTCTGAG-3'. Other primers are described elsewhere: GATA-2 (24), GATA-3 (25), Lmo2 (26), and EpoR (27).

In Situ Hybridization and Immunostaining. Digoxigenin-labeled (Boehringer Mannheim) riboprobes were obtained from PCR fragments. *In situ* hybridization on cryostat sections was performed as described in ref. 14. For multiple labeling, sections (from 10 embryos) were incubated overnight with anti-CD41-FITC, anti-CD31-PE, and/or anti-CD45 [clone 30-F11 coupled

with either CyChrome or phycoerythrin (PE)], and mounted with VECTASHIELD Hardset (Vector Laboratories). Image stacks were collected with a LSM 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss) using a \times 20/numerical aperture 0.75 apochromat plan objective. Images were acquired by using BP505–530, BP560–615, and LP650 filters. Z-projection of slices was in real time by using LSM IMAGE EXAMINER software (Zeiss). Images were processed by using PHOTOSHOP 6.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Results

Phenotypic Characterization of Hematopoietic Cells in 10.5-dpc AGM.

We analyzed the surface expression of the following marker combinations to ascribe a phenotype to hematopoietic precursors in the AGM: AA4.1 (28), shown to be expressed in paraaortic splanchnopleura/AGM (7, 15); CD45, panhematopoietic antigen; c-Kit (29, 30); Flk1, present in ECs and their precursors; CD31, expressed by ECs and hematopoietic cells; and CD41, expressed by early hematopoietic precursors but not by ECs (21–23). We fractionated 10.5-dpc AGM and YS cells, at the time of maximum multipotent cell generation (8), according to the expression of CD45, c-Kit, AA4.1, and CD41 (Fig. 1A). Sorted cells were tested *in vitro* in a single-cell assay for the potential to differentiate into erythroid (Ter119⁺), myeloid (CD11b⁺), and lymphoid (B220⁺) cells. Two types of precursors were identified: erythromyeloid precursors that differentiate only into erythroid and myeloid cells and multipotent precursors that also generate lymphoid cells. The frequency of each precursor in the different fractions is shown in Fig. 1C.

CD45⁺ cells (fraction A) exclusively contain macrophage precursors, at a frequency of 1:13. The progeny of these cells (Mac-1⁺F4/80⁺) shows characteristic macrophage morphology after May–Grünwald Giemsa staining (data not shown). Fraction B, CD45⁻c-Kit⁻, is devoid of hematopoietic activity. Lymphomyeloid potential is restricted to CD45^{-/lo}-c-Kit⁺ cells (fraction C). CD45 expression was considered negative to low, because 15–20% of these cells within this population expressed low levels of the protein. Cells from fraction C were subdivided into fractions D and E, AA4.1⁻ and AA4.1⁺, respectively (Fig. 1B).

Within AGM fraction E (CD45^{-/lo}-c-Kit⁺AA4.1⁺), multipotent precursors were detected at a frequency of 1:3–1:2, corresponding to 100–150 multipotent precursors per embryo, a result that correlates with our previous quantification of multipotent precursors in unfractionated 10.5-dpc AGM (8). The frequency of multipotent cells was further enriched to 1:1.4 (72% of seeded wells) when CD41⁺ cells were isolated within the fraction E (Fig. 1). Although all c-Kit⁺ cells also express CD41, this enrichment was obtained with the CD41-brightest cells (fraction E'), corresponding to 66% of fraction E.

In contrast to AGM, YS fraction E was enriched for erythromyeloid precursors at a frequency of 1:2 sorted cells, corresponding to 500 erythromyeloid precursors per YS (10 times higher than in the AGM), likely originated *in situ*. We conclude that AGM fraction E is a population highly enriched for hematopoietic precursors, multipotent, at the clonal level.

We ascertained that AGM fraction E also contained HSCs by an *in vivo* LTR assay into sublethally irradiated Rag2 γ c^{-/-} mice (Table 1, which is published as supporting information on the PNAS web site). The CD45^{-/lo}-c-Kit⁺AA4.1⁺ 10.5-dpc AGM fraction E, characterized as containing most multipotent precursors, appears to be the only fraction in AGM providing multilineage LTR. These cells can be considered HSCs.

The phenotype of AGM-HSCs determined above, the low levels of expression of CD45, and their capacity to take up acetylated low-density lipoprotein (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site) makes them

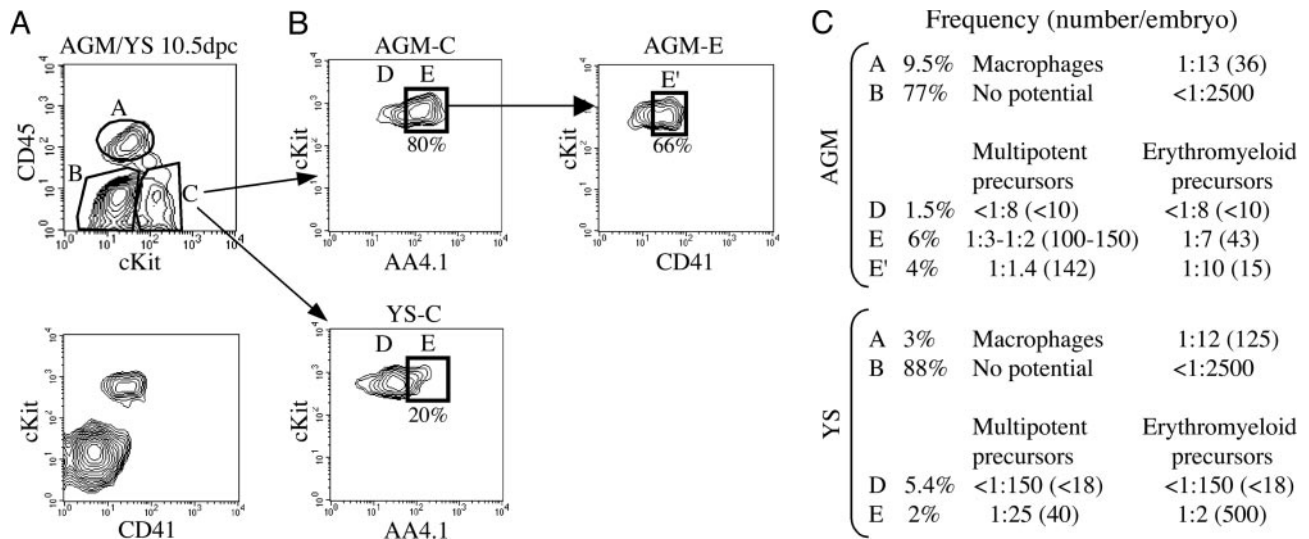


Fig. 1. Distribution of multipotent and erythromyeloid precursors in 10.5-dpc AGM and YS. (A) AGM and YS cells at 10.5 dpc were fractionated according to the expression of CD45, c-Kit, and CD41. We could identify three fractions, A (CD45⁺), B (c-Kit⁻), and C (c-Kit⁺CD45^{-/lo}). All c-Kit⁺ cells also express CD41. (B) In AGM and YS, fraction C was subdivided into D (c-Kit⁺AA4.1⁻) and E (c-Kit⁺AA4.1⁺), shown on the plots. AGM-E cells were further fractionated with CD41; E' represents 66% of AGM fraction E. (C) Studies in single-cell cultures and limiting dilution analysis provided the frequency of multipotent and bipotent (erythromyeloid) precursors in each fraction. Absolute numbers (frequency × number of cells) presented here are calculated according to the total number of cells in AGM and YS, estimated to be 5,000 and 50,000, respectively.

indistinguishable from ECs, macrophages, and other AGM cell types. We therefore analyzed the expression of two additional markers in this population. All c-Kit⁺ cells also express CD31 (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). Both Flk1 and CD41 stain subpopulations of

c-Kit⁺ cells (Figs. 2A and 7). Hematopoietic differentiation analysis of both sorted populations indicated that CD41 stains all multipotent cells in the AGM, whereas no hematopoietic progeny was obtained from the Flk1⁺ cells (>200 cells analyzed; data not shown). Also consistent with the hematopoietic nature of

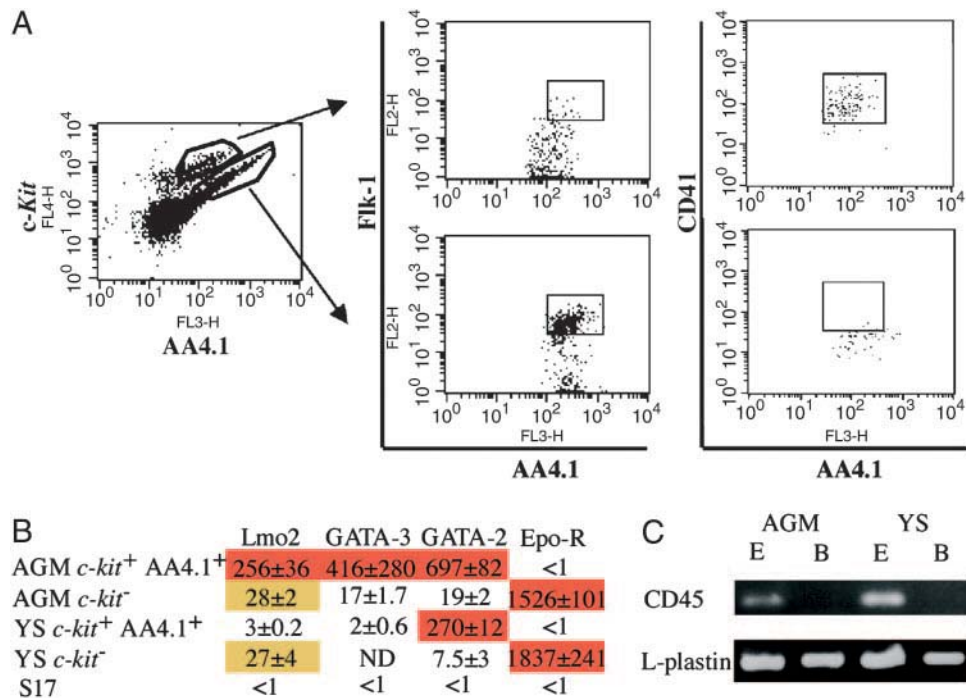


Fig. 2. Distribution of endothelial and hematopoietic markers in cells from YS and AGM. (A) Flk1 (Center) and CD41 (Right) expression within the two gated c-Kit⁺AA4.1⁺ populations (Left), after exclusion of CD45⁺ cells. (B) CD45^{-/lo}c-Kit⁺AA4.1⁺ and CD45⁻c-Kit⁻ cells from AGM and YS were sorted and analyzed for expression of Lmo2, GATA-3, and GATA-2. The transcript expression is represented, after normalization to hypoxanthine phosphoribosyltransferase, by the percentage of its expression in the standard population (15-dpc fetal liver depleted of erythrocytes). Levels of expression were divided into four groups according to the percentage of expression relative to the standard. Means and standard deviations on triplicates from two individual experiments are shown. No background shading, <25%; yellow shading, 25–100%; red shading, >250%. (C) CD45 and L-plastin transcript distribution within YS and AGM fractions E and B.

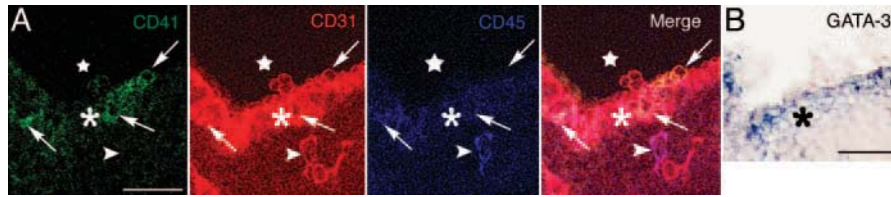


Fig. 3. Localization of AGM hematopoietic subsets in 10- to 10.5-dpc (30–35S) embryos. Confocal expression analyses (A) allow one to discriminate between macrophages (CD45⁺CD31⁺CD41⁻, arrowheads) and HSCs (CD41⁺CD31⁺CD45^{-/lo}, arrows). HSCs are located within the intraaortic clusters (stars) and within the SAPs (asterisks). (B) CD31 is expressed by ECs and by GATA-3⁺ SAPs (asterisk). (Bars, 50 μ m.)

AGM fraction E is the expression of L-plastin (31) and low levels of CD45 mRNA (Fig. 2C).

We show that, at this stage of development, HSCs express c-Kit, AA4.1, CD41, and CD31, whereas expression of Flk1 is undetectable. Flk1⁺CD31⁺ cells that express variable levels of c-Kit and AA4.1 do not generate a hematopoietic progeny and according to this expression pattern likely correspond to ECs.

At 10.5 dpc, Fraction E Cells Are Localized Within Intraaortic Clusters and SAPs. We next analyzed by RT-PCR the expression, within fraction E, of genes shared by hematopoietic cells and ECs [GATA-2 (32) and lmo2 (14)] and genes not expressed by ECs [GATA-3 (33)]. Fig. 2B shows that whereas GATA-2, GATA-3, and lmo2 are highly expressed in AGM fraction E, only GATA-2 is expressed at a notable level in the YS. Considering that HSCs are mostly represented in AGM fraction E and that erythromyeloid precursors are predominant in the YS, we conclude that erythro-

myeloid precursors are likely to express only high levels of GATA-2, whereas HSCs express GATA-2, GATA-3, and lmo2.

To locate in the AGM the various subpopulations characterized by flow cytometry, *in vitro* and *in vivo* potential assays, and gene expression analysis, we performed *in situ* hybridization (GATA-2 and GATA-3) and multiple immunostainings (CD41, CD31, and CD45) on 10- to 10.5-dpc (30–40S) AGM sections to discriminate between the various fractions.

Fraction A cells, corresponding to macrophages, were identified by their CD45⁺CD31⁺CD41⁻ phenotype (Fig. 1). CD45⁺ cells were found surrounding the aorta (Figs. 3A and 4C).

CD41⁺CD31⁺CD45^{-/lo} cells, which correspond to HSCs, were present only in the ventral side of the AGM, either in SAPs below the aortic floor (Figs. 3 and 4; see also Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site) or within the HIAC (Figs. 3 and 8). This labeling pattern colocalizes with GATA-3 expression (Fig. 3). At later stages, when HSCs are more numerous

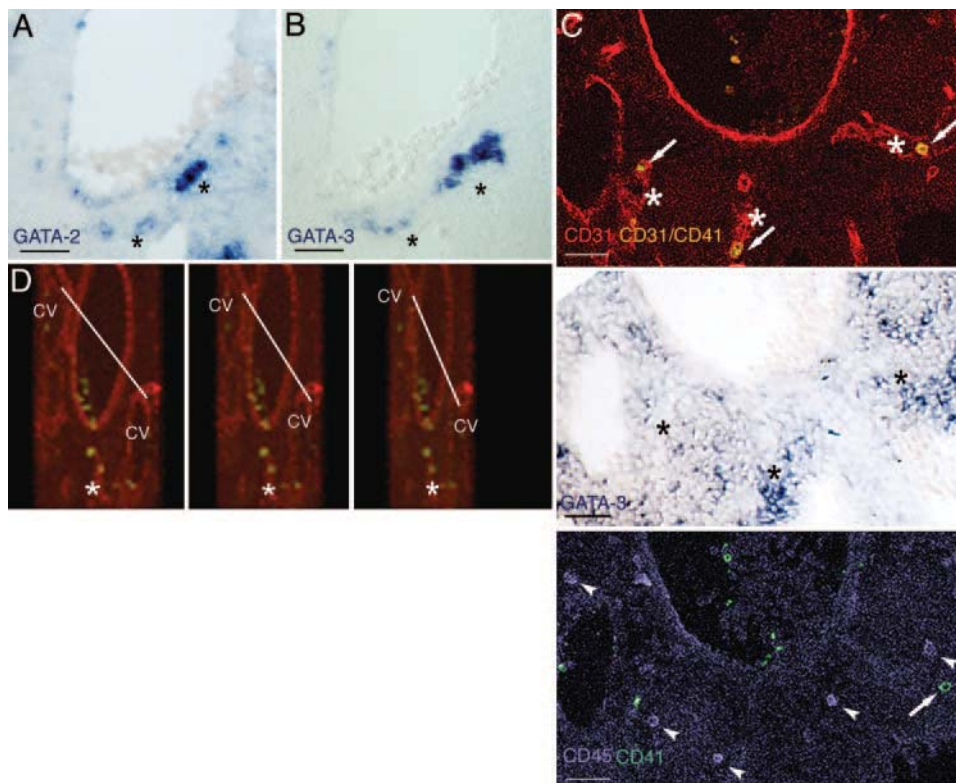


Fig. 4. Localization of AGM-HSCs and their environment in 10.5-dpc (35–40S) embryos. From 10.5 dpc (35–40S), the subendothelial CD31⁺GATA-3⁺ layer evolves into more compact SAPs (asterisks), which express GATA-2 mRNA (A) in addition to GATA-3 (B). Confocal analyses (C and D) show that HSCs are located within the SAPs. CD45⁺ macrophages (arrowheads) do not express CD41. XZ projection of the image stack (D) that comprises the top section in C shows that CD31⁺CD41⁺ HSCs are present only in the ventral part of the AGM (below the straight line joining the cardinal veins (CV)). Their distribution forms a continuum from the SAPs (asterisks) to the aortic floor. Note that CD31⁺CD41⁺ HSCs constitute only a minority of the CD31⁺GATA-3⁺ SAP cells. Stainings in A–C were performed on alternate sections of the same embryo. (Bar, 50 μ m.)

