



HAL
open science

Caractérisation des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques dans le placenta et le sac vitellin au cours du développement embryonnaire

Noémie Naguet de Saint-Vulfran

► **To cite this version:**

Noémie Naguet de Saint-Vulfran. Caractérisation des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques dans le placenta et le sac vitellin au cours du développement embryonnaire. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT: 2012PAO66434 . tel-00833398

HAL Id: tel-00833398

<https://theses.hal.science/tel-00833398>

Submitted on 12 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École doctorale Complexité du vivant

Présentée par :

Noémie NAGUET DE SAINT VULFRAN

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biologie cellulaire, Biologie du développement et Cellules souches

**Caractérisation des populations enrichies en cellules souches
hématopoïétiques dans le placenta et le sac vitellin au cours du
développement embryonnaire**

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2012

devant le jury composé de :

Mme Michèle CROZATIER - Directeur de recherche au CNRS, Toulouse	Rapporteur
M. Georges UZAN - Directeur de recherche au CNRS, Villejuif	Rapporteur
M. Michael MANUEL - Professeur à l'UPMC, Paris	Examineur
Mlle Rima HADDAD - Maître de Conférences Paris Sud 11, Villejuif	Examineur
Mme Michèle SOUYRI - Directeur de recherche à l'INSERM, Paris	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à saluer ici les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse de doctorat. Ces remerciements sont rédigés dans un moment de doux relâchement intellectuel. J'ai laissé au hasard de ma mémoire le soin de retrouver ces personnes. Dans un autre état d'esprit, ces remerciements auraient certainement été tout autre, et j'aurais peut-être oublié un des noms qui suivent, mais j'ai choisi ce moment précis pour les écrire.

J'adresse toute ma reconnaissance à Catherine Jesus pour m'avoir accueillie dans son unité, me donnant ainsi la chance de réaliser ma thèse dans un environnement scientifique de grande qualité.

Je suis très reconnaissante à M. Georges Uzan et Mme Michèle Crozatier d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur, et à M. Michaël Manuel et Mlle Rima Haddad d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont faites sur mon projet de thèse.

Je remercie Michèle Souyri pour m'avoir fait découvrir la biologie du développement dans tous ses états, et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant que celui de la mise en place des cellules souches du sang.

Quand je suis arrivée en Master2, j'avais tout à apprendre et en ce sens, je remercie Laurence pour avoir contribué à ma formation pratique. Je la remercie également de m'avoir aidé pour les manip des derniers temps.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer à Villejuif et à Jussieu de nombreuses personnes attachantes : que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés. Je pense notamment à Charles qui m'a initiée aussi bien aux cellules souches qu'à l'enseignement, et qui m'a soutenue dans les moments difficiles ; Denis, qui a toujours eu le temps pour discuter lors de nos nombreux tris, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta disponibilité sans faille ; Cécile, merci pour ton enthousiasme et tes qualités pédagogiques que tu as su me transmettre en me laissant cette liberté dont j'avais besoin pour te montrer qui j'étais ; Thierry, merci pour tes précieux conseils qui m'ont permis de parfaire mon manuscrit ; Sophie, merci pour tes qualités d'artiste qui m'ont servi pour certaines illustrations.

Je dois également beaucoup à toutes les personnes qui ont fait partie de mon quotidien à un moment ou à un autre, et sans qui ces années auraient été bien moins enrichissantes : Maud et Estelle, je dirai

simplement merci pour les débuts, et merci pour la fin ; Laurent, merci pour ton soutien inconditionnel et tes nombreuses relectures ; Sophie, toi qui va me suivre de près, merci pour tout ces moments partagés et pour m'avoir fait don de ton amitié ; Aveline et Sandra, merci pour les fous rires causés par votre court-métrage ainsi que pour nos nombreuses discussions, je vous souhaite bonne chance pour la fin de vos thèses ainsi que pour la reprise du Festival ; Rodolphe, merci pour ton humour inégalable que je ne retrouverai nulle part ailleurs ; Viviane, merci pour tous les « à côtés » qui ont bien souvent ensoleillé les journées au labo. La liste est encore bien longue mais je n'oublie pas non plus Charlotte, Philippe, Justine, Marion, Adeline, Marie-Ange, Cédrine, Alwyn, Emmanuelle, Benjamin, Pierre-Yves, Saddredine, le Club des Docs, ainsi que les stagiaires de passage que je ne citerai pas pour éviter d'en oublier.