(8), SAPs are better individualized (Fig. 4). GATA-3 is expressed only in SAPs, where it colocalizes with GATA-2, also expressed by endothelial cells (Fig. 4 *A* and *B*). $CD41^+CD31^+CD45^-$ cells appeared as individual cells within the SAP (Fig. 4*C*). Lateral examination (Fig. 4*D*) of the confocal sections stack shows that $CD31^+CD41^+$ HSCs, present only in the ventral part of the AGM, are distributed along a continuum from the SAP to the aortic floor. Moreover, 3D confocal analysis of AGM explants ($n = 6$) established that the $CD31^+$ cells (some of which coexpress CD41) forming the SAP are restricted to the ventral region of the aorta and are distinct from the vascular network (Fig. 9, which is published as supporting information on the PNAS web site).

The various approaches undertaken here converge to allocate intraembryonic HSCs to the SAP and some cells of the HIAC. They do not colocalize with the ventral aortic ECs.

Discussion

In this study, we define a population of $CD45^{-/lo}c\text{-Kit}^+AA4.1^+$ cells, obtained from prehepatic sites (YS and AGM) in 10.5-dpc embryos, which also express CD31 and CD41 but not Flk1. This $CD45^{-/lo}c\text{-Kit}^+AA4.1^+CD41^+$ AGM fraction contains multipotent cells at a frequency of 1:1.4, which accounts for the bulk of multipotent precursors at this stage (8). It is noteworthy that, because of a 10–20% error in the single-cell seeding procedure, the 70% positive multipotent clones obtained correspond to an actual enrichment close to 1:1. The YS counterpart is mainly enriched in erythromyeloid precursors (with a frequency of 1:2). Sorted $CD45^+$ AGM and YS cells are committed macrophage precursors, likely equivalent to “primitive macrophages,” described in vertebrate embryos (34–36).

Consistent with the *in vitro* data, LTR was exclusively obtained when we injected as few as 250 AGM $CD45^{-/lo}c\text{-Kit}^+AA4.1^+$ cells in sublethally irradiated alymphoid recipients. No donor-derived hematopoietic cells were obtained when $CD45^+$ or $c\text{-Kit}^-$ AGM cells were used for LTR, illustrating the absence of HSCs in these two subsets. Within the fraction E, discrete differences in CD45 expression could be observed. Whether LTR activity is an exclusive property of the $CD45^{lo}$ subpopulation was not addressed here. Most AGM cells will express detectable levels of CD45 by 11.5 dpc, and 10.5-dpc fraction E might acquire CD45 expression shortly after transfer in the irradiated recipients.

The expression of CD41 in immature hematopoietic precursors, independent of its expression within the megakaryocytic lineage has been documented (21, 37–39). More recently, CD41 was shown to constitute the earliest hematopoietic-specific marker during the determination of mesodermal cells toward this lineage, because it does not label ECs (21–23) and is expressed by hematopoietic precursors before CD45 (23), a result in total agreement with the present phenotyping of AGM-HSCs.

HSCs have been previously shown to express different surface markers depending on the hematopoietic organ where they reside. In contrast to bone marrow HSCs, fetal liver HSCs express Mac-1, AA4.1, CD41, and CD31 (40). We here show that AGM-HSCs express markers similar to the ones found in fetal liver (AA4.1, CD31, *c-Kit*, and CD41) but differ by the lack/low expression of CD45. No cells with hematopoietic precursor activity were found in the $CD41^-$, $CD31^-$, or $c\text{-Kit}^-$ fractions. Because of the strict hematopoietic representation of CD41, we conclude that the combination of CD41 with any of the above-mentioned markers allows discrimination between hematopoietic and any other cell type.

We here show that purified $CD45^{-/lo}c\text{-Kit}^+AA4.1^+CD31^+$ multipotent precursors that also contain the majority of $CD41^+$ cells in this location are the only hematopoietic AGM subsets expressing high levels of GATA-3 and GATA-2. The expression patterns of these transcription factors and cell surface markers completely correlate to locate AGM-HSCs within both the

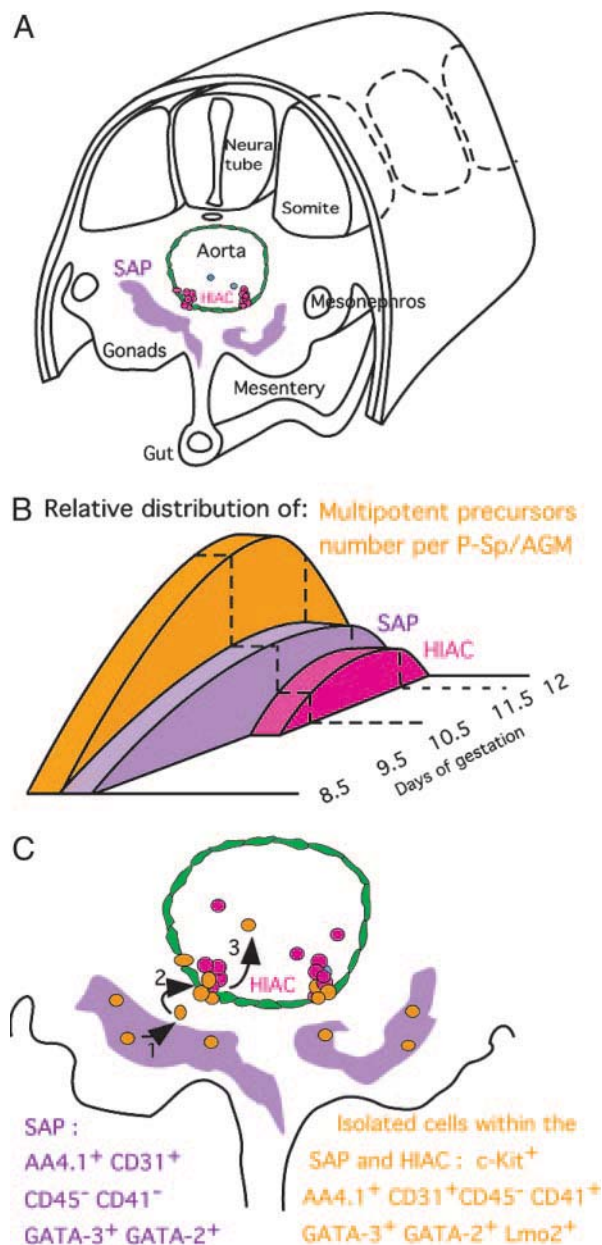


Fig. 5. Toward a model for emergence and migration of embryonic HSCs. (*A*) Localization of hemogenic-related structures, SAPs (purple), and HIAC (pink) within a 10.5-dpc embryo. (*B*) Relative distribution of multipotent precursors (orange), SAPs (purple), and HIACs (pink) in 8.5- to 12-dpc embryos. Whereas GATA-3⁺ SAPs appear below the aortic floor as soon as the first multipotent precursor is generated, HIACs are present only at the AGM stage, when the number of precursors generated reaches a peak. (*C*) Model for emergence and migration of embryonic hematopoietic precursors: HSCs (orange) generated in the SAP (1) migrate toward the aortic floor (2). HSC translocation, which contributes to HIAC development (3), is followed by the release of HIACs into the circulation.

HIAC and the SAP (Figs. 3–5*A*, 8, and 9). We recently described the existence of SAPs in the ventral region of the aorta (14). These structures, identified by the expression of GATA-3 and AA4.1, do not contain $CD45^+$ cells. After 10 dpc, HIACs appear in the aortic floor. Cells expressing GATA-3 and *Lmo2* are detected at the base of these clusters (14), which also express AA4.1 (15), CD31 (41), and CD41 (42) and contain a few $CD45^+$ cells (14).

Résultats 3^{ème} partie

Article n°3

Articles en collaborations

Contributions à des ouvrages

Hematopoietic Stem Cell Development During Mouse Embryogenesis

S. Giroux, JY. Bertrand, A. Cumano et I. Godin.

Hematopoietic Stem Cell Development During Mouse Embryogenesis

Julien Y. Bertrand, Sebastien Giroux, Ana Cumano,
and Isabelle Godin

Summary

The progress of the last few years in the understanding of hematopoietic cell development during embryogenesis resulted from a combination of experimental approaches used in hematology and developmental biology. This methodology has been particularly powerful for the analysis of the earliest steps of hematopoietic ontogeny because it allows for the first time the demonstration of the existence of two independent sites of hematopoietic cell generation. Here, we describe the methods used in our laboratories to characterize the phenotype and differentiation potential of the primordial hematopoietic precursors as well as their localization in the mouse embryo. This multidisciplinary approach is required to explore the mechanisms of hematopoietic cell generation.

Key Words: AGM; flow cytometry; FTOC; *in situ* hybridization; hematopoiesis; mouse embryo; ontogeny; organ culture; stem cells; yolk sac.

1. Introduction

Hematopoietic progenitors are first detected in the yolk sac (YS) of mouse embryos between 7 and 7.5 d post-coitus (dpc) (1). These YS hematopoietic precursors can either be expanded *in vitro* or transplanted *in vivo*. Reconstitution of the hematopoietic lineage in recipient adult mice cannot be obtained under these conditions. Only erythroid cells are generated after *in vitro* expansion of YS hematopoietic progenitors under culture conditions that allow the differentiation of all hematopoietic lineages. Nowhere in the embryo proper can we find other hematopoietic cells at this stage of development (2,3).

Later, between 8 and 8.5 dpc, before the establishment of circulation between the YS and the embryo proper, hematopoietic precursors can also be detected in the intraembryonic compartment (splanchnopleura [Sp]: *see* following paragraph), but only if an organ culture step precedes *in vitro* differentiation or *in vivo* transplantation.

Under these conditions, Sp precursors can generate all hematopoietic lineages when transferred to the appropriate differentiation culture systems and provide hematopoietic long-term reconstitution in natural killer-deficient mice, illustrating the presence of hematopoietic stem cells. In contrast, YS isolated from the same embryos generate only precursors with erythroid and/or myeloid potential and do not provide hematopoietic long-term reconstitution (3).

The extraembryonic and intraembryonic sites capable of generating hematopoietic cells before the onset of fetal liver hematopoiesis as well as their evolution during development are schematically described in **Fig. 1**. The extraembryonic YS provides for immediate erythropoiesis from 7 dpc. The hematopoietic determination of mesodermal cells takes place in the caudal intraembryonic Sp beginning at the presomitic stage (7.5 dpc). In both hemogenic sites, mesoderm is associated with endoderm, a combination termed Splanchnopleura. After the 15-somite stage, the tissues derived from the Sp comprise the endoderm of the developing gut, the dorsal aorta, the omphalomesenteric artery, and the splanchnopleural lining of these tissues. This site is now referred to as Para-aortic Sp (P-Sp: 8.5–10 dpc; **ref. 4**). When fetal liver colonization by hematopoietic stem cells begins, the P-Sp develops further and comprises, besides the aorta, the developing gonads and the mesonephros (AGM region: 10–11.5 dpc; **refs. 5–8**).

2. Materials

2.1. Dissection of Embryo

1. 70% Ethanol.
2. Phosphate-buffered saline (PBS) with calcium and magnesium.
3. Dissecting tools. Dissecting tools are all from BioTek Microsurgery, 34 Rue Des Charbonnerets, 92160 Antony, France; Web site: biotek-online.com:
 - a. Curved-serrated forceps: P-95-BC;
 - b. Fine forceps: DU-110-AUF
 - c. Ultra-fine forceps: DU-110-A
 - d. Sieve used for embryo transfer: S-20-P

2.2. Whole-Mount and In Situ Hybridization

1. Labeling solution: ribonucleic acid (RNA) labeling with digoxigenin-UTP by in vitro transcription with appropriate RNA polymerases (Boehringer), DIG RNA labeling. Mix (1X final), transcription buffer (1X final), RNA polymerase (40 μ L), RNAsine (10–20 μ M/ μ L) and complemented with RNA free H₂O to a 20 μ L of final volume.
2. TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; pH 8.0), make up with RNase-free water and autoclave
3. WISH-FIX: Whole-mount embryo *in situ* hybridization fixative solution (for 50 mL), 5 mL 37% formaldehyde, 200 μ L of 0.5 M EDTA (pH 8.8) and 150 μ L of 1 M NaOH in PBS without Ca²⁺/Mg²⁺.
4. WISH buffer: Whole-mount embryo *in situ* hybridization buffer (for 200 mL), 100 mL of formamide, 13 mL of 20X SSC (pH 5.0), 2 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), Torula (50 μ g/mL), 400 μ L of Tween-20, 1 g of CHAPS and heparin (100 μ g/mL) in H₂O.
5. ISH-Fix buffer: *in situ* hybridization fixative buffer (for 200 mL): 8 g of sucrose, 24 μ L of 1 M CaCl₂, 77 mL of 0.2 M NaHPO₄, and 23 mL of 0.2 M NaH₂PO₄ in H₂O.

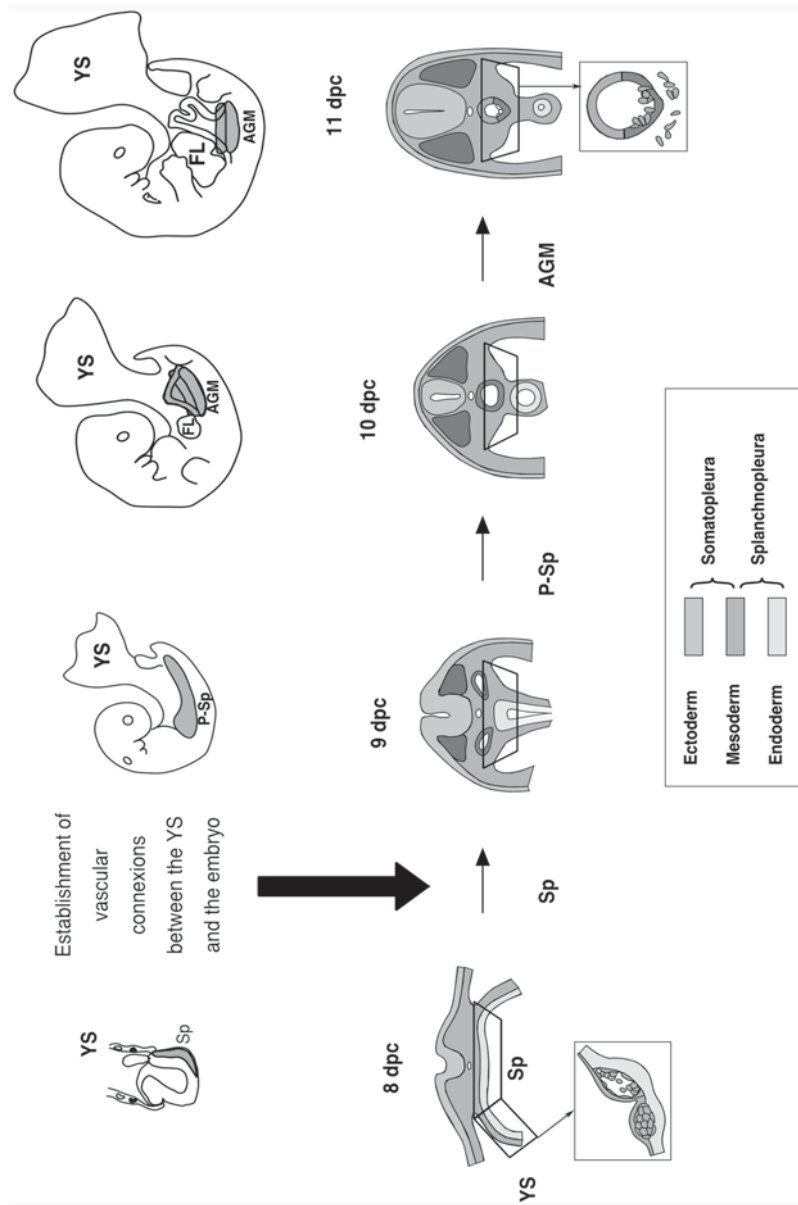


Fig. 1. Localization of embryonic sites capable of hematopoietic cell generation. Top drawings display the location of extra- and intraembryonic hemogenic sites in whole embryos. Bottom line: the extra- and intraembryonic regions involved in generation of hematopoietic precursors are shown in boxes.

6. ISH-FIX: *in situ* hybridization fixative solution (for 200 mL, add 8 g of paraformaldehyde in prewarmed ISH buffer).
7. ISH buffer: *in situ* hybridization (for 10 mL), 1 mL of 10X salt, 5 mL of formamide, 2 mL of 50% dextran sulfate, 200 μ L of 50X Denhardt's and Torula Yeast (1 mg/mL) in H₂O.
8. PBT: PBS containing 0.1% Tween-20.
9. MABT (for 1 L; pH 7.5), 11.6 g of maleic acid, 807 g of NaCl, and 10 mL of Tween-20 in H₂O.
10. Anti-digoxigenin-AP: Fab fragment from an anti-digoxigenin antibody from sheep, conjugated with alkaline phosphatase.
11. NTMT (for 100 mL): 2 mL of 5 M NaCl, 5 mL of 2 M Tris-HCl (pH 9.5), 1 mL of Tween-20 and 2.5 mL of 2 M MgCl₂ in H₂O.
12. Washing solution: 1X standard saline citrate (SSC), 50% formamide, 0.1% Tween-20.
13. Staining solution: 100 mL of NTMT + 450 μ L of NBT + 350 μ L of BCIP.

2.3. Organ Culture In Toto and Analysis of Hematopoietic Potential

1. 24-Well plate (TPP).
2. OptiMEM (Invitrogen).
3. Fetal calf serum (ICN).
4. Penicillin-streptomycin (Invitrogen).
5. β -mercapto-ethanol (Invitrogen).
6. OP9 stromal cells (T. Nakano, S.-I. Nishikawa, Kyoto, Japan).
7. Trypsin-EDTA (Invitrogen).
8. 96-Well plate (TPP).
9. Hanks balanced salt solution (HBSS; Invitrogen).
10. Trypan blue (Invitrogen).
11. Irradiator (X-ray or cesium source).
12. IL-7 supernatant. We use the supernatant of J558 cells transfected with the cDNA encoding IL-7, a kind gift from F. Melchers (Basel, Switzerland). Cells are grown to confluency, and the supernatant is collected. Titration is done in 2E8 cells, a kind gift from P. Kincade (Oklahoma City, OK), dependent on IL-7 for growth. The supernatant is serially diluted on the 2E8 cells and growth is scored 3 d later, either by counting the cells or by thymidine incorporation. The highest dilution that gives maximum proliferation is chosen.
13. Flt3-Ligand (Flt3-L) supernatant. We use the supernatant of Sp2.0 myeloma cells transfected with the cDNA encoding Flt3-L and Baf3 cells transfected with the cDNA encoding Flt3, kind gifts from R. Rottapel (Toronto, Canada). Supernatant collection and titration is performed as described in **step 12**.
14. c-Kit-Ligand (c-Kit-L) supernatant. We use the supernatant of CHO cells transfected with the cDNA encoding c-Kit-L, a kind gift from Genetics Institute (Boston, MA). Titration is performed on freshly prepared bone marrow mast cells cultured for 1 wk in c-Kit-L, essentially as described in **step 12**.
15. Terasaki plates (Nunc).
16. Millipore filters. ATTP 0.8 μ m (Millipore).
17. Hemostatic sponge (Helistat Colla-Tec, Plainsboro, NJ).

2.4. Flow Cytometry Analyses

2.4.1. Monoclonal Antibodies From Pharmingen (Becton Dickinson)

1. CD19-FITC (clone 1D3).
2. Ter119-PE.

3. Mac-1- APC (clone M1/70).
4. CD4-PE.
5. CD8-APC.
6. Ly5.1- FITC.

2.4.2. Other Products

1. PBS, 1X.
2. Fetal calf serum (ICN).
3. Round bottom 96-well plate (CML).
4. Propidium iodide (Sigma).

3. Methods

3.1. Dissection of Embryonic Sites Involved in Hematopoietic Development

3.1.1. Mating and Embryo Recovery

1. Place females and one male in cage either overnight or for 4 consecutive days (*see Note 1*). Mating is ascertained by the presence of a copulation plug the following morning, which is then considered d 0.5 of gestation.
2. Pregnant mice at the appropriate stage are sacrificed by cervical dislocation (or by appropriate method required by the investigator's institution) and placed on their back. Uterine horns are dissected as shown in **Fig. 2A**.
3. Cleanse abdomen with 70% ethanol.
4. A skin-incision is made perpendicular to the axis.
5. Reflect the skin towards the head and tail and make a similar incision in the muscle layer. Displace the intestines to expose the uterine horns.
6. The cervical segment of the uterine horn is grabbed with a pair of blunt ended forceps and sectioned below the ovary. The horns are then lifted from the peritoneal cavity and the mesometrium and fat are trimmed away to produce a string of concepti.
7. The concepti, surrounded by the muscular layers, are individually sectioned and placed in a Petri dish containing PBS with calcium and magnesium.
8. Under a dissecting microscope, open the uterine muscle layers by splitting along the antimesometrial side with thin forceps. Reflect the muscle layer towards the mesometrial side. Compression of the deciduoma during this procedure would damage the embryo and should be avoided.
9. The embryos surrounded by the deciduoma are located at the anti-mesometrial side. Embryos should be removed from the deciduoma by cutting the top third of the egg-shaped structure opposite from the mesometrial side and by pulling the embryo and surrounding YS away from the deciduoma. Transfer embryos (up to 9.0 dpc) to a clean Petri dish containing PBS with calcium and magnesium using a Pasteur pipet. For later stage embryos, use a sieve designed for embryo transfer (Biotek; *see Note 2*).

3.1.2. Embryo Staging

During presomite stages, embryos are staged according to the criteria of Downs and Davies (9). The developmental stages of P-Sp and AGM explants are ascertained by somite counting.

3.1.3. YS and Sp Dissection: 7.5–8 dpc, Up to 4S (**Fig. 2B**)

YS is explanted by cutting with ultra-fine forceps, all along its connection with the embryo body (**Fig. 2B,3**). The amnion is cut medially, up to the trunk (**Fig. 2B,4**) and

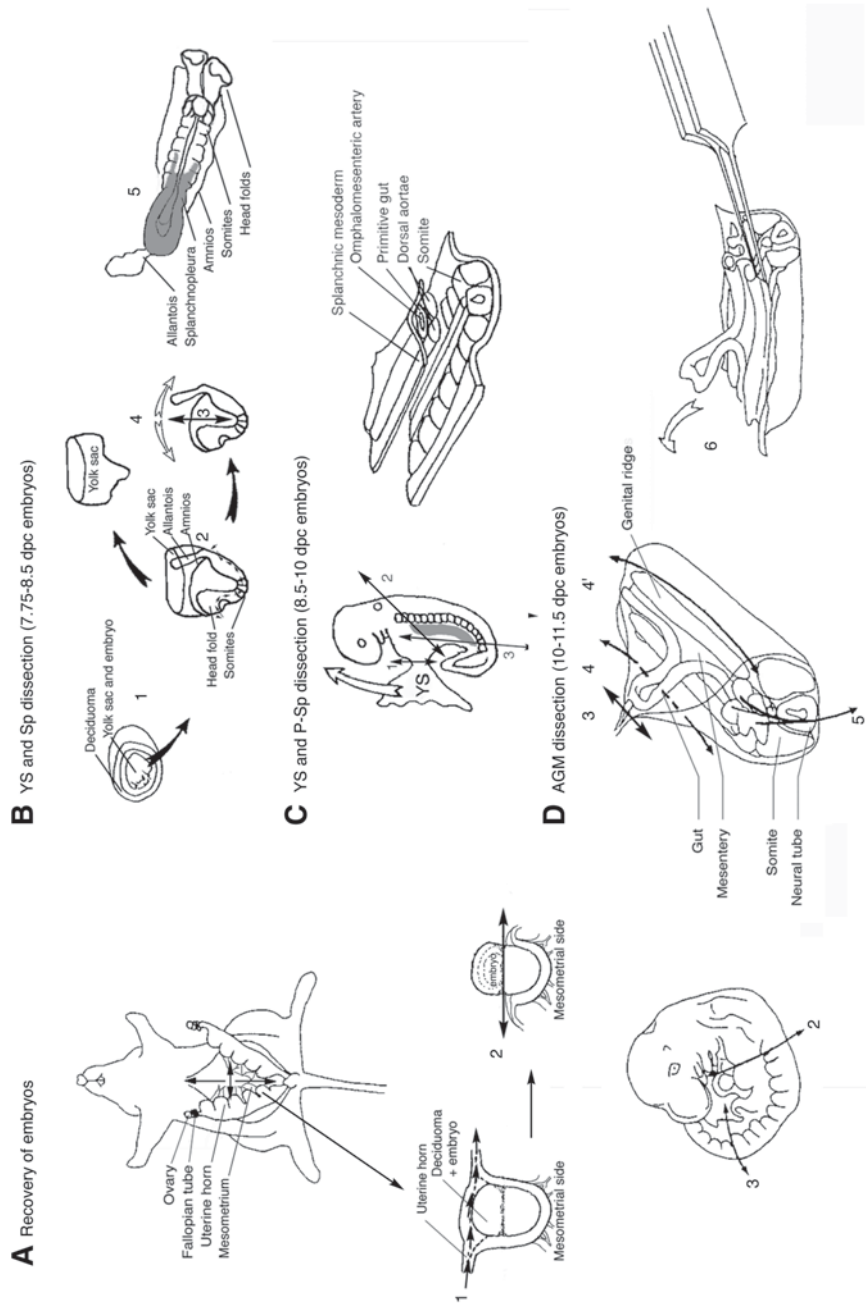


Fig. 2. Dissection of embryonic sites involved in hematopoietic development. (A) Embryo recovery from pregnant mice. (B) YS and Sp dissection: 7.5–8 dpc, up to 4S; (C) YS and P-Sp dissection: 8.5–10 dpc; 5–30S. (D) YS and AGM dissection: 10–11.5 dpc; 30–45S.

the embryo flattened by pulling the amnion towards the head and tail (**Fig. 2B,5**). Sp (in grey) is removed by grabbing it at the base of the allantois and pulling it towards the heart region.

3.1.4. YS and P-Sp: 8.5–10 dpc; 5-30S (**Fig. 2C**)

1. Explant the YS by sectioning it close to the body wall and by tearing it apart.
2. To reveal the P-Sp and free it from anatomical connections that would prevent its removal, dissect the trunk region as shown in **Fig. 2C**. Remove the P-Sp (in grey) by grabbing it anteriorly, below the somite, and pulling it towards the caudal region.

3.1.5. YS and AGM: 10–11.5 dpc; 30–45S (**Fig. 2D**)

1. Explant the YS by tearing it apart and sectioning it close to the body wall.
2. AGM is freed from anatomical connections to the body wall by three cuts, as shown in **Fig. 2D**. Carefully remove the fetal liver and lung buds. Grab the AGM anteriorly, at the edges of the genital ridges. Lift up and pull towards the caudal region of the embryo. Care should be taken at this stage to remove all the fetal liver.

3.2. In Situ Hybridization With Cryostat Sections and Whole Mouse Embryos

3.2.1. Riboprobe Synthesis and Purification

1. Mix linearized template deoxyribonucleic acid (DNA) equivalent to 1 μg with probe in labeling solution.
2. Incubate mixture at 37°C for 2–3 h for *in vitro* transcription.
3. Add 2 μL of DNase I and 1 μL of RNasin to the reaction tube, place on ice, and then spin down, to terminate the reaction.
4. Digest away plasmid DNA by incubation at 37°C for 30 min.
5. Terminate DNase reaction by addition of 200 μL of TE.
6. Precipitate RNA by addition of 20 mL of 4 M LiCl and 600 μL of ethanol. Incubate for 30 min at -80°C or overnight at -20°C .
7. Collect RNA pellet by centrifugation for 30 min at 15,500g. Remove the supernatant.
8. Add 1 mL of 70% ethanol, mix and centrifuge for 15 min at 15,500g.
9. Remove the supernatant and air dry the pellet.
10. Dissolve the RNA probe in 100 μL of 10 mM EDTA. The probe may be checked on an agarose minigel (1X TBE) and the concentration determined (1.0 A_{260} OD corresponds to single stranded RNA at 40 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.2. Fixation, Storage, and Processing

1. For whole-mount embryo *in situ* hybridization (WISH), embryos are soaked in whole-mount *in situ* hybridization fixative solution (WISH-FIX) overnight at 4°C and washed in PBT. The embryos may be treated at this stage or dehydrated through a MeOH/PBT series (25:75%, 50:50%, 75:25%) finishing with MeOH (100%) and stored up to 1 mo at -20°C .
2. For *in situ* hybridization (ISH), embryos are soaked in ISH fixative solution (ISH-FIX) and washed first in ISH buffer, then in phosphate 0.12 M, 15% sucrose buffer. All steps are performed overnight at 4°C. The embryos are first placed in 0.12 M phosphate, 15% sucrose, 7.5% gelatin buffer (predissolved at 37°C) for at least 1 h at 37°C, then placed in the appropriate orientation in the same mixture in small plastic dishes and allowed to cool at room temperature. After trimming, the embedded embryos are placed in isopentane (frozen at -80°C in liquid nitrogen) for 1 min and stored at -80°C . The embedded embryos are cryosectioned at 10–15 μm and transferred to Superfrost slides. These can be stored at -20°C for up to 1 yr.

Table 1
Duration of PK Treatment Depending on Developmental Stage of Embryos

Stage	Presomitic stage	0-10 s	10-20 s	20-30 s	30-35 s	35-40 s	40-50 s
Duration	2–3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min

3.2.3. Prehybridization Washes and Hybridization

1. WISH: embryos stored in MeOH must be rehydrated in MeOH/PBT (5 min in each: 75%:25%, 50%:50%, 25%:75%, finishing with PBT). Then, they are treated with proteinase K (PK: 10 µg/mL in PBT) to allow easy access of probes and antibodies. The duration of the PK treatment depends on the developmental stage of the embryos (**Table 1**). The reaction is performed at room temperature and stopped by a 5-min wash in PBT. Embryos may then be re-fixed in 4% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in PBT for 20 min at room temperature to better maintain its structure. Then, the embryos are rinsed twice in PBT, once in PBT/WISH-buffer (1:1). Embryos can be stored at –20°C up to 1 mo, after a final wash in WISH buffer. The embryos in WISH buffer are placed at 70°C for at least 1 h. Then, they are incubated in preheated hybridization mix containing the labelled probe overnight at 70°C. Total probe concentration should not exceed 1 µg/mL.
2. ISH: Sections are defrosted at room temperature for at least half an hour while prewarming ISH buffer (65°C) and lining a Perspex box with Whatman paper wetted with 1X salt and 50% formamide buffer. The probe is diluted in prewarmed ISH buffer (0.1–1 µg/mL) and denatured for 5 to 10 min at 70°C. One hundred microliters of probe is added to each slide, which is then covered with a cover slip. It does not matter if the probe does not cover completely all the sections at this stage, as it spreads during hybridization. Hybridization is carried out overnight at 70°C in sealed Perspex box.

3.2.4. Blocking and Antibody Staining

1. WISH: unbound probe is rinsed twice and washed 2 × 30 min in hybridization buffer, then 2 × 20 min in mixture of hybridization buffer/MABT (1:1) at 70°C on a shaker. Embryos are rinsed twice and washed twice for at least 1 h in MABT at room temperature on a shaker.
2. ISH: slides are transferred into a rack and washed 15 min at 65°C in washing solution to allow cover slips to fall off, then washed 2 × 30 min in the same solution. After, they are washed 2 × 30 min in MABT at room temperature.
3. Nonspecific binding sites are blocked before antibody treatment by placing the embryos or sections in blocking solution (MABT containing 2% blocking reagent and 20% heat inactivated goat serum) and incubating at room temperature on a shaker for at least 1h.
4. Embryos for WISH are incubated on a shaker in blocking solution containing a 1/2000 dilution (0.375 U/mL) of Fab fragments from an anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase overnight at room temperature. The embryos are rinsed and washed three times for 1 h in MABT then twice for 10 min in NTMT (prepared just before use) at room temperature.
5. For ISH, each slide is covered with 100 µL of blocking solution with antidigoxigenin antibody (as in **step 4**) and covered with a cover slip, placed in a PBS or water humidified chamber and incubated overnight at room temperature. After allowing cover slips to fall off during the MABT wash, sections are further washed four to five times in MABT for 20 min at room temperature.

3.2.5. Staining Reaction

Incubation with staining solution is performed in the dark at 37°C. Staining may appear rapidly in the embryonic regions in which the mRNA is strongly expressed. Because development of staining is usually slower for cells expressing low levels of the mRNA, several hours to a few days may be required to obtain full expression (*see Note 3*). When color has developed to the desired extent, wash embryos or sections 3 times in PBT (**Fig. 3**).

3.3. Organ Cultures of YS and Sp Explants From 7.5 to 8 dpc Mouse Embryos

1. Explant YS and Sp at 7.5 to 8 dpc as shown in **Fig. 2B**.
2. Using a siliconized Pasteur pipet, deposit individual explants into single wells of 24-well plates containing 2 mL of Complete Medium per well.
3. Incubate plates at 37°C, 5% CO₂ for 2 to 4 d.
4. At the end of the organ culture, YS and Sp explants have developed. **Figure 4** shows YS and Sp explants after a 4-d organ culture. The explants can now be enzymatically dissociated and the cells obtained tested for the presence of hematopoietic progenitors in *in vitro* and *in vivo* experiments, in bulk or after cell sorting (**2**).

3.3.1. Dissociation Protocol

1. Remove two-thirds of the culture medium. Dissociate explant by gently passing through 26-gage needle attached to 1-mL syringe (from BD Plastipak, 300015) 10 times.
2. Allow debris to sediment by gravity.
3. Collect the suspension above the debris (*see Note 4* for a procedure to increase cell recovery).