Si j'ai pu faire cette thèse, c'est aussi grâce à mes amis et aux activités extérieures qui ont été là pour me changer les idées. Un grand merci à : l'IFD pour m'avoir aidée à voir clair en moi-même, ce qui va maintenant me permettre d'arpenter une route qui me ressemble ; à l'association Doc'Up et à tous ses membres actifs grâce à qui j'ai pu ouvrir les yeux sur ce que pouvait être la vie en dehors d'une thèse, et ce que j'ai appris en valait la peine.

Les mots me manquent pour remercier ma famille. Cette thèse, aboutissement de longues années d'études, je la dois beaucoup à mes parents et à mon frère, avec qui j'ai vécu dans un climat toujours serein, à l'abri de tout souci affectif ; ce manuscrit leur est dédié. Je finirai par Noël qui a su m'encourager et me soutenir durant ces années. Voici maintenant le résultat :

« Omnis cellula e cellula »

Rudolf Virchow (1821 - 1902)

Sommaire

INTRODUCTION

Préambule	1
Chapitre I - Mise en évidence des cellules souches hématopoïétiques.....	5
1.1 - Historique de la notion de CSH	5
1.2 - Tests <i>in vitro</i>	7
1.2.1 - Test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay.....	7
1.2.2 - Les systèmes de cocultures	10
1.3 - Tests <i>in vivo</i>	14
1.3.1 - Reconstitution hématopoïétique non compétitive.....	15
1.3.2 - Reconstitution hématopoïétique compétitive.....	16
1.3.3 - Reconstitutions hématopoïétiques pour des populations humaines.....	18
1.4 - Synthèse	18
Chapitre II - L'ontogenèse de l'hématopoïèse chez les mammifères	21
2.1 - Le sac vitellin	22
2.1.1 - Émergence des premières cellules hématopoïétiques	23
2.1.2 - Participation à l'hématopoïèse définitive	26
2.2 - La région aortique : source principale de CHs/CSHs définitives	29
2.3 - Le foie fœtal	34
2.4 - Le placenta	36
2.4.1 - Formation du placenta	37
2.4.2 - Activité hématopoïétique du placenta.....	40
2.5 - Organes hématopoïétiques définitifs : thymus, rate et moelle osseuse	44
2.6 - La mise en place de l'hématopoïèse humaine	45
Chapitre III - Le déroulement de l'hématopoïèse chez les autres espèces.....	51
3.1 - La drosophile	51
3.1.1 - Les cellules hématopoïétiques	52
3.1.2 - Déroulement de l'hématopoïèse.	54
3.1.3 - Contrôle génétique de l'hématopoïèse.	54

3.2 - Le poisson-zèbre.....	55
3.3 - Le xénope	59
Chapitre IV - Hémangioblaste - Endothélium hématogène - CSH : origines et relations possibles	62
4.1 - L'hémangioblaste	62
4.2 - Origine des CSHs.....	64
4.2.1 - L'endothélium hématogène	64
4.2.2 - Les patches sous-aortiques	66
4.3 - Synthèse	68
Chapitre V - Caractérisation moléculaire et phénotypique des cellules souches hématopoïétiques ..	70
5.1 - Les principaux facteurs régulateurs de l'hématopoïèse	70
5.2 - Les principaux marqueurs des CSHs.....	79
5.3 - Les populations enrichies en CSHs chez la souris.....	85
Chapitre VI - Importance de la niche hématopoïétique.....	89
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	97
MATÉRIELS ET MÉTHODES	99
Partie I - Obtention des tissus	99
1.1 - Accouplements contrôlés.....	99
1.2 - Dissection	99
Partie II - Marquages sur coupes.....	101
2.1 - Congélation des tissus	101
2.2 - Coupes au cryostat	101
2.3 - Coloration lacZ.....	101
Partie III - Marquages pour cytométrie en flux	103
3.1 - Préparation des suspensions cellulaires	103
3.2 - Marquage FDG	103

3.3 - Immunomarquages	104
Partie IV - Mise en évidence de la présence de cellules souches hématopoïétiques	106
4.1 - <i>In vitro</i> : cultures LTC-IC	106
4.1.1 - Préparation du stroma de cellules MS5	106
4.1.2 - Ensemencement des populations	106
4.1.3 - Entretien des cultures et calcul de fréquence.....	107
4.2 - <i>In vitro</i> : cultures sur cellules AFT024.....	107
4.3 - <i>In vivo</i> : reconstitution hématopoïétique à long terme	107

RÉSULTATS

109

Partie I - Caractérisation des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris.....	109
1.1 - Étude cinétique d'apparition des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ dans le SV et le PI par cytométrie en flux	110
1.2 - Relations des populations les unes par rapport aux autres au cours du développement du SV et du PI.....	118
1.3 - Étude du potentiel hématopoïétique <i>in vitro</i> des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ dans le SV et le PI au cours du développement embryonnaire.....	122
1.4 - Placenta et foie fœtal, deux organes d'amplification avec des rôles différents ?	130
1.5 - Conclusion et perspectives.....	135
Partie II - Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques	137
2.1 - Modèle de souris VECR : Étude de l'origine endothéliale ou non de la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du placenta.....	137
2.1.1 - Introduction.....	137
2.1.2 - Étude topographique après coloration lacZ.....	138
2.1.3 - Origine des CHs (CD45 ⁺) et de la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du placenta	141
2.1.4 - Comparaison des propriétés fonctionnelles des fractions FDG ⁺ et FDG ⁻ de la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du placenta	143
2.1.5 - Conclusion et perspectives.....	143
2.2 - Propriétés de la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du placenta Mpl ^{-/-}	146

2.2.1 - Introduction.....	146
2.2.2 - Étude cinétique d'apparition des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ dans le placenta de souris Mpl ^{-/-} par cytométrie en flux.....	146
2.2.3 - Comparaison du potentiel hématopoïétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} issues de placentas de souris Mpl ^{-/-} et C57Bl6.....	152
2.3 - Conclusion et perspectives.....	152

DISCUSSION

154

BIBLIOGRAPHIE

164

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique des constituants cellulaires du sang	1
Figure 2 : Division asymétrique des cellules souches.....	3
Figure 3 : Représentation schématique de la hiérarchie des cellules hématopoïétiques	4
Figure 4 : Ernst Neumann illustrant sa "cellule souche", 1914	5
Figure 5 : Test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay.....	8
Figure 6 : Illustration d'une coculture de cellules hématopoïétiques murines sur un tapis de cellules stromales MS5.....	11
Figure 7 : Test LTC-IC ou Long-term Culture Initiating Cell assay.....	12
Figure 8 : Test de reconstitution hématopoïétique	16
Figure 9 : Parallèle entre les tests utilisés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pour la mise en évidence des différents compartiments de cellules hématopoïétiques.....	19
Figure 10 : Mise en place du système hématopoïétique dans l'embryon de souris.....	22
Figure 11 : Développement des îlots sanguins du sac vitellin de souris entre E7.5 et E9.5.....	23
Figure 12 : Trois différents modèles représentatifs des îlots sanguins du sac vitellin	24
Figure 13 : La région Aorte-Gonades-Mesonephros ou AGM à E10.5	30
Figure 14 : Les clusters hématopoïétiques du plancher de l'aorte chez différentes espèces	32
Figure 15 : Morphologie des cellules des clusters chez l'oiseau	33
Figure 16 : Représentation schématique d'un îlot érythroblastique de foie fœtal E13.5.....	35
Figure 17 : Les différentes parties du placenta	37
Figure 18 : Formation du placenta chez la souris.....	38
Figure 19 : Coupe d'embryon relié à son placenta à E12.5.....	40
Figure 20 : Évolution cinétique de la quantité de précurseurs hématopoïétiques et de CSHs au cours du développement embryonnaire	42
Figure 21: Mise en place du système hématopoïétique dans l'embryon humain	46
Figure 22 : Les hémocytes au cours du développement de la drosophile	52
Figure 23 : Contrôle génétique de l'hématopoïèse chez la drosophile.....	55
Figure 24 : Mise en place du système hématopoïétique chez le poisson-zèbre.....	56