3.4. Hematopoietic Potential Analysis in Suspension Cultures

3.4.1. Culture Conditions

3.4.1.1. FEEDER CELLS

Hematopoietic progenitors cannot develop in suspension without the presence of feeder cells. We use the OP9 stromal cell line, derived from bone marrow of the *op/op* mouse, as feeders (**10**). OP9 cells can be amplified and maintained in OptiMEM 10% fetal calf serum (FCS), 1% antibiotics and 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol at 37°C, 5% CO₂. Plates seeded with OP9 feeder cells should be prepared 1 d before the start of culture. We have also successfully used S17 stromal cells in this protocol.

3.4.1.2. PREPARATION OF CULTURE PLATES COATED WITH OP9 STROMAL CELLS

1. Add 4 mL of trypsin–EDTA to OP9 cell monolayer in culture flask (75-cm² flask). Incubate for 10 min at room temperature.
2. Collect cells and wash once in HBSS containing 5% of FCS.
3. Centrifuge cells and resuspend pellet in 1 mL of Complete Medium (OptiMEM 10% FCS 1% antibiotics).
4. Count OP9 after dilution in Trypan blue.
5. Plate cells at a concentration of 5×10^4 living cells per milliliter of Complete Medium.
6. Dispense 50 μ L of stromal cell suspension per well of a flat bottomed 96-well plate or 500 μ L per well of a 24-well plate.
7. Incubate OP9 cells overnight in an incubator.
8. Irradiate OP9 cells at 400 rads to stop their proliferation.

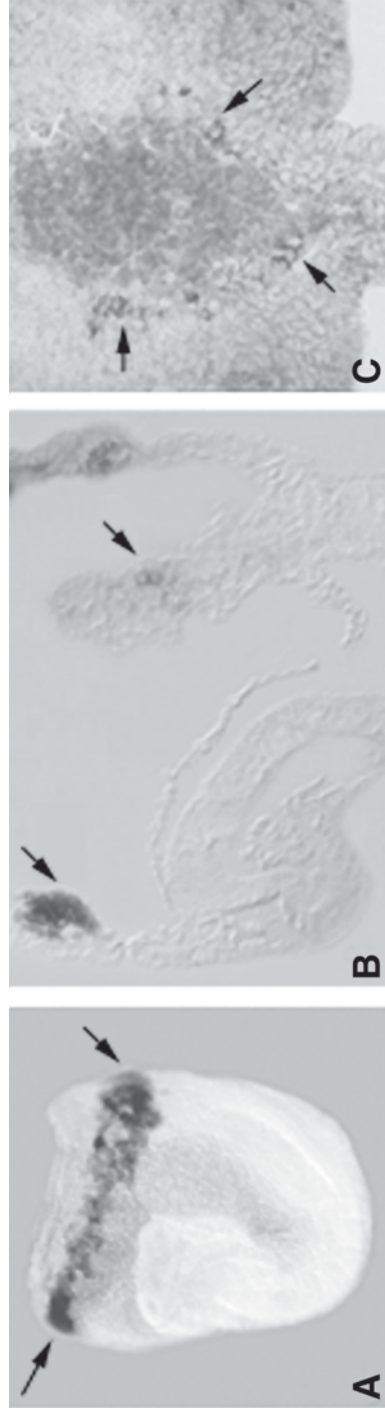


Fig. 3. ISH. (A) WISH on 8 dpc mouse embryo: erythroid cells that express the embryonic globin gene *bH1* can be detected in the YS (arrows). (B) Section of an 8 dpc embryo previously WISH-hybridized with a probe against the *Lmo-2* transcription factor to detect expression in YS hematopoietic precursors. (C) GATA-3 detection by ISH on section of 10.5 dpc embryo. Expression of this transcription factor is seen in the AGM (arrows).

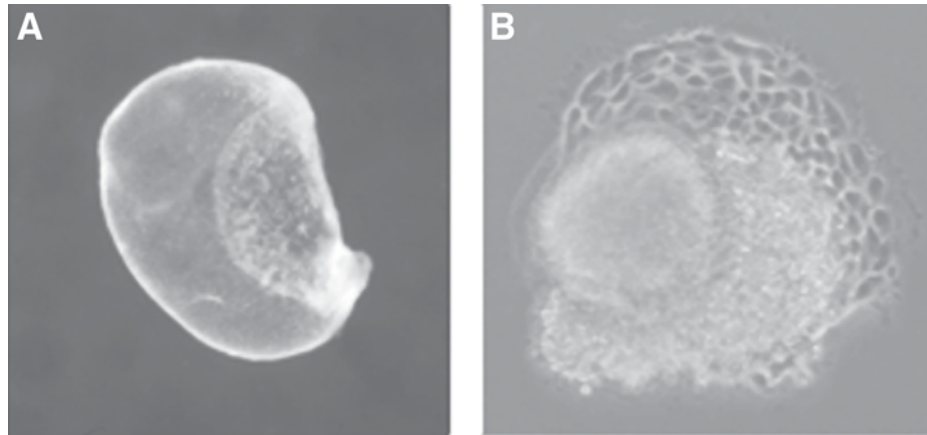


Fig. 4. (A) 8 dpc YS after 3 d in organ culture. (B) 8 dpc Sp after 3 d in organ culture.

3.4.1.3. HEMATOPOIETIC CULTURES

1. Suspend putative hematopoietic precursors in Complete Medium.
2. Deposit 50 μL of this suspension into each well containing an OP9 stromal cell layer. Each well now contains 100 μL (OP9 + progenitors; *see Note 5*).
3. OP9 cells cannot produce M-CSF and FLT3-L, but express c-kit-L and IL-7, though in limited amounts. For this reason, we add cytokines to the medium to provide an appropriate environment for proliferation and differentiation. Complete Medium supplemented with c-Kit-L, IL-7, and FLT3-L (each of those twice concentrated) is then prepared and 100 μL added to each well. Under these conditions, multipotent hematopoietic precursors can differentiate towards lymphoid, myeloid and erythroid lineages. (If differentiation of the erythroid lineage is to be studied, erythropoietin should be added to the cytokine cocktail at a concentration of 8 U/mL).
4. Culture for 12 to 14 d at 37°C, 5% CO₂.
5. On d 6 of culture, remove half of the medium from each well. (Carefully remove the medium with a multi-channel pipet, preferably at the surface, to avoid removing developing cells). Replace with 100–150 μL of fresh medium supplemented with FLT3-L and IL-7 only. Excess of c-Kit-L in the culture favors the development of mast cells that can overgrow.
6. At the end of the culture period, analyze the well contents by flow cytometry.

3.4.2. Fetal Thymic Organ Cultures (FTOCs)

1. Suspension cultures do not allow the differentiation of T lymphocytes. When T-cell potential is to be analyzed, FTOCs must be performed (*II*).
2. Isolate 14 to 15 dpc embryos. Recover individual thymic lobes using a fine forceps. Place in HBSS.
3. Irradiate thymic lobes at 3000 rads to deplete proliferating endogenous hematopoietic precursors.
4. FTOCs are done in a two-step process:
 - a. Colonization of thymic rudiment is achieved by a hanging drop culture. Wells of Terasaki plates are seeded with 30 μL of cell suspension. Individual lobes are then

placed in each well and the plate is turned upside down. Terasaki plates are incubated (37°C, 5% CO₂) in an inverted position for 1 to 2 d.

- b. The second step consists of a 14-d culture on a filter. To this end, 35mm culture dishes are filled with 3.5 to 4 mL of complete medium. A filter is then gently placed floating on the medium. The Terasaki plate is placed in upright position and the lobes are transferred onto the floating filter with a fine forceps (*see Note 6*). After the 14-d culture, lobes are dissociated and single cell suspension is analyzed by flow cytometry. To be sure that the developing lymphocytes are of donor origin, we use a congenic combination of thymic lobes expressing the Ly5.2xLy5.1 isoform of CD45 and colonizing cells from Ly5.2 embryos.

3.5. Phenotypic Analysis of the Hematopoietic Progeny

3.5.1. Flow Cytometry Analysis

1. After a 2-wk culture, cells from each well are analyzed by flow-cytometry for the presence of lineage-specific surface markers: CD19 for lymphoid B cells, CD4 and CD8 for T-cells, Mac-1 for myeloid cells, and Ter119 for erythrocytes (**Fig. 5**). Other antibodies can be used for a more precise analysis.
2. Transfer cells from each culture well into wells of a round-bottomed 96-well plate. Spin down the plate for 2 to 3 min at 4 to 500g, 4°C. Excess medium in the wells is flicked off by inverting the plate vigorously on a paper towel.
3. Prepare staining mix in PBS containing 3% FCS and 10 mM sodium azide (Facs Medium). We use CD19-FITC, Ter119-PE, and Mac-1-APC, for the suspension culture. For FTOC, we use CD4-PE, CD8-APC, and Ly5.1-FITC (exclusion of recipient cells) at previously determined dilutions. Resuspend each cell pellet in 25 µL of the staining mix. Incubate 15 to 20 min at 4°C in the dark.
4. At the end of the incubation period, wash the cells in Facs medium. Add 200 µL per well, then spin 2 to 3 min at 4 to 500g, 4°C.
5. During the spin, prepare Facs medium with propidium iodide (PI, 0.5 µg/mL). PI is a DNA intercalator, passively entering the nucleus of dead cells. PI gives equal fluorescence in the flow cytometer for filters detecting phycoerythrin and Cy5-phycoerythrin conjugates. It also permits exclusion of dead cells that appear on the diagonal of the plot of both parameters.
6. Wash stained cells. Resuspend the pellets in Facs medium-PI and analyze by flow cytometry. Use the SSC parameter in linear mode so that you can easily distinguish between mononuclear cells (low SSC) and granulocytes (high SSC).

4. Notes

1. Breeding schedule: for occasional experiments, it is better to set up a large number of cages (e.g., 18), each containing two females and one male, overnight. To obtain a regular supply of embryos or to obtain embryos at various developmental stages for the same experiment, it is advantageous to mate four females with a single male for four consecutive days. In this case, the number of breeding males is about eight. To optimize breeding efficiency, record the number of plugs obtained for each male. For the breeding colony, keep only those males that mate efficiently.
2. Explant transfer: embryonic explants are small and fragile and tend to collapse at the liquid/medium interface during transfer or to stick to the Pasteur pipet. We overcome this difficulty by: a) filling the culture dishes up to the top; b) using siliconized Pasteur pipets; and c) monitoring the transfer under a binocular microscope

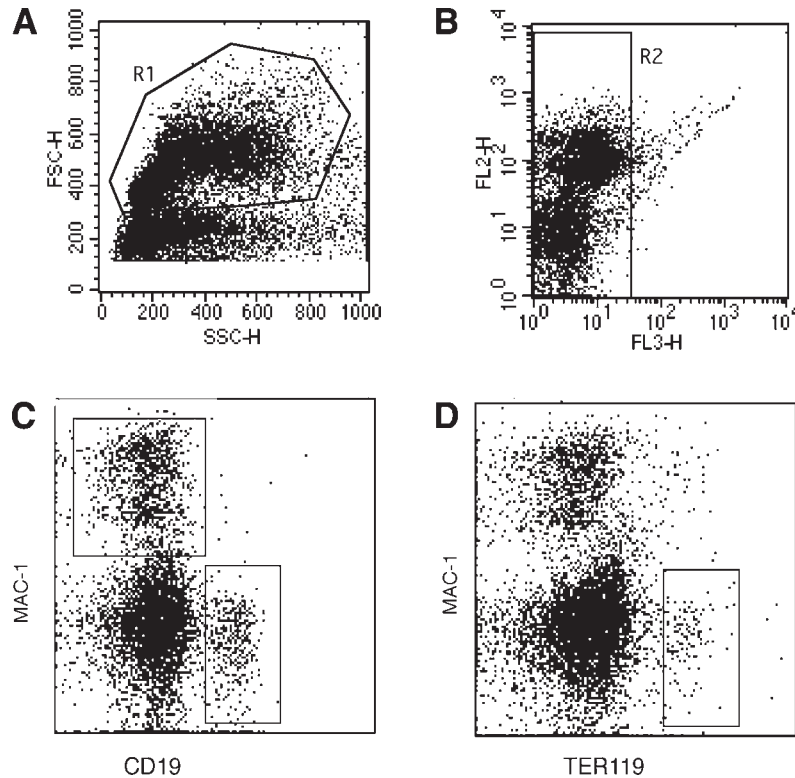


Fig. 5. FACS analysis of suspension culture well. The progeny of a single AGM progenitor was analyzed after 12-d suspension culture, as described. Cells were scored for the presence of erythroid (Ter119), myeloid (Mac-1), and lymphoid (CD19) markers. FSC/SSC plot (A) shows gate R1 excluding debris. (B) FL2/FL3 plot, gated on R1 cells, shows gate R2 excluding dead cells (the fluorescence on the diagonal is the result of PI incorporation). Plots (C,D) gated on R1 and R2 cells, show the repartition of cultured cells in the main lineages: erythroid and lymphoid. Knowing that a single cell gave rise to these progeny, multipotentiality could be ascribed to this cell.

3. Visualization of ISH staining: to optimize the hybridization signal, staining speed may be controlled by incubation at room temperature or 4°C. The reaction can even be stopped for up to 2 d by a wash in MABT, followed by incubation in a new staining solution, when necessary. To ensure that the full expression pattern has been obtained, it is useful to terminate the staining reaction at different times for groups of embryos, until over-expression is observed.
4. Optimization of cell recovery: although YS grow in organ culture in a three-dimensional manner and are therefore easy to recover from the plate, Sp explants grow tightly attached to the dish (see Fig. 4). To maximize Sp cell recovery, medium is flushed laterally to the explant with a 1-mL syringe fitted with a 26-gauge needle. Lifting of the whole explant from the culture plate is ascertained by inspection under an inverted microscope.

After mechanical dissociation of the explant, debris can be further subjected to a trypsin-EDTA treatment for 5 min at room temperature. Inactivate trypsin by addition of FCS and collect cells by centrifugation.

5. Culture conditions on OP9 and S17 stromal cells: OP9 stromal cells are contact inhibited and they do not overgrow the cultures. Irradiation can, therefore, be omitted. When using other stromal cell lines such as S17 cells, irradiation (2Gy) is required. Under these conditions, all stromal cells have died after 5 d. Immature B cell precursors have a strict requirement for stromal cells. However, we have not seen improvement in the yield of hematopoietic cells if cultures are passed onto a freshly irradiated feeder layer.
6. For optimal FTOC growth, care should be taken that: a) the lobe falls in the meniscum of the drop, when the Terasaki plate is turned upside down; b) the filter is still floating on the medium after transfer of the colonized lobes; and c) the plates are shaken during the incubation period. If you have problems keeping the filters floating at the air-medium interface, you can use hemostatic sponges in the culture medium.

Acknowledgments

The work is supported by grants from the French Ministry of Research (ACI Developmental Biology) to A.C. and I.G. and grant no. 4441 from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" to I.G. The Unité du Développement des Lymphocytes is supported by the "Ligue Nationale de la Recherche contre le Cancer" as a registered laboratory. J.Y.B. is supported by the French Ministry of Research and Education.

References

- 1 Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* **126**, 5073–5084.
- 2 Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996) Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* **86**, 907–916.
- 3 Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P., and Godin, I. (2001) Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* **15**, 477–485.
- 4 Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995) Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 773–777.
- 5 Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993) An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**, 64–67.
- 6 Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897–906.
- 7 Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1999) Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J. Exp. Med.* **190**, 43–52.
- 8 Manaia, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lievre, F., et al. (2000) Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* **127**, 643–653.
- 9 Downs, K. M. and Davies, T. (1993) Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255–1266.

- 10 Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994) Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265**, 1098–1101.
11. Jenkinson, E. J., Anderson, G., and Owen, J. J. (1992) Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. *J. Exp. Med.* **176**, 845–853.

Discussion et perspectives

Chez les vertébrés supérieurs, la mise en place du système hématopoïétique s'effectue en deux étapes. Au cours de l'embryogenèse, un premier contingent de cellules hématopoïétiques apparaît dans une annexe de l'embryon, le sac vitellin. Dans ce site, les cellules produites n'arborent pas les capacités de différenciation et d'auto-renouvellement permettant de caractériser fonctionnellement les CSH telles qu'elles existent dans la MO adulte. Pourtant, les cellules différenciées à partir de ces PH sont indispensables au développement embryonnaire, et l'inactivation de gènes (comme SCL/Tal-1 et lmo2) ayant pour conséquence l'abolition de ce potentiel conduit irrévocablement à la mort de l'embryon.

Le second site de génération de précurseurs prend place dans l'embryon au niveau du mésoderme de la splanchnopleure intra-embryonnaire. C'est à partir de cette région de l'embryon que se développe l'AGM où les premières CSH sont retrouvées au niveau des « clusters » intra-aortiques et des plages sous-aortiques. L'inactivation de certains gènes abolie spécifiquement perturbe la génération des CSH dans ce site sans modifier la production de PH dans le SV.

Dans les deux sites hématogènes de l'embryon, les PH apparaissent à partir du mésoderme splanchnopleural. Même si l'origine embryologique des feuillettes responsables de ce potentiel diffère, initialement, les événements de détermination à l'origine de l'émergence du potentiel hématopoïétique dans ces deux sites semblent en partie communs. De l'ensemble de ces constatations, il apparaît que l'embryon constitue un puissant modèle pour l'analyse des phénomènes responsables des propriétés de différenciation et d'autorenouvellement des CSH. Lors de l'introduction, nous avons pu voir que dans l'embryon, les PH du SV et de la SpPA/AGM co-existent un certain temps dans l'embryon. Pourtant, le point le plus fondamental est que les deux types de PH résultent de deux événements de détermination distincts dans le temps et dans l'espace. Dans cette mesure, en se plaçant à des stades où les connexions entre le SV et le compartiment intra-embryonnaire ne sont pas établies, ces deux types de précurseurs peuvent être étudiés indépendamment, et comparés (Cumano et al., 1996; Cumano et al., 2001).