Figure 25 : Ontogenèse des différentes régions participant à la mise en place de l'hématopoïèse chez le xénope	60
Figure 26 : Sac vitellin - lien direct entre l'endothélium hématogène et l'hémangioblaste	69
Figure 27 : Trois théories sur l'émergence des CSHs dans le plancher de l'aorte ; phénotypes principaux associés à E11.5	69
Figure 28 : Les principaux facteurs de transcription régulant l'hématopoïèse et leur hiérarchie d'expression	71
Figure 29 : Les principaux marqueurs de surface associés aux CSHs au cours de leur maturation	79
Figure 30 : Mécanismes possibles par lesquels les cellules endostéales contribuent au maintien des CSHs	95
Figure 31 : La niche périvasculaire de la moelle osseuse	96
Figure 32: Étapes de dissection du placenta et du sac vitellin	100
Figure 33 : Évolution de la cellularité du sac vitellin C57Bl6 entre E10.5 et E12.5	111
Figure 34 : Étude cinétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ au cours du développement du sac vitellin de souris C57Bl6 (E10.5 à E12.5)	112
Figure 35 : Étude cinétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ au cours du développement du sac vitellin de souris C57Bl6 (E10.5 à E12.5)	113
Figure 36 : Évolution de la cellularité du placenta C57Bl6 entre E10.5 et E14.5	115
Figure 37 : Étude cinétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ au cours du développement du placenta de souris C57Bl6 (E10.5 à E14.5)	116
Figure 38 : Étude cinétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ du PI (E10.5 à E14.5)	117
Figure 39 : Pourcentages d'imbrications des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ (SA) dans le SV C57Bl6	119
Figure 40 : (A) Pourcentages d'imbrications des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ (SA) dans le PI C57Bl6	120
Figure 41 : Étude de la fraction hématopoïétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺	121
Figure 42 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ de la région AGM entre E10.5 et E12.5	123
Figure 43 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ du SV entre E10.5 et E12.5	125
Figure 44 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ du PI entre E10.5 et E14.5	126

Figure 45 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ du FF entre E10.5 et E14.5.....	128
Figure 46 : Populations les plus enrichies en LTC-IC dans les différents sites et organes hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire de la souris.....	129
Figure 47 : Relations entre les populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ (SA) du PI et du FF à E12.5 .	131
Figure 48 : Augmentation de l'expression du marqueur Sca.1 dans la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du PI entre E11.5 et E12.5	133
Figure 49 : Évolution de la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} issue de PI E11.5 après ensemencement sur cellules AFT024.....	134
Figure 50 : La souris double transgénique VECR	139
Figure 51 : Coloration lacZ à différents stades du développement	140
Figure 52 : Étude de l'origine des CHs et CSHs du PI entre E11.5 et E14.5	142
Figure 53 : Étude de l'origine des LTC-IC contenues dans la population CD34 ⁺ ckit ^{hi} du PI E11.5	145
Figure 54 : Comparaison des cellularités des PI des souris C57Bl6 et Mpl ^{-/-} entre E10.5 et E12.5	148
Figure 55 : Étude cinétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ au cours du développement du placenta de souris Mpl ^{-/-} (E11.5 à E12.5).....	149
Figure 56 : Comparaison des pourcentages des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ (SA) dans les placentas C57Bl6 et Mpl ^{-/-} à E11.5 et à E12.5	150
Figure 57 : Pourcentages d'imbrication des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} , CD144 ⁺ CD45 ⁺ et Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ (SA) dans les PI C57Bl6 et Mpl ^{-/-} à E12.5	151
Figure 58 : Nombres de LTC-IC et de LT-CSHs entre E11.5 et E14.5	162
Figure 59 : Schéma proposé des phénotypes et sens de migration des CSHs entre E10.5 et E14.5 ..	163
Tableaux 1 et 2 : Nombre de LT-CSHs par organe entre E10.5 et E13.5 obtenus après reconstitution hématopoïétique compétitive.....	42
Tableau 3 : Les différentes populations enrichies en CSHs.....	86
Tableau 4 : Nombres de LTC-IC et de LT-CSHs par organe entre E11.5 et E14.5.....	129
Tableaux 5 et 6 : Comparaison du potentiel hématopoïétique des populations CD34 ⁺ ckit ^{hi} issues de PI C57Bl6 et Mpl ^{-/-} à E11.5 et E12.5.....	152