Bien sûr, l'embryon de souris n'est pas aussi accessible que celui de poulet, ce qui interdit des méthodes de type greffes de tissus embryonnaires, pour aborder cette question. D'autre part, les techniques de routine utilisées pour l'analyse de l'hématopoïèse adulte, ne sont pas toujours faciles à utiliser. Nous devons donc développer des approches méthodologiques adaptées à ces stades de développement précoces qui, en complément des études réalisées avec les cellules ES, peuvent apporter des informations essentielles sur les mécanismes régulant les propriétés des cellules souches de l'embryon.

Toutes les cellules somatiques de l'organisme ont en commun de posséder un répertoire d'expression génique qui est propre à leur fonction/tissu. Plus en amont, lors des étapes de

détermination de ces différents tissus, à partir par exemple du mésoderme, il est également possible de caractériser un ensemble de gènes qui agissent pour instruire la détermination vers ces différents tissus. Dans les deux sites hématopoïétiques de l'embryon, certains de ces gènes (comme BMP-4, SCL/Tal-1, lmo2), essentiels à la détermination vers la voie hématopoïétique sont déjà caractérisés. D'autre part, il apparaît qu'au moment de la détermination des PH, et plus tard au moment de leur génération, des gènes impliqués dans le développement hématopoïétique présentent une expression différentielle entre ces deux sites. En particulier, l'expression du facteur de transcription GATA-3 est systématiquement associée au site de production et de génération des PH intra-embryonnaires, alors qu'il n'est pas exprimé dans le SV (Bertrand et al., 2005b; Manaia et al., 2000). Ces gènes constituent en quelque sorte la signature de la présence des CSH et constituent de bons candidats pour permettre d'expliquer les différences de potentialités entre les PH des deux sites et être responsables des capacités de différenciation et de maintien plus important des CSH.

Pour évaluer le potentiel de gènes exprimés dans le site intra-embryonnaire et absents du SV, nous devons disposer d'une méthode permettant de moduler l'expression génique dans les précurseurs hématopoïétiques. La différence de potentiel entre les PH d'origine extra- et intra-embryonnaires n'étant pas uniquement la conséquence d'un événement de détermination différent, cette méthode devait nous permettre de cibler à la fois les précurseurs mésodermiques/pré-hématopoïétiques et les précurseurs hématopoïétiques après leur génération. En effet, dans le SV, les premiers PH différenciés apparaissent entre 7 et 7,5 jdg. Le mésoderme dont ils dérivent est instruit principalement lors de la migration des cellules de l'épiblaste au contact de l'endoderme du SV (Kinder et al., 1999; Palis et al., 1995), lors des toutes premières étapes de la gastrulation entre les stades ES et MS (Downs and Davies, 1993). Le rôle de l'endoderme est crucial tant pour l'instruction du mésoderme natif vers la voie hématopoïétique que pour le développement ultérieur des PH au sein des îlots sanguins (Baron, 2005). Ces deux étapes (instruction du mésoderme et différenciation des cellules mésodermiques) constituent des moments clé au cours desquels il serait potentiellement possible d'intervenir sur le destin de ces PH. Des différentes analyses effectuées en comparant l'efficacité de plusieurs méthodes de transduction, il est apparu que le transfert de gènes dans ces différents types de précurseurs nécessite la combinaison de plusieurs approches expérimentales.

Dans le SV, au moment de la détermination des PH, le microenvironnement joue un rôle crucial dans l'acquisition du potentiel hématopoïétique. En particulier, les interactions endoderme-mésoderme sont indispensables à l'émergence des PH. Nous avons constaté que les

méthodes classiques de transduction des cellules hématopoïétiques (infection rétrovirale) n'étaient pas adaptées à la transduction des précurseurs mésodermiques/pré-hématopoïétiques du SV. L'électroporation *in situ* s'est avérée être le moyen le plus efficace pour transduire ces précurseurs, tout en préservant l'intégrité de leur séquence de différenciation. Cette technique est à l'heure actuelle tout à fait adaptée à des études de type qualitatives. Bien sûr, elle est quantitativement peu efficace, mais son faible rendement n'a pas pour cause l'efficacité de la technique employée. A ces stades, le nombre de précurseurs obtenus dans nos conditions de culture est très faible et constitue alors le véritable élément limitant. Dans cette mesure, toutes approches expérimentales permettant d'augmenter le nombre de précurseurs obtenus potentialiseraient l'utilisation de l'électroporation *in situ*.

Ciblage des précurseurs mésodermique précoces du SV: développements liés à la culture en hypoxie : Une des possibilités est que nos conditions de cultures ne permettent pas de « recueillir » tous les précurseurs présents dans le SV aux stades considérés. En effet, l'embryon se développe en condition hypoxique (Lee et al., 2001), et de nombreuses études tendent à impliquer la tension en oxygène sur la capacité des PH à s'amplifier, en particulier dans le lignage érythroïde (Adelman et al., 1999; Makita et al., 2005; Ramirez-Bergeron et al., 2004; Yoon et al., 2006). Nous avons donc entrepris d'évaluer les effets de la culture en hypoxie sur le nombre de PH accessibles à partir d'embryons de 7 jdg. C'est d'ailleurs dans cette optique que j'ai eu l'occasion d'encadrer un étudiant de M1 cette année.

De nos expériences préliminaires, il est apparu que la culture de SV en conditions d'hypoxie permettait d'augmenter très significativement le nombre de précurseurs érythroïdes obtenus (ce qui était attendu (Yoon et al., 2006)), mais également le nombre de précurseurs multipotents obtenus à partir d'embryons de 7 jdg. Cette méthode de culture, couplée à l'électroporation *in toto* nous permettra de disposer d'un nombre suffisant de PH pour pouvoir aborder l'étude de l'effet d'un transfert génique à ces stades, non seulement d'un point de vue qualitatif, mais aussi quantitatif. Après l'électroporation, les SV seront disséqués et placés en culture organotypique. C'est à ce moment précis que nous pouvons tirer parti des avantages de la culture en hypoxie, car les précurseurs ciblés lors de l'électroporation pourraient alors être plus nombreux. Ce développement récent nous permettra en particulier d'évaluer l'effet de l'expression ectopique de GATA-3 au moment de la détermination du mésoderme vers la voie hématopoïétique, en reproduisant ainsi, dans le compartiment extra-embryonnaire l'expression qui prévaut dans la Sp au moment de la détermination des CSH (Manaia et al., 2000).

Transfert de gènes dans le mésoderme de la Sp : Nous avons également testé l'efficacité de l'électroporation *in situ* pour transduire le mésoderme de la Sp, au moment de la détermination des CSH (Stades LHF-4 S ; 8 jdg). Le protocole que j'ai établi nous a permis d'obtenir une progénie hématopoïétique typique (activité multi-lignage) à partir de cellules GFP⁺ issues du mésoderme de la Sp électroporée à 8jdg. Comme dans le cas du SV, l'approche par électroporation *in situ*, couplée à la culture en condition hypoxique, devrait nous permettre d'analyser le rôle de différents gènes dans la détermination du mésoderme de la Sp vers la voie hématopoïétique. Il serait avantageux de tester au préalable les effets d'une culture en hypoxie sur le nombre de PH obtenus, mais nous pouvons d'ores et déjà supposer que ces effets pourraient être identiques à ceux observés dans le SV précoce.

L'infection rétrovirale : Un moyen efficace pour transduire les PH du sac vitellin à 8 jdg : Lors de mes expériences de test d'efficacité de transduction des PH à 8 jdg, l'infection rétrovirale s'est révélée particulièrement efficace. Conscient de l'intérêt d'une telle méthode sur ce type de précurseurs, j'ai décidé de travailler plus particulièrement à optimiser cette technique. Ceci s'explique en partie par le fait que les données de la littérature quant à l'utilisation de l'infection rétrovirales sur des SV de ces stades étaient très parcellaires (Kyba et al., 2002), et ne permettaient pas raisonnablement de définir un protocole directement utilisable. D'une manière générale, on peut dire que le matériel biologique est précieux et rare. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit de travailler sur des embryons à des stades aussi précoces. L'objectif de ces mises au point était de définir les conditions les plus favorables à l'obtention d'un pourcentage de cellules transduites important, associé à la possibilité d'effectuer en aval tous les tests classiques de caractérisation du potentiel hématopoïétique *in vivo* et *in vitro*. De fait, le SV s'est révélé un tissu très facile à transduire avec des rétrovirus, puisqu'il est aisé d'obtenir des taux de transduction supérieurs à 50% sans véritable contrainte quant à la quantité de surnageant utilisée. Cela constitue un autre avantage puisque des quantités importantes de surnageant pouvaient avoir des répercussions plus ou moins négatives sur la survie ou l'amplification des PH transduits. Nous devons avant tout disposer d'une méthode facile et rapide à mettre en œuvre. La préparation de surnageant rétroviraux est assez contraignante. Lors de la mise au point, j'ai pu démontrer qu'une MOI égale à 1 est suffisante pour obtenir un taux de transduction supérieur ou égal à 30 % dès 24 heures post infection. La reproductibilité de ces résultats constitue l'atout majeur de cette technique. Nous avons également montré que même si la transduction des SV directement après explantation permettait d'obtenir d'excellents taux de transduction (60 à 70%), une étape de culture organotypique était indispensable à l'obtention d'une progénie suffisamment importante pour effectuer les différents tests de potentialités hématopoïétiques.

Application de la méthode au mésoderme de la Sp : En ce qui concerne l'utilisation de l'infection rétrovirale, cette approche semble une alternative possible à l'électroporation *in situ*, surtout si le nombre des précurseurs disponibles à l'issue de la culture organotypique se trouvait être un facteur limitant. Contrairement au SV précoce, il est absolument impossible d'obtenir une progénie hématopoïétique à partir de la Sp sans passer par une étape de culture organotypique (Cumano et al., 1996; Cumano et al., 2001). La nécessité de cette étape nous interdit donc de travailler sur Sp dissociées. Reste alors la possibilité de cultiver l'explant en présence de surnageant.

Très rapidement après la mise en culture, l'explant de Sp adhère au plastique et forme une boule compacte. Durant cette étape initiale de la culture organotypique (qui dure 4 jours), la morphologie adoptée par l'explant limite considérablement les interactions avec le milieu de culture et donc avec les particules virales. En d'autres termes, il apparaît fort probable que, pour des raisons d'accessibilité, la transduction des PH de la Sp, comme celle des PH des SV à 7 jdg, ne puisse pas être réalisée à ce moment de la culture. Par contre, un peu plus tard (après 12 heures), l'explant change d'aspect, les cellules s'étalent, deviennent adhérentes et deviennent des cibles potentielles de l'infection rétrovirale. Reste à définir la structure de l'explant, et en particulier à vérifier si la structure tri-dimensionnelle est de type bi-feuillets (endoderme-mésoderme) à ce stade de la culture et permet encore la détermination vers la voie hématopoïétique, car ce sont les précurseurs de type mésodermique/pré-hématopoïétiques que nous voulons cibler à ce moment précis.

Comment tester le rôle de l'endoderme ? Dans les deux sites hématogènes, l'endoderme au contact du mésoderme diffère par son origine. Dans le SV, il est de type primitif, et dans le site intra-embryonnaire, il dérive, au moment de la gastrulation, des cellules de l'épiblaste. Nous avons déjà mentionné l'importance de ce feuillet dans l'induction et le maintien du développement des PH dans le SV. Comme dans le mésoderme hématopoïétique, il est possible de mettre en évidence un différentiel d'expression dans l'endoderme des deux sites au moment de la détermination. Par exemple, le facteur lmo-2, qui est exprimé à la fois dans le mésoderme intra- et extra-embryonnaire, n'est présent que dans l'endoderme de la Sp. De plus, GATA-3 qui est totalement absent du SV est exprimé dans l'endoderme de la Sp (Maniaia et al., 2000).

Pour évaluer l'implication de l'endoderme sur les différences de potentiel des PH des deux sites, l'infection rétrovirale n'est pas adaptée. En effet, il est difficile de concevoir un protocole qui permette de transduire uniquement l'endoderme en utilisant ce type d'approche. C'est pourquoi nous avons également testé la faisabilité d'un protocole utilisant l'électroporation *in*

situ. Nos résultats préliminaires démontrent que, dans le SV et la Sp, il est possible de transférer très efficacement l'endoderme en utilisant l'électroporation *in situ*.

Disposant d'une méthode efficace pour transduire les PH du SV, nous pouvions aborder le vif du sujet, c'est-à-dire l'évaluation de l'effet de l'expression ectopique de GATA-3 sur les PH du SV à 8 jdg. Nous avons discuté de l'implication des facteurs GATA dans la spécification de lignage ou la différenciation cellulaire. Il apparaît que, en particulier dans les premières étapes du développement du système hématopoïétique, l'action des facteurs GATA sur leurs gènes cibles passe par la mise en place d'un complexe transcriptionnel impliquant SCL/Tal-1, Irf2, Ldb1 (Clim 2) (Wadman et al., 1997). Dans les sites extra- et intra-embryonnaire, l'ensemble de ces facteurs est co-exprimé aux sites de détermination et de génération des PH. Contrairement au facteur GATA-2, qui est exprimé dans les deux sites hématopoïétiques (Kobayashi-Osaki et al., 2005; Silver and Palis, 1997), l'expression de GATA-3 est restreinte au site impliqué dans l'établissement de l'hématopoïèse définitive et il est totalement absent du SV (Maniatis et al., 2000).

Pour débiter l'analyse fonctionnelle de GATA-3 dans l'émergence des précurseurs hématopoïétiques de l'embryon, nous avons choisi dans un premier temps de tester les effets de son expression ectopique sur le devenir des PH de SV à 8 jdg. En résumé, ces expériences nous ont permis de mettre en évidence la capacité de GATA-3 à amplifier et maintenir les précurseurs immatures du SV. Le même type d'effet n'a pas été observé lors de l'expression ectopique de GATA-5, qui était effectuée comme contrôle de spécificité. Les données que nous avons obtenues dans le cas de la surexpression de GATA-1 sont encore partielles et nous devons les compléter par l'analyse systématique de l'effet de ce facteur sur le potentiel de différenciation et d'amplification des précurseurs des différents lignages. Néanmoins, il est d'ores et déjà acquis que l'effet de GATA-3 n'est pas identique à celui exercé par la surexpression de GATA-1.

Persistence des précurseurs mésodermiques dans les SV en culture ? De façon assez inattendue, nous avons identifié dans les cultures à J4 post infection une population cellulaire amplifiée par GATA-3 et qui semble répondre à un phénotype de type mésodermique/pré-hématopoïétique. Cette observation pose la question de la persistance éventuelle de ce type de précurseurs dans les SV à 8 jdg. En effet, à partir du stade MS, l'essentiel du mésoderme hématopoïétique est inséré dans le SV (Kinder et al., 1999) et nous ne savons pas s'il existe encore des événements de détermination à des stades ultérieurs. Il est donc nécessaire de caractériser fonctionnellement ces cellules et en particulier de vérifier si elles sont capables

d'engendrer une progénie hématopoïétique. En effet, il est possible que leurs propriétés diffèrent de celles des cellules répondant au même phénotype, qui sont présentes dans le SV aux stades précédents (7jdg). En effet, elles ont probablement subi des influences ultérieures lors de la différenciation des îlots sanguins. Dans cette mesure, les effets produits par GATA-3, observés sur les PH de 8 jdg, pourraient ne pas refléter l'éventail complet de son implication dans les étapes de détermination du lignage hématopoïétique. Dans ce cas, l'analyse du potentiel de cellules mésodermiques GATA3⁺ obtenues après électroporation *in situ* de SV de 7jdg constituera un excellent point de comparaison.

Spécificité fonctionnelle des facteurs GATA au cours du développement hématopoïétique :

Il serait aussi très informatif de compléter cette étude par l'analyse des effets de la surexpression de GATA-3 dans la Sp. L'analyse de l'inactivation de GATA-3 chez la souris n'a pas permis de mettre en évidence un défaut majeur de la mise en place de l'hématopoïèse définitive (Ting et al., 1996). GATA-2, qui est exprimé à la fois dans la Sp et l'AGM (Kobayashi-Osaki et al., 2005), pourrait masquer les effets de l'absence de GATA-3 sur les PH du lignage définitif. En faveur d'effets en synergie de plusieurs facteurs GATA, il faut noter que dans le SV, l'inactivation simultanée de GATA-2 et de GATA-1 se traduit par une absence totale de PH (Fujiwara et al., 2004). Les souris invalidées pour GATA-2 sont capables de générer des PH (Tsai et al., 1994). Au moins dans le SV, GATA-1 ne serait donc pas complètement disqualifié vis-à-vis d'un rôle éventuel dans la détermination ou la génération des PH. Nous disposons d'un dominant négatif de GATA-3, le GATA-3 KRR, qui est capable d'inhiber *in vitro* la transactivation par GATA-1, -2 et -3 (Smith et al., 1995). Mes expériences préliminaires de surexpression de ce facteur dans les SV à 8 jdg par transduction rétrovirale tendent à montrer qu'il est capable d'exercer le même type d'action inhibitrice sur la fonction GATA-2 et GATA-1 dans les PH du SV. En effet, le potentiel clonogénique des PH transduits avec ce facteur est drastiquement diminué. L'analyse des effets de ce dominant négatif sur les PH du site intra-embryonnaire nécessite un certain nombre de mises au point. Lors de l'établissement de notre protocole d'électroporation du mésoderme du SV, nous avons choisi d'utiliser un vecteur de type pEGFP qui permet de fusionner la GFP avec le gène d'intérêt. Il est courant de co-transfecter, chez l'embryon de poulet, un plasmide rapporteur (GFP, b-galactosidase) en même temps que le plasmide contenant le gène d'intérêt, en particulier pour visualiser les cellules transfectées. Une façon de tester les fonctions spécifiques des facteurs GATA dans la Sp (au moment de la détermination des CSH) ou dans l'AGM (au moment de leur génération), consisterait à co-transfecter le vecteur GATA-3-KRR, en combinaison soit avec GATA-3, soit avec GATA-2. Le potentiel des cellules obtenues à l'issue de ces transfections doubles pourrait alors être comparé à

celui de cellules obtenues à partir de Sp ou d'AGM d'embryons invalidés pour GATA-3 ou GATA-2. Enfin, dans le SV, ce type d'approche permettrait par exemple d'évaluer une fonction possible de GATA-1 dans la détermination des PH.

Surexpression de GATA-3 dans l'AGM : Il est très intéressant de noter que les rares données de la littérature rapportant les effets d'une surexpression de GATA-3 dans les cellules hématopoïétique de l'adulte sont en relative contradiction avec nos résultats obtenus dans les PH du SV. Par exemple, dans les CSH de l'adulte (Chen and Zhang, 2001), la surexpression de GATA-3 conduit à une production accrue de BFU-E. Néanmoins, contrairement à nos résultats obtenus sur les PH du SV, le lignage mégacaryocytaire est également augmenté et globalement, ces modifications s'effectuent aux dépens des lignages lymphoïdes et myéloïdes. L'effet de GATA-3 sur les précurseurs myéloïdes est opposé dans le SV, puisque leur nombre est augmenté dès le premier jour de culture. En ce qui concerne le lignage lymphoïde, les potentialités de différenciation réduites des PH du sac vitellin ne permettent pas d'évaluer d'effet dans ce lignage. L'analyse de la capacité de reconstitution *in vivo* des CSH transduites par GATA-3 a également révélé une incapacité de ces cellules à contribuer à la reconstitution à long terme de l'hématopoïèse (Chen and Zhang, 2001). Les CSH de l'adulte sont, en de nombreux points, différentes de celles de l'embryon. Dans cette mesure, il est possible que la surexpression de GATA-3 dans les CSH de l'AGM ne conduise pas exactement aux mêmes effets que chez l'adulte. Nous avons débuté l'analyse des effets de la surexpression de GATA-3 dans l'AGM à 10,5 jdg. Nos premiers résultats, obtenus en culture en méthyl-cellulose, montrent que le nombre de PH multipotents présent à J10 post infection est plus important dans les cultures d'AGM transduites par GATA-3 que dans celles du témoin MPI. Ces résultats nécessitent confirmation et devront être complétés par des analyses phénotypiques et de potentialité de reconstitution *in vivo* des CSH transduites. Dans l'AGM, le même type de population mésodermique/pré-hématopoïétique que celle existant dans le SV peut être caractérisé phénotypiquement (c-kit⁺/CD45⁻/CD31⁺) (Bertrand et al., 2005b). Il sera tout particulièrement intéressant de vérifier si, comme dans le SV, cette population est amplifiée par la surexpression de GATA-3.

Mécanismes à l'origine de la spécificité des facteurs GATA : La fonction des facteurs GATA est largement tributaire de l'interaction du doigt de zinc carboxy-terminal avec les séquences (A/T)GATA(AG) de l'ADN. Dans le système hématopoïétique (Bertrand et al., 2005b) ou dans le cerveau (Nardelli et al., 1999), les domaines d'expression des facteurs GATA se recouvrent partiellement, dans le temps et dans l'espace. Dans le lignage érythroïde, l'expression de différents facteurs GATA sous le contrôle du promoteur de GATA-1 a permis de

démontrer que la différenciation, au moins dans les étapes initiales, était indifférente au type de facteur GATA exprimé (Takahashi et al., 2000). Ceci pourrait en partie être la conséquence d'un effet « biologique » générique du doigt de zinc C-terminal. Dans ce cas, la spécialisation des facteurs GATA reposerait uniquement sur une séquence d'expression différentielle. Pourtant, toujours dans le système érythroïde, il apparaît que la régulation de l'expression de GATA-2 nécessite l'utilisation de facteurs GATA spécifiques pour certaines étapes de la différenciation. En effet, la nature du facteur GATA recruté sur une même séquence du promoteur du gène GATA-2 est capable d'induire une activation (dans le cas de la fixation de GATA-2) ou une répression (dans le cas de la fixation de GATA-1) de la transcription (Grass et al., 2003). Le doigt N-terminal participe au recrutement des différentes protéines composant le complexe transcriptionnel (Shimizu and Yamamoto, 2005). Dans ce cas, l'effet induit par GATA-1 ou GATA-2 est la conséquence d'une spécificité intrinsèque au GATA utilisé.

Lors de l'expression ectopique de GATA-3 dans le SV, plusieurs effets ont été mis en évidence. Pour identifier leur spécificité dans les différents types de précurseurs, il était indispensable de pouvoir les comparer aux effets induits par d'autres facteurs GATA au même stade et dans le même système. Un des avantages de l'approche par surexpression ou expression forcée est qu'elle permet de tester la fonction de différents facteurs apparentés à un moment précis de la différenciation cellulaire ou, comme dans notre cas, à un moment précis du développement. L'analyse comparée de l'expression forcée de GATA-3 et GATA-5, ainsi que celle de la surexpression de GATA-1 dans les PH du SV constituait un puissant outil pour étudier la spécialisation des facteurs GATA. En effet, nous avons pu mettre en évidence que les cibles de ces facteurs, si elles sont parfois communes, ne réagissent pas de façon identique. Une conséquence intéressante découlant de cette étude de la fonction de GATA-3 dans les PH du SV, est de montrer que la spécificité de l'ensemble des facteurs GATA peut être étudié dans les cellules de l'embryon, comme il l'est dans les cellules ES.

Conclusion

L'analyse des étapes précoces du développement hématopoïétique chez la souris est difficilement accessible à l'expérimentation scientifique. Ceci tient au fait qu'aux stades les plus précoces, le nombre de précurseurs hématopoïétiques disponibles pour une étude quantitative est faible. Un point fondamental pour moduler l'expression génique dans les PH de l'embryon est qu'il faut tenir compte du fait qu'en fonction des stades de développement, les cellules n'ont pas nécessairement les mêmes propriétés, tant du point de vue de leur potentiel que de leur capacité à être transduites. C'est mesurant ces différents paramètres que j'ai pu mettre au point au cours de ma thèse un protocole expérimental qui permet de cibler les précurseurs du SV à différente étape

de leur développement. J'ai en partie mis à profit un des protocoles établis pour analyser la fonction de GATA-3 dans les PH du SV à 8 jdg.

Il est de toute évidence prématuré de vouloir modéliser de façon complète la fonction des facteurs GATA, et en particulier le rôle précis de GATA-3, dans les différentes étapes du développement hématopoïétique, compte tenu des données encore très parcellaires, surtout en ce qui concerne l'AGM où il n'existe pas de résultats permettant une analyse intégrée. Ce travail est le point de départ d'une étude qui pourrait être beaucoup plus ambitieuse. En effet, la fiabilité du protocole d'infection de PH à 8 jdg offre la possibilité de tester efficacement et surtout quantitativement les effets de la surexpression d'un gène d'intérêt. L'approche par électroporation *in situ*, même si elle est, pour l'instant, quantitativement peu efficace, offre pour la première fois la possibilité de transférer des gènes à un moment précis du développement dans les PH les plus immatures. L'approche par électroporation *in situ* s'impose de plus en plus comme une technique très efficace pour étudier la fonction des gènes. L'utilisation combinée de ces techniques pour l'analyse des mécanismes régulant le développement hématopoïétique de l'embryon permettra dans le futur d'obtenir des informations qui pourront être confrontées à celles obtenues grâce à l'utilisation de cellules ES ou de souris invalidées.

Références

A

- Abramson, S., Miller, R. G., and Phillips, R. A. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* *145*, 1567-1579.
- Adelman, D. M., Maltepe, E., and Simon, M. C. (1999). Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev* *13*, 2478-2483.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193-197.
- Andreason, G. L., and Evans, G. A. (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* *6*, 650-660.
- Arai, F., Hirao, A., and Suda, T. (2005). Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int J Hematol* *82*, 371-376.
- Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, K. M. (2002). Cutting edge: Identification of an alternative GATA-3 promoter directing tissue-specific gene expression in mouse and human. *J Immunol* *168*, 4268-4271.

B

- Baron, M. H. (2001). Molecular regulation of embryonic hematopoiesis and vascular development: a novel pathway. *J Hematother Stem Cell Res* *10*, 587-594.
- Baron, M. H. (2005). Early patterning of the mouse embryo: implications for hematopoietic commitment and differentiation. *Exp Hematol* *33*, 1015-1020.
- Baumann, C. I., Bailey, A. S., Li, W., Ferkowicz, M. J., Yoder, M. C., and Fleming, W. H. (2004). PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood* *104*, 1010-1016.
- Beaupain, D., Martin, C., and Dieterlen-Lièvre, F. (1979). Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood* *53*, 212-225.
- Belaoussoff, M., Farrington, S. M., and Baron, M. H. (1998). Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development* *125*, 5009-5018.
- Bellantuono, I. (2004). Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* *36*, 607-620.
- Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T., and Owen, M. E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* *99 (Pt 1)*, 131-139.
- Bertrand, J., Manaiá, A., Van Celst, J., Cumano, A., and Godin, I. (2006a). Origin and fate of hematopoietic precursors in the early mouse embryo., In *Hematopoietic Stem Cell Development*, I. G. a. A. Cumano, ed. (Georgetown, New York: Landes Kluwer dual imprint), pp. 108-123.
- Bertrand, J. Y., Desanti, G. E., Lo-Man, R., Leclerc, C., Cumano, A., and Golub, R. (2006b). Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. *Development* *133*, 3619-3628.
- Bertrand, J. Y., Giroux, S., Cumano, A., and Godin, I. (2005a). Hematopoietic stem cell development during mouse embryogenesis. *Methods Mol Med* *105*, 273-288.
- Bertrand, J. Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and Cumano, A. (2005b). Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *PNAS* *102*, 134-139.
- Bertrand, J. Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., and Godin, I. (2005c). Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* *106*, 3004-3011.
- Blobel, G. A., Simon, M. C., and Orkin, S. H. (1995). Rescue of GATA-1-deficient embryonic stem cells by heterologous GATA-binding proteins. *Mol Cell Biol* *15*, 626-633.
- Boehm, T., Foroni, L., Kaneko, Y., Perutz, M., and Rabbitts, T. (1991). The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci Usa* *88*, 4367-4371.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* *396*, 594-598.
- Bradley, T. R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* *44*, 287-299.
- Briegel, K., Lim, K. C., Plank, C., Beug, H., Engel, J. D., and Zenke, M. (1993). Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev* *7*, 1097-1109.
- Burdon, T., Smith, A., and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* *12*, 432-438.

C

- Calegari, F., Marzesco, A. M., Kittler, R., Buchholz, F., and Huttner, W. B. (2004). Tissue-specific RNA interference in post-implantation mouse embryos using directional electroporation and whole embryo culture. *Differentiation* 72, 92-102.
- Calvi, L. M. (2006). Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 477-488.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F. R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.
- Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, 117.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Capron, C., Lecluse, Y., Kaushik, A. L., Foudi, A., Lacout, C., Sekkai, D., Godin, I., Albagli, O., Poullion, I., Svinartchouk, F., *et al.* (2006). The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* 107, 4678-4686.
- Charbord, P., Remy-Martin, J. P., Tamayo, E., Bernard, G., Keating, A., and Peault, B. (2000). Analysis of the microenvironment necessary for engraftment: role of the vascular smooth muscle-like stromal cells. *J Hematother Stem Cell Res* 9, 935-943.
- Charron, F., and Nemer, M. (1999). GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol* 10, 85-91.
- Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkenkin, J. D., Meloche, S., and Nemer, M. (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev* 15, 2702-2719.
- Chen, D., and Zhang, G. (2001). Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis. *Exp Hematol* 29, 971-980.
- Chen, X. D., and Turpen, J. B. (1995). Intraembryonic origin of hepatic hematopoiesis in *Xenopus laevis*. *J Immunol* 154, 2557-2567.
- Chiba, S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24, 2437-2447.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.
- Ciau-Uitz, A., Walmsley, M., and Patient, R. (2000). Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell* 102, 787-796.
- Colucci, F., Soudais, C., Rosmaraki, E., Vanes, L., Tybulewicz, V. L., and Di Santo, J. P. (1999). Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the *c-abl* proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J Immunol* 162, 2761-2765.
- Cormier, F., and Dieterlen-Lièvre, F. (1988). The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development* 102, 272-285.
- Craig, M. L., and Russell, E. S. (1964). A Developmental Change In Hemoglobins Correlated With An Embryonic Red Cell Population In The Mouse. *Dev Biol* 10, 191-201.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
- Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477-485.
- Cumano, A., Furlonger, C., and Paige, C. (1993). Differentiation and characterisation of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10-12 somite stage. *Proc Nat Acad Sci Usa* 90, 6429-6433.

D

- Davis, R. L., and Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P., and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 20, 161-171.

- de Bruijn, M. F., Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K., Sanchez, M. J., and Dzierzak, E. (2002). Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* *16*, 673-683.
- de Bruijn, M. F., Speck, N. A., Peeters, M. C., and Dzierzak, E. (2000). Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* *19*, 2465-2474.
- Dearolf, C. R. (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* *1377*, M13-23.
- Delassus, S., and Cumano, A. (1996). Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* *4*, 97-106.
- Delassus, S., Titley, I., and Enver, T. (1999). Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* *94*, 1495-1503.
- Dieterlen-Lièvre, F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* *33*, 607-619.
- Dieterlen-Lièvre, F., and Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric Avian development. *Developmental Biology* *88*, 180-191.
- Douagi, I., Andre, I., Ferraz, J. C., and Cumano, A. (2000). Characterization of T cell precursor activity in the murine fetal thymus: evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. *Eur J Immunol* *30*, 2201-2210.
- Douagi, I., Colucci, F., Di Santo, J. P., and Cumano, A. (2002). Identification of the earliest prethymic bipotent T/NK progenitor in murine fetal liver. *Blood* *99*, 463-471.
- Downs, K. M., and Davies, T. (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* *118*, 1255-1266.
- Drake, C. J., Brandt, S. J., Trusk, T. C., and Little, C. D. (1997). TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol* *192*, 17-30.
- Dubart, A., Romeo, P. H., Vainchenker, W., and Dumenil, D. (1996). Constitutive expression of GATA-1 interferes with the cell-cycle regulation. *Blood* *87*, 3711-3721.
- Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G., Alitalo, K., and Breitman, M. L. (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* *203*, 80-92.
- E**
- Elefanty, A. G., Begley, C. G., Hartley, L., Papaevangelidou, B., and Robb, L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* *94*, 3754-3763.
- Elefanty, A. G., Begley, C. G., Metcalf, D., Barnett, L., Kontgen, F., and Robb, L. (1998). Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11897-11902.
- Emmel, V. (1916). The cell clusters in the dorsal aorta of mammalian embryos. *Am J Anat*, 401-421.
- Endoh, M., Ogawa, M., Orkin, S., and Nishikawa, S. (2002). SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *Embo J* *21*, 6700-6708.
- F**
- Fehling, H. J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G., and Kouskoff, V. (2003). Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* *130*, 4217-4227.
- Ferkowicz, M. J., Starr, M., Xie, X., Li, W., Johnson, S. A., Shelley, W. C., Morrison, P. R., and Yoder, M. C. (2003). CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* *130*, 4393-4403.
- Froni, L., Boehm, T., White, L., Forster, A., Sherrington, P., Liao, X. B., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Rabbitts, T. H. (1992). The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. *J Mol Biol* *226*, 747-761.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S. H., and Schulz, R. A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11451-11456.

- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H., and Schulz, R. A. (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7342-7347.
- Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki Ji, J., and Niwa, H. (2002). Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* *16*, 784-789.
- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12355-12358.
- Fujiwara, Y., Chang, A. N., Williams, A. M., and Orkin, S. H. (2004). Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood* *103*, 583-585.
- Furuta, C., Ema, H., Takayanagi, S.-i., Ogaeri, T., Okamura, D., Matsui, Y., and Nakauchi, H. (2006). Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo. *Development* *133*, 2771-2779.