ABRÉVIATIONS

5-FU : 5-FluoroUracile	-G : -Granulocytaire
7-AAD : 7-Amino-Actinomycine D	-GEMM : -
α MEM : α -Modified Eagle Medium	Granulo/Érythro/Macro/Mégacaryocytaire
β gal : β -galactosidase	-GM : -Granulo/Macrophagique
β me : β -mercaptoéthanol	-M : -Mégacaryocytaire
Ac : Anticorps	CFU-S : CFU in the Spleen
ACE : Angiotensine Converting Enzyme	CH : Cellule Hématopoïétique
AF : Alexa Fluor	CHT : Caudal Hematopoietic Tissu
AGM : Aorte-Gonades-Mesonephros	CLP : Common Lymphoid Progenitor
ALM : Anterior Lateral Mesoderm	CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
AML1 : Acute Myeloid Leukemia 1	CMP : Common Myeloid Progenitor
APC : Allophycocyanine	CRU : Competitive Repopulating Unit
APC-Cy7 : Allophycocyanine-Cyanine 7	CS : Cellule Souche
ARN : Acide RiboNucléique	CSF : Colony Stimulating Factor
ARNm : ARN messenger	CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
aVBI : VBI antérieur	CSM : Cellule Souche Mésenchymateuse
BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid	DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor	Dcg1 : Drosophila Collagen Gene 1
BL-CFC : BLast-CFC	dlk/pref-1 : delta-like/preadipocyte factor-1
BMP : Bone Morphogenetic Protein	DLP : Dorsal Lateral Plate
BSA : Sérum Albumine Bovine	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
BSAP : B cell Specific Activator Protein	DMSO : DiMethyl SulfOxide
CA-FC : Cobblestone Area-Forming Cell	DMZ : Zone Marginale Dorsale
CaR : Calcium-Sensing Receptor	DNase I : DésoxyriboNucléase I
CAR cell : CXCL12-Abundant Reticular cell	EBF : Early B-cell Factor
Cbf : Core Binding Factor	EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique
CD : Cluster of Differentiation	EPO : Érythropoïétine
CE : Cellule Endothéliale	EryP-CFC : Précurseur ÉRYthroïde Primitif-CFC
CFC : Colony Forming Cell	ES : cellule Souche Embryonnaire
CFU : Colony Forming Unit	EtOh : Éthanol
-E : -Érythroïde	Evi-1 : Ecotropic Viral Integration site-1