G

- Gadue, P., Huber, T. L., Nostro, M. C., Kattman, S., and Keller, G. M. (2005). Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp Hematol* *33*, 955-964.
- Galloway, J. L., and Zon, L. I. (2003). Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol* *53*, 139-158.
- Garcia-Porrero, J. A., Godin, I. E., and Dieterlen-Lievre, F. (1995). Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* *192*, 425-435.
- Garcia-Porrero, J. A., Manaia, A., Jimeno, J., Lasky, L. L., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. E. (1998). Antigenic profiles of endothelial and hemopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites. *Dev Comp Immunol* *22*, 303-319.
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H., and Mikkola, H. K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* *8*, 365-375.
- George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieu, K. H., Kiuoussis, D., Grosveld, F., and Engel, J. D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* *120*, 2673-2686.
- Gering, M., Rodaway, A. R., Gottgens, B., Patient, R. K., and Green, A. R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J* *17*, 4029-4045.
- Gering, M., Yamada, Y., Rabbitts, T. H., and Patient, R. K. (2003). Lmo2 and Scf/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development* *130*, 6187-6199.
- Gilleard, J. S., and McGhee, J. D. (2001). Activation of hypodermal differentiation in the *Caenorhabditis elegans* embryo by GATA transcription factors ELT-1 and ELT-3. *Mol Cell Biol* *21*, 2533-2544.
- Gimble, J. M., Robinson, C. E., Wu, X., and Kelly, K. A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* *19*, 421-428.
- Godin, I., and Cumano, A. (2002). The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* *2*, 593-604.
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryo, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci Usa* *92*, 773-777.
- Godin, I., Garcia Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., and Marcos, M. A. R. (1993). Paraaortic splanchnopleura contains B1a lymphocyte precursors. *Nature* *364*, 67-69.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1999). Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* *190*, 43-52.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* *183*, 1797-1806.
- Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D. F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S. A., Sieff, C. A., Mulligan, R. C., and Johnson, R. P. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* *3*, 1337-1345.
- Goyama, S., Yamaguchi, Y., Imai, Y., Kawazu, M., Nakagawa, M., Asai, T., Kumano, K., Mitani, K., Ogawa, S., Chiba, S., *et al.* (2004). The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* *104*, 3558-3564.

- Grass, J. A., Boyer, M. E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M. J., and Bresnick, E. H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8811-8816.
- Green, A. R., and Begley, C. G. (1992). SCL and related hemopoietic helix-loop-helix transcription factors. *Int J Cell Cloning* *10*, 269-276.
- Green, A. R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R., and Begley, C. G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* *7*, 653-660.
- Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* *94*, 87-96.

H

- Hadland, B. K., Huppert, S. S., Kanungo, J., Xue, Y., Jiang, R., Gridley, T., Conlon, R. A., Cheng, A. M., Kopan, R., and Longmore, G. D. (2004). A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* *104*, 3097-3105.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P., and Romain, P. (1997). Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev* *11*, 3096-3108.
- Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F. Y., Kitamura, Y., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1998). Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells* *3*, 39-50.
- Harris, M. L., and Erickson, C. A. (2006). Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev Dyn*.
- Hatano, S. Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev* *122*, 67-79.
- Heicklen-Klein, A., McReynolds, L. J., and Evans, T. (2005). Using the zebrafish model to study GATA transcription factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *16*, 95.
- Heitzler, P., Haenlin, M., Romain, P., Calleja, M., and Simpson, P. (1996). A genetic analysis of pannier, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* *143*, 1271-1286.
- Henderson, A. J., McDougall, S., Leiden, J., and Calame, K. L. (1994). GATA elements are necessary for the activity and tissue specificity of the T-cell receptor beta-chain transcriptional enhancer. *Mol Cell Biol* *14*, 4286-4294.
- Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F., and Karis, A. (1999). Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol* *29*, 1912-1918.
- Hepple, R. T. (2006). Dividing to keep muscle together: the role of satellite cells in aging skeletal muscle. *Sci Aging Knowledge Environ* *2006*, pe3.
- Herberth, B., Minko, K., Csillag, A., Jaffredo, T., and Madarasz, E. (2005). SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* *23*, 449-463.
- Herranz, H., and Morata, G. (2001). The functions of pannier during *Drosophila* embryogenesis. *Development* *128*, 4837-4846.
- Hinks, G. L., Shah, B., French, S. J., Campos, L. S., Staley, K., Hughes, J., and Sofroniew, M. V. (1997). Expression of LIM protein genes Lmo1, Lmo2, and Lmo3 in adult mouse hippocampus and other forebrain regions: differential regulation by seizure activity. *J Neurosci* *17*, 5549-5559.
- Hirschi, K., and Goodell, M. (2001). Common origins of blood and blood vessels in adults? *Differentiation* *68*, 186-192.
- Ho, A. D. (2005). Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* *33*, 1-8.
- Ho, I.-C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B. K., Tsai, S. F., Orkin, S. H., and Leiden, J. M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor gene. *The Embo Journal* *10*, 1187-1192.
- Hosoya-Ohmura, S., Mochizuki, N., Suzuki, M., Ohneda, O., Ohneda, K., and Yamamoto, M. (2006). GATA-4 Incompletely Substitutes for GATA-1 in Promoting Both Primitive and Definitive Erythropoiesis in Vivo. *J Biol Chem* *281*, 32820-32830.
- Houssaint, E. (1981). Differentiation of the mouse hepatic primordium: II- Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. *Cell Diff* *10*, 243-252.

- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* *11*, 774-785.
- Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J., and Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* *432*, 625-630.
- Huber, T. L., Zhou, Y., Mead, P. E., and Zon, L. I. (1998). Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* *92*, 4128-4137.
- Humphries, R. K., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 3629-3633.
- Ikonomi, P., Rivera, C. E., Riordan, M., Washington, G., Schechter, A. N., and Noguchi, C. T. (2000). Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol* *28*, 1423-1431.

I

- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* *194*, 237-255.
- Itasaki, N., Bel-Vialar, S., and Krumlauf, R. (1999). 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat Cell Biol* *1*, E203-E207.
- Ito, E., Toki, T., Ishimara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., and Engel, J. a. Y. M. (1993). Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* *362*, 466-468.

J

- Jaffe, L., Jeannotte, L., Bikoff, E. K., and Robertson, E. J. (1990). Analysis of beta 2-microglobulin gene expression in the developing mouse embryo and placenta. *J Immunol* *145*, 3474-3482.
- Jaffe, L., Robertson, E. J., and Bikoff, E. K. (1991). Distinct patterns of expression of MHC class I and beta 2-microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J Immunol* *147*, 2740-2749.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Brajeul, V., and Dieterlen-Lievre, F. (2000). Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev Biol* *224*, 204-214.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* *125*, 4575-4583.
- Jippo, T., Mizuno, H., Xu, Z., Nomura, S., and Yamamoto, M. a. K. Y. (1996). Abundant expression of transcription factor GATA-2 in proliferating but not differentiated mast cells in tissues of mice: demonstration by in situ hybridization. *Blood* *87*, 993-998.
- Johnson, G. R., and Moore, M. (1975). Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* *258*, 726-729.
- Jones, C. M., Dale, L., Hogan, B. L., Wright, C. V., and Smith, J. C. (1996). Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* *122*, 1545-1554.
- Joulin, V., and Richard-Foy, H. (1995). A new approach to isolate genomic control regions. Application to the GATA transcription factor family. *Eur J Biochem* *232*, 620-626.

K

- Kanatsu, M., and Nishikawa, S. (1996). In vitro analysis of epiblast tissue potency for hematopoietic cell differentiation. *Development* *122*, 823-830.
- Kanatsu, M., Takakura, N., Kataoka, H., Tsuchida, K., Nishikawa, S., and Nishikawa, S. (1997). In vitro analysis of potency restriction during epiblast differentiation. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 457-459.
- Karis, A., Pata, I., van Doorninck, J. H., Grosveld, F., de Zeeuw, C. I., de Caprona, D., and Fritsch, B. (2001). Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol* *429*, 615-630.
- Kelley, C., Yee, K., Harland, R., and Zon, L. I. (1994). Ventral expression of GATA-1 and GATA-2 in the *Xenopus* embryo defines induction of hematopoietic mesoderm. *Dev Biol* *165*, 193-205.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* *386*, 488-493.
- Kimber, S. J., and Surani, M. A. (1982). Spreading of blastomeres from eight-cell mouse embryos on lectin-coated beads. *J Cell Sci* *56*, 191-206.
- Kinder, S. J., Tsang, T. E., Quinlan, G. A., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., and Tam, P. P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* *126*, 4691-4701.

- Kingsley, P. D., Malik, J., Emerson, R. L., Bushnell, T. P., McGrath, K. E., Bloedorn, L. A., Bulger, M., and Palis, J. (2006). "Maturational" globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood* 107, 1665-1672.
- Ko, L. J., and Engel, J. D. (1993). DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13, 4011-4022.
- Ko, L. J., Yamamoto, M., Leonard, M. W., George, K. M., and Ting, P. a. E. J. (1991). Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T cell receptor d gene enhancer. *Mol Cell Biol* 11, 2778-2784.
- Kobayashi-Osaki, M., Ohneda, O., Suzuki, N., Minegishi, N., Yokomizo, T., Takahashi, S., Lim, K.-C., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2005). GATA Motifs Regulate Early Hematopoietic Lineage-Specific Expression of the Gata2 Gene. *Mol Cell Biol* 25, 7005-7020.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kopp, H. G., Avezilla, S. T., Hooper, A. T., and Rafii, S. (2005). The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 20, 349-356.
- Kornhauser, J. M., Leonard, M. W., Yamamoto, M., LaVail, J. H., Mayo, K. E., and Engel, J. D. (1994). Temporal and spatial changes in GATA transcription factor expression are coincident with development of the chicken optic tectum. *Brain Res Mol Brain Res* 23, 100-110.
- Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., *et al.* (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 18, 699-711.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A. M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129, 4891-4899.
- Kuo, H., Chen, J., Ruiz-Lozano, P., Zou, Y., Nemer, M., and Chien, K. R. (1999). Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* 126, 4223-4234.
- Kurata, H., Lee, H. J., McClanahan, T., Coffman, R. L., O'Garra, A., and Arai, N. (2002). Friend of GATA is expressed in naive Th cells and functions as a repressor of GATA-3-mediated Th2 cell development. *J Immunol* 168, 4538-4545.
- Kyba, M., Perlingeiro, R. C., and Daley, G. Q. (2002). HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors. *Cell* 109, 29-37.
- ## L
- Labastie, M. C., Cortes, F., Romeo, P. H., Dulac, C., and Peault, B. (1998). Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* 92, 3624-3635.
- Laity, J. H., Lee, B. M., and Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* 11, 39-46.
- Lane, M. C., and Smith, W. C. (1999). The origins of primitive blood in *Xenopus*: implications for axial patterning. *Development* 126, 423-434.
- Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Martin, C., and Dieterlen Lièvre, F. (1978). The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimaeras. *Nature* 272, 353.
- Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., and Dieterlen Lièvre, F. (1980). Lymphoid stem cells in the intraembryonic mesenchyme of the chicken. *Scand J Immunol* 11, 445.
- Lawson, K. A., Meneses, J. J., and Pedersen, R. A. (1986). Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer. *Dev Biol* 115, 325-339.
- Lawson, K. A., and Pedersen, R. A. (1987). Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* 101, 627-652.
- Le Douarin, N. (1969). Particularités du noyau interphasique chez la Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme 'marquage biologique' dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migration cellulaires au cours de l'ontogenèse. *Bull biol Fr Belg* 103, 435-452.
- Le Douarin, N., Jotereau, F. V., Houssaint, E., and Thiery, J. P. (1984). Primary lymphoid organ ontogeny in birds, In In Le Douarin Nm, Mc Laren A eds, *Chimeras in developmental biology*. Academic Press, London: pp. 179-216.

- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-149.
- Lee, S. K., Jurata, L. W., Nowak, R., Lettieri, K., Kenny, D. A., Pfaff, S. L., and Gill, G. N. (2005). The LIM domain-only protein LMO4 is required for neural tube closure. *Mol Cell Neurosci* 28, 205-214.
- Lee, Y. M., Jeong, C. H., Koo, S. Y., Son, M. J., Song, H. S., Bae, S. K., Raleigh, J. A., Chung, H. Y., Yoo, M. A., and Kim, K. W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn* 220, 175-186.
- Leonard, M. W., Lim, K.-M., and Engel, J. D. (1993). Expression of the chicken GATA factor family during early erythroid development and differentiation. *Development* 119, 519-531.
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 605-631.
- Li, W., Johnson, S. A., Shelley, W. C., Ferkowicz, M., Morrison, P., Li, Y., and Yoder, M. C. (2003). Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura (P-Sp) support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood*.
- Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., and Molkenin, J. D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276, 30245-30253.
- Lim, K. C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., and Engel, J. D. (2000). GATA-3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet* 25, 209-212.
- Lindeboom, F., Gillemans, N., Karis, A., Jaegle, M., Meijer, D., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2003). A tissue-specific knockout reveals that Gata1 is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids Res* 31, 5405-5412.
- Ling, K. W., Ottersbach, K., van Hamburg, J. P., Oziemlak, A., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Ploemacher, R., Hendriks, R. W., and Dzierzak, E. (2004). GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 200, 871-882.
- Lord, B. I. (1990). The architecture of bone marrow cell populations. *Int J Cell Cloning* 8, 317-331.
- Lowry, J. A., and Atchley, W. R. (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol* 50, 103-115.

M

- Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2002). The Ly-6A (Sca-1) GFP transgene is expressed in all adult mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 20, 514-521.
- Maeno, M., Mead, P. E., Kelley, C., Xu, R. H., Kung, H. F., Suzuki, A., Ueno, N., and Zon, L. I. (1996). The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* 88, 1965-1972.
- Maeno, M., Ong, R. C., Suzuki, A., Ueno, N., and Kung, H. F. (1994). A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10260-10264.
- Makita, T., Duncan, S. A., and Sucov, H. M. (2005). Retinoic acid, hypoxia, and GATA factors cooperatively control the onset of fetal liver erythropoietin expression and erythropoietic differentiation. *Developmental Biology* 280, 59-72.
- Manaia, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (2000). Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127, 643-653.
- Marshall, C. J., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2000). Polarized expression of bone morphogenetic protein-4 in the human aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* 96, 1591-1593.
- Marshall, C. J., Moore, R. L., Thorogood, P., Brickell, P. M., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (1999). Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev Dyn* 215, 139-147.
- Martin, D. I., Zon, L. I., Mutter, G., and Orkin, S. H. (1990). Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344, 444-447.
- Martin, P., Albagli, O., Poggi, M. C., Boulukos, K. E., and Pognonec, P. (2006). Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. *BMC Biotechnol* 6, 4.
- Matsubara, A., Iwama, A., Yamazaki, S., Furuta, C., Hirasawa, R., Morita, Y., Osawa, M., Motohashi, T., Eto, K., Ema, H., *et al.* (2005). Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks hematopoietic stem cells throughout development. *J Exp Med* 202, 1483-1492.
- Maximow, A. A. (1924). Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiological review* IV, 533-563.

- Mc Devitt, M., Fujimara, Y., and Shivdasani, R. a. O. S. (1997). An upstream, DNase I hypersensitive region of the hematopoietic-expressed transcription factor GATA-1 gene confers developmental specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci Usa* *94*, 7976-7981.
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J., and Palis, J. (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* *101*, 1669-1676.
- Mead, P. E., Deconinck, A. E., Huber, T. L., Orkin, S. H., and Zon, L. I. (2001). Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* *128*, 2301-2308.
- Mead, P. E., Kelley, C. M., Hahn, P. S., Piedad, O., and Zon, L. I. (1998). SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* *125*, 2611-2620.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* *86*, 897-906.
- Medvinsky, A. L., Gan, O. I., Semenova, M. L., and Samoylina, N. L. (1996). Development of day-8 colony-forming unit-spleen hematopoietic progenitors during early murine embryogenesis: spatial and temporal mapping. *Blood* *87*, 557-566.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* *364*, 64-67.
- Meister, M., and Govind, S. (2006). Hematopoietic development in *Drosophila*: a parallel with vertebrates, In *Hematopoietic Stem Cell Development*, I. G. a. A. Cumano, ed. (Georgetown, Texas, USA and New York, New York, USA: Landes Bioscience/Eurékah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers), pp. 124-141.
- Merika, M., and Orkin, S. H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* *13*, 3999-4010.
- Metcalf, D., and Moore, M. A. S. (1971). Embryonic aspects of haemopoiesis, In *Haematopoietic cells*, A. Neuberger et E.L. Tatum Eds, ed. (Amsterdam, London: North Holland Publish. Co.), pp. 173-271.
- Mikkola, H. K., Fujiwara, Y., Schlaeger, T. M., Traver, D., and Orkin, S. H. (2003). Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* *101*, 508-516.
- Milan, M., and Cohen, S. M. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: a tetramer of dLDB and apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Mol Cell* *4*, 267-273.
- Minegishi, N., Ohta, J., Suwabe, N., Nakauchi, H., Ishihara, H., Hayashi, N., and Yamamoto, M. (1998). Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem* *273*, 3625-3634.
- Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999). The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* *93*, 4196-4207.
- Minegishi, N., Suzuki, N., Yokomizo, T., Pan, X., Fujimoto, T., Takahashi, S., Hara, T., Miyajima, A., Nishikawa, S., and Yamamoto, M. (2003). Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* *102*, 896-905.
- Minko, K., Bollerot, K., Drevon, C., Hallais, M. F., and Jaffredo, T. (2003). From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. *Gene Expr Patterns* *3*, 261-272.
- Molkentin, J. D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* *275*, 38949-38952.
- Moore, M., and Owen, J. (1965). Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. *Nature* *208*, 956-989.
- Moore, M. A., and Owen, J. J. (1967). Experimental studies on the development of the thymus. *J Exp Med* *126*, 715-726.
- Moore, M. A. S., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* *18*, 279-296.
- Morrissey, E. E., Hon, S. I., Tang, Z., and Lu, M. a. P. M. (1997). Gata-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* *183*, 21-36.
- Morrison, S. J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* *441*, 1068-1074.
- Morrison, S. J., Shah, N. M., and Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* *88*, 287-298.
- Mouthon, M., Bernard O. Mitjavila M. T. Romeo P. H. Vainchenker W., and Mathieu, M. D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* *81*, 647-655.

- Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A. B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. A., Pietryga, D. W., Scott, W. J., Jr., and Potter, S. S. (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689.
- Mukouyama, Y., Chiba, N., Mucenski, M. L., Satake, M., Miyajima, A., Hara, T., and Watanabe, T. (1999). Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb. *Curr Biol* 9, 833-836.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y., and Okumura, J. (1997). Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 376-380.

N

- Naito, M., Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umezu H, Hasegawa G, Usuda H, Shultz LD, and K, T. (1996). Development, differentiation and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukocyte Biol* 59, 133-138.
- Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 210, 305-321.
- Nishida, W., Nakamura, M., Mori, S., Takahashi, M., Ohkawa, Y., Tadokoro, S., Yoshida, K., Hiwada, K., Hayashi, K., and Sobue, K. (2002). A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem* 277, 7308-7317.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998a). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., and Katsura, Y. (1998b). In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 8, 761-769.
- Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.

O

- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., and Peault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 129, 4147-4157.
- Ogawa, M., Kizumoto, M., Nishikawa, S., Fujimoto, T., Kodama, H., and Nishikawa, S. I. (1999). Expression of alpha4-integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. *Blood* 93, 1168-1177.
- Ohmura, K., Kawamoto, H., Lu, M., Ikawa, T., Ozaki, S., Nakao, K., and Katsura, Y. (2001). Immature multipotent hemopoietic progenitors lacking long-term bone marrow-reconstituting activity in the aorta-gonad-mesonephros region of murine day 10 fetuses. *J Immunol* 166, 3290-3296.
- Ohneda, K., and Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol* 108, 237-245.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
- Ono, Y., Fukuhara, N., and Yoshie, O. (1998). TAL1 and LIM-Only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* 18, 6939-6950.
- Orkin, S. H. (1992). GATA- binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-581.
- Orlowski, S., An, D., Belehradec, J., Jr., and Mir, L. M. (1998). Antimetastatic effects of electrochemotherapy and of histoincompatible interleukin-2-secreting cells in the murine Lewis lung tumor. *Anticancer Drugs* 9, 551-556.
- Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005). The Murine Placenta Contains Hematopoietic Stem Cells within the Vascular Labyrinth Region. *Developmental Cell* 8, 377-387.
- Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12, 27-37.

Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* *9*, 745-755.

P

Palis, J., Chan, R. J., Koniski, A., Patel, R., Starr, M., and Yoder, M. C. (2001). Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4528-4533.

Palis, J., McGrath, K. E., and Kingsley, P. D. (1995). Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood* *86*, 156-163.

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* *126*, 5073-5084.

Pan, X., Minegishi, N., Harigae, H., Yamagiwa, H., Minegishi, M., Akine, Y., and Yamamoto, M. (2000). Identification of human GATA-2 gene distal IS exon and its expression in hematopoietic stem cell fractions. *J Biochem (Tokyo)* *127*, 105-112.

Pan, X., Ohneda, O., Ohneda, K., Lindeboom, F., Iwata, F., Shimizu, R., Nagano, M., Suwabe, N., Philipsen, S., Lim, K. C., *et al.* (2005). Graded levels of GATA-1 expression modulate survival, proliferation, and differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem* *280*, 22385-22394.

Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis [see comments]. *Nat Genet* *11*, 40-44.

Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L. M., Catala, M., and Dieterlen-Lièvre, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* *122*, 1363-1371.

Patterson, L. J., Gering, M., and Patient, R. (2005). Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood* *105*, 3502-3511.

Peault, B., and Tavian, M. (2003). Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci* *996*, 132-140.

Peterkin, T., Gibson, A., Loose, M., and Patient, R. (2005). The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol* *16*, 83-94.

Petrenko, O., Beavis, A., Klaine, M., Kittappa, R., Godin, I., and Lemischka, I. (1999). The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4. *Immunity* *10*, 691-700.

Pevny, L., Lin, C. S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* *121*, 163-172.

Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.

Pierreux, C. E., Poll, A. V., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P., and Rousseau, G. G. (2005). Gene transfer into mouse prepancreatic endoderm by whole embryo electroporation. *Jop* *6*, 128-135.

Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1996). The T-cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* *86*, 47-57.

Pouget, C., Gautier, R., Teillet, M.-A., and Jaffredo, T. (2006). Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. *Development* *133*, 1013-1022.

Pratt, H. P., Ziomek, C. A., Reeve, W. J., and Johnson, M. H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol* *70*, 113-132.

Pulford, K., Lecoite, N., Leroy-Viard, K., Jones, M., Mathieu-Mahul, D., and Mason, D. Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* *85*, 675-684.

Q- R

Quesenberry, P. J., Stewart, F. M., Becker, P., D'Hondt, L., Frimberger, A., Lambert, J. F., Colvin, G. A., Miller, C., Heyes, C., Abedi, M., *et al.* (2001). Stem cell engraftment strategies. *Ann N Y Acad Sci* *938*, 54-61; discussion 61-52.

Ramain, P., Khechumian, R., Khechumian, K., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2000). Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol Cell* *6*, 781-790.

- Ramirez-Bergeron, D. L., Runge, A., Dahl, K. D., Fehling, H. J., Keller, G., and Simon, M. C. (2004). Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development* *131*, 4623-4634.
- Ranganath, S., and Murphy, K. M. (2001). Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development. *Mol Cell Biol* *21*, 2716-2725.
- Redick, S. D., and Bautch, V. L. (1999). Developmental platelet endothelial cell adhesion molecule expression suggests multiple roles for a vascular adhesion molecule. *Am J Pathol* *154*, 1137-1147.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M., and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and Drosophila. *Development* *122*, 4023-4031.
- Reiter, J. F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., and Stainier, D. Y. (1999). Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* *13*, 2983-2995.
- Robb, L., Elwood, N. J., Elefanty, A. G., Köntgen, F., Li, R., Barnett, L. D., and Begley, C. G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J* *15*, 4123-4129.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D., and Begley, C. G. (1995). Absence of Yolk sac Hematopoiesis from Mice with a Targeted Disruption of the scl Gene. *PNAS* *92*, 7075-7079.
- Rodrigues, N. P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D. M., Boyd, A. S., Orkin, S. H., Enver, T., Vyas, P., and Scadden, D. T. (2005). Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* *106*, 477-484.
- Romeo, P. H., Prandini, M. H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., and Uzan, G. (1990). Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* *344*, 447-449.
- Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* *19*, 477-482.
- Rylski, M., Welch, J. J., Chen, Y.-Y., Letting, D. L., Diehl, J. A., Chodosh, L. A., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (2003). GATA-1-Mediated Proliferation Arrest during Erythroid Maturation. *Mol Cell Biol* *23*, 5031-5042.

S

- Sabin, F. R. (1920). 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 contribution to embryology* *272*, 214-262.
- Samson, S. I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C. A., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., and Di Santo, J. P. (2003). GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* *19*, 701-711.
- Sanchez, M., Gottgens, B., Sinclair, A. M., Stanley, M., Begley, C. G., Hunter, S., and Green, A. R. (1999). An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* *126*, 3891-3904.
- Sanchez, M. J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* *5*, 513-525.
- Schuh, A. C., Faloon, P., Hu, Q. L., Bhimani, M., and Choi, K. (1999). In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2159-2164.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* *89*, 981-990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* *376*, 62-66.
- Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2005). Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *16*, 129.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L., and Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* *373*, 432-434.
- Siggers, P., Smith, L., and Greenfield, A. (2002). Sexually dimorphic expression of Gata-2 during mouse gonad development. *Mech Dev* *111*, 159-162.
- Silver, L., and Palis, J. (1997). Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* *89*, 1154-1164.

- Sinanan, A. C., Buxton, P. G., and Lewis, M. P. (2006). Muscling in on stem cells. *Biol Cell* 98, 203-214.
- Sinclair, A. M., Gottgens, B., Barton, L. M., Stanley, M. L., Pardanaud, L., Klaine, M., Gering, M., Bahn, S., Sanchez, M., Bench, A. J., *et al.* (1999). Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev Biol* 209, 128-142.
- Smith, E., Hargrave, M., Yamada, T., Begley, C. G., and Little, M. H. (2002). Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord. *Dev Dyn* 224, 231-237.
- Smith, P. B., Flajnik, M. F., and Turpen, J. B. (1989). Experimental analysis of ventral blood island hematopoiesis in *Xenopus* embryonic chimeras. *Dev Biol* 131, 302-312.
- Smith, V. M., Lee, P. P., Szychowski, S., and Winoto, A. (1995). GATA-3 dominant negative mutant. Functional redundancy of the T cell receptor alpha and beta enhancers. *J Biol Chem* 270, 1515-1520.
- Soares, M. L., Haraguchi, S., Torres-Padilla, M. E., Kalmar, T., Carpenter, L., Bell, G., Morrison, A., Ring, C. J., Clarke, N. J., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Functional studies of signaling pathways in peri-implantation development of the mouse embryo by RNAi. *BMC Dev Biol* 5, 28.
- Spangrude, G. J., Heimfield, D. S., and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.
- Stainier, D. Y. (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev* 16, 893-907.
- Sty, J. R., and Conway, J. J. (1985). The spleen: development and functional evaluation. *Semin Nucl Med* 15, 276-298.
- Sutherland, A. E., Speed, T. P., and Calarco, P. G. (1990). Inner cell allocation in the mouse morula: the role of oriented division during fourth cleavage. *Dev Biol* 137, 13-25.
- Suzuki, A., Thies, R. S., Yamaji, N., Song, J. J., Wozney, J. M., Murakami, K., and Ueno, N. (1994). A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10255-10259.
- Swartz, M., Eberhart, J., Mastick, G. S., and Krull, C. E. (2001). Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Dev Biol* 233, 13-21.
- Sánchez-García, I., and Rabbitts, T. H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends in Genetics* 10, 315-320.
- ## T
- Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y., and Yamamoto, M. (1997). Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 272, 12611-12615.
- Takahashi, S., Shimizu, R., Suwabe, N., Kuroha, T., Yoh, K., Ohta, J., Nishimura, S., Lim, K.-C., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2000). GATA factor transgenes under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. *Blood* 96, 910-916.
- Tam, P., Behringer, R. R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development* 68, 3-25.
- Tam, P. P., and Beddington, R. S. (1992). Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo. *Ciba Found Symp* 165, 27-41; discussion 42-29.
- Tavian, M., Cortes, F., Charbord, P., Labastie, M. C., and Peault, B. (1999). Emergence of the haematopoietic system in the human embryo and foetus. *Haematologica* 84 Suppl EHA-4, 1-3.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H. S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* 87, 67-72.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 1829-1837.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.
- Toles, J. F., Chui, D. H., Belbeck, L. W., Starr, E., and Barker, J. E. (1989). Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7456-7459.
- Tracey, W. D., Jr., Pepling, M. E., Horb, M. E., Thomsen, G. H., and Gergen, J. P. (1998). A *Xenopus* homologue of aml-1 reveals unexpected patterning mechanisms leading to the formation of embryonic blood. *Development* 125, 1371-1380.

- Traver, D., Miyamoto, T., Christensen, J., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., and Weissman, I. L. (2001). Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* *98*, 627-635.
- Tsai, F. Y., Browne, C. P., and Orkin, S. H. (1998). Knock-in mutation of transcription factor GATA-3 into the GATA-1 locus: partial rescue of GATA-1 loss of function in erythroid cells. *Dev Biol* *196*, 218-227.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* *317*, 221-226.
- Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* *89*, 3636-3643.
- Turpen, J. B., Kelley, C. M., Mead, P. E., and Zon, L. I. (1997). Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* *7*, 325-334.

U-V

- Ueno, H., and Weissman, I. L. (2006). Clonal Analysis of Mouse Development Reveals a Polyclonal Origin for Yolk Sac Blood Islands. *Developmental Cell* *11*, 519.
- van Eekelen, J. A., Bradley, C. K., Gothert, J. R., Robb, L., Elefanty, A. G., Begley, C. G., and Harvey, A. R. (2003). Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience* *122*, 421-436.
- Varterasian, M., Lipkowitz, S., Karsch-Mizrachi, I., Paterson, B., and Kirsch, I. (1993). Two new *Drosophila* genes related to human hematopoietic and neurogenic transcription factors. *Cell Growth Differ* *4*, 885-889.
- Viger, R. S., Mertineit, C., Trasler, J. M., and Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* *125*, 2665-2675.
- Visvader, J., and Begley, C. G. (1991). Helix-loop-helix genes translocated in lymphoid leukemia. *Trends Biochem Sci* *16*, 330-333.
- Visvader, J. E., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* *12*, 473-479.
- Vyas, P., McDevitt, M. A., Cantor, A. B., Katz, S. G., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1999). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* *126*, 2799-2811.

W

- Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H., and Baer, R. (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *Embo J* *13*, 4831-4839.
- Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* *16*, 3145-3157.
- Wall, L., deBoer, E., and Grosveld, F. (1988). The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* *2*, 1089-1100.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *Embo J* *21*, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L., and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *Embo J* *22*, 6516-6525.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. (1996). Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 3444-3449.
- Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Evans, M. J., Smith, A. J. H., and Rabbitts, T. H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein Rbtn-2 is essential for erythroid development. *Cell* *78*, 45-57.
- Watson, C. M., and Tam, P. P. (2001). Cell lineage determination in the mouse. *Cell Struct Funct* *26*, 123-129.
- Weiss, M. J., Keller, G., and Orkin, S. H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* *8*, 1184-1197.

- Weiss, M. J., and Orkin, S. H. (1995). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23, 99-107.
- Weissman, I., Papaioannou, V., and Gardner, R. (1978). Fetal hematopoietic origins of the adult hemolymphoid system, In *Differentiation of normal and neoplastic cells*, B. Clarkson, Mark, P., Till, J., ed. (New York: Cold Spring Harbour Laboratory), pp. 33-47.
- Wilt, F. H. (1965). Erythropoiesis In *The Chick Embryo: The Role Of Endoderm*. *Science* 147, 1588-1590.

X-Y

- Yamada, Y., Warren, A. W., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T. H. (1998). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3890-3895.
- Yamagata, T., Mitani, K., Oda, H., Suzuki, T., Honda, H., Asai, T., Maki, K., Nakamoto, T., Hirai, H., Nawijn, M. C., *et al.* (2000). Acetylation of GATA-3 affects T-cell survival and homing to secondary lymphoid organs. *Embo J* 19, 4676-4687.
- Yamamoto, M., Ko, L., Leonard, M., Beug, H., Orkin, S. H., and Engel, J. D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes and Development* 4, 1650-1662.
- Yee, N. S., Paek, I., and Besmer, P. (1994). Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med* 179, 1777-1787.
- Yoder, M. C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D. M., and Orlic, D. (1997). Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7, 335-344.
- Yoon, D., Pastore, Y. D., Divoky, V., Liu, E., Mlodnicka, A. E., Rainey, K., Ponka, P., Semenza, G. L., Schumacher, A., and Prchal, J. T. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem* 281, 25703-25711.

Z

- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193, 247-254.
- Zernicka-Goetz, M. (2002). Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129, 815-829.
- Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11, 473-482.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zheng, W.-P., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zhong, J. F., Zhao, Y., Sutton, S., Su, A., Zhan, Y., Zhu, L., Yan, C., Gallaher, T., Johnston, P. B., Anderson, W. F., and Cooke, M. P. (2005). Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *PNAS* 102, 2448-2453.
- Zhu, T. H., Bodem, J., Keppel, E., Paro, R., and Royer-Pokora, B. (1995). A single ancestral gene of the human LIM domain oncogene family LMO in *Drosophila*: characterization of the *Drosophila* Dlmo gene. *Oncogene* 11, 1283-1290.
- Zon, L. I., Gurish, M. F., Stevens, R. L., Mather, C., Reynolds, D. S., Austen, K. F., and Orkin, S. H. (1991a). GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J Biol Chem* 266, 22948-22953.
- Zon, L. I., Mather, C., Burgess, S., Bolce, M. E., Harland, R. M., and Orkin, S. H. (1991b). Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10642-10646.
- Zon, L. I., Tsai, S. F., Burgess, S., Matsudaira, P., and Bruns, G. a. O. S. (1990). The major erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci Usa* 87, 668-672.
- Zon, L. I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E. A., Kimura, A., Bennett, J. C., Orkin, S. H., and Ackerman, S. J. (1993). Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 81, 3234-3241.