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting	MO : Moelle Osseuse
FDG : Fluorescéine Di-β-D-Galactopyranoside	Mpl : MyeloProliferative Leukemia
FF : Foie Foetal	MPP : MultiPotent Progenitor
FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate	MS5 : Murine Stromal Cells
Flk1 : Fetal Liver Kinase 1	Ncx : Na/Ca eXchanger
Flt3L : Fms-Like Tyrosine kinase receptor 3	NK : Natural Killer
Ligand	NOD-SCID : Non Obese Diabetic-SCID
FOG : Friend Of Gata	OP9-DL1 : OP9 Delta-Like-1
FTOC : Fetal Thymic Organ Culture	OSMR : Récepteur à l'Oncostatine M
Gcm : Glial Cell Missing	P/S : Pénicilline/Streptomycine
glut : glutamine	p6 : plaque 6 puits
GR : Globule Rouge	p96 : plaque 96 puits
GMP : Granulocyte/Monocyte Progenitor	p-Sp : SplanchnoPleure Para-aortique
Gy : Gray	PB : Pacific Blue
Hb : Hémoglobine	PBD : Paired Box Domain
HLA : Human Leukocyte Antigen	PBS : Phosphate Buffer Saline
Hox : HOmeoboX gene	PDGF : Platelet Derived Growth Factor
HPP-CFC : High Proliferative Potential- CFC	PE : PhycoÉrythrine
ICM : Intermediate Cell Mass	PEBP2αB : PhosphatidylÉthanolamine-Binding Protein 2αB
Igf2 : Insuline-like Growth Factor 2	PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
IL : InterLeukine	PBI : Posterior Blood Island
IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium	PE-Cy7 : Phycoérythrine-Cyanine 7
IP : Iodure de Propidium	PI : Placenta
KDR : Kinase Domaine insert Receptor	PIGF : Placenta Growth Factor
LIF : Leukemia Inhibitory Factor	PLM : Posterior Lateral Mesoderm
Lin : Lineage	PPO : Prophénoloxidase
LTC-IC : Long Term Culture-Initiating Cell	Ptpcr : Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type C
LTRC : Long Term Repopulating Cell, ou LT-CSH	pVBI : VBI postérieur
LTRA : Long Term Repopulating Ability	Rh123 : Rhodamine 123
Lz : Lozenge	RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
M-CSF : Macrophage-CSF	RU : Repopulating Unit
Meis1 : Myéloïd Ecotropic viral Integration Site 1	
MEP : Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor	

Runx1 : Runt related transcription factor 1

SA : Streptavidine

SAP : Patche Sous-Aortique

Sca-1 : Stem Cell Antigen-1

Scf : Stem Cell Factor

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

Scl : Stem Cell Leukemia

SDF-1 : Stromal Cell Derived Factor-1

SG : Semaine de Gestation

SLAM : Signaling Lymphocytic Activation

Molecule

Srp : Serpent

STRC : Short Term Repopulating Cell, ou ST-

CSH

SV : Sac Vitellin

SVF : Sérum de Veau Foetal

Tal1 : T-cell acute lymphocytic leukemia

TALE : Three Amino acid Loop Extension

Thy-1 : Thymus cell antigen-1

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TPO : ThromboPOïétine

TGF β : Transforming Growth Factor β

Ush : U-Shaped

VBI : Ventral Blood Island

VeCad : Vascular Endothelial-Cadherin

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VMZ : Zone Marginale Ventrale

Xaml : Xenopus Acute Myeloid Leukemia

Xgal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Introduction

PRÉAMBULE

Système sanguin et placenta

Le sang est un tissu mésenchymateux dont la matrice extra-cellulaire (plasma) est liquide, ce qui lui permet de circuler continuellement dans tous les vaisseaux du corps afin de transporter le dioxygène et les éléments nutritifs nécessaires aux processus vitaux, et simultanément de drainer les déchets produits (CO_2 , déchets azotés) vers les organes d'évacuation (reins, poumons, foie, intestin). Il permet également la diffusion des hormones, des cellules et molécules du système immunitaire à travers l'organisme. Le sang est composé d'éléments cellulaires (45%) et de plasma (55%), et représente environ 8% du poids corporel total. Les cellules sanguines, dites Cellules Hématopoïétiques (CHs), sont générées au cours d'un processus appelé hématopoïèse et possèdent, selon leur type, des fonctions particulières. Les globules rouges (ou érythrocytes) assurent le transport de l'oxygène, les globules blancs (ou leucocytes) participent aux réactions de défense immunitaire, et les plaquettes (ou thrombocytes) jouent un rôle important au niveau de la coagulation sanguine (Figure 1).

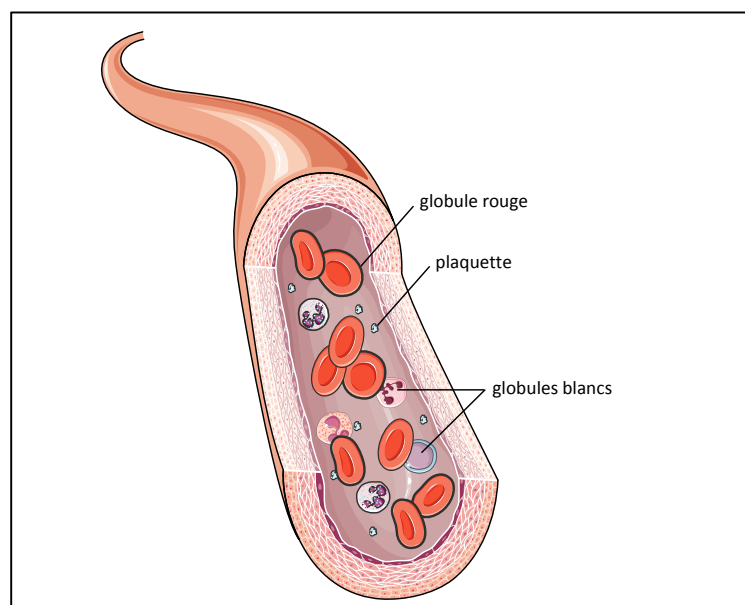


Figure 1 : Représentation schématique des constituants cellulaires du sang

Adaptée d'après ressources internet Servier Medical Art.

Au cours de l'embryogenèse, les CHs sont primordiales dans le développement de l'embryon, notamment lors de la formation et du développement du placenta (PI), organe extra-embryonnaire extrêmement vascularisé indispensable aux échanges materno-fœtaux. Le PI tout juste formé est sujet à une activité importante de vasculogenèse et d'angiogenèse, nécessitant le recrutement d'un nombre très important de CHs. La durée de vie de ces cellules est extrêmement variable : 3 jours à plusieurs années pour certains globules blancs, 8 à 10 jours pour les plaquettes et 120 jours pour les globules rouges. Toutefois, leur nombre est maintenu constant grâce au processus d'hématopoïèse qui permet la production de CHs de tous les lignages, générant quotidiennement pas moins de 10^{12} CHs chez l'homme adulte (Ogawa, 1993). Ces CHs matures différenciées ne sont pas capables de proliférer et leur production est assurée par des cellules plus primitives nommées Cellules Souches Hématopoïétiques (CSHs).

Cellules souches et CSHs

Autorenouvellement et multipotence

Les Cellules Souches (CSs) apparaissent au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte, elles sont spécifiques d'un tissu particulier (CSs de la peau, de l'intestin, du sang,...). En tant que cellules indifférenciées, elles sont multipotentes et peuvent se diviser pour produire l'ensemble des cellules matures différenciées du tissu qui leur correspond. La plupart des divisions cellulaires sont symétriques, puisque la cellule mère produit deux cellules filles identiques à elle-même, conduisant à une augmentation du nombre de cellules. Toutefois, le nombre de CSs adultes d'un tissu donné reste constant du fait que ces cellules peuvent s'autorenouveler par le jeu d'une balance entre divisions symétriques et asymétriques (*Figure 2*). Dans la plupart des tissus, les CSs sont rares et chacune d'entre elles est «nichée» dans un microenvironnement particulier lui permettant de conserver ces deux propriétés principales qui sont l'autorenouvellement et la multipotence. Comme toute CS, la CSH possède ces deux propriétés et est capable de se différencier pour générer l'ensemble des cellules appartenant aux différents lignages sanguins (lymphoïde, myéloïde, mégacaryocytaire et érythroïde).

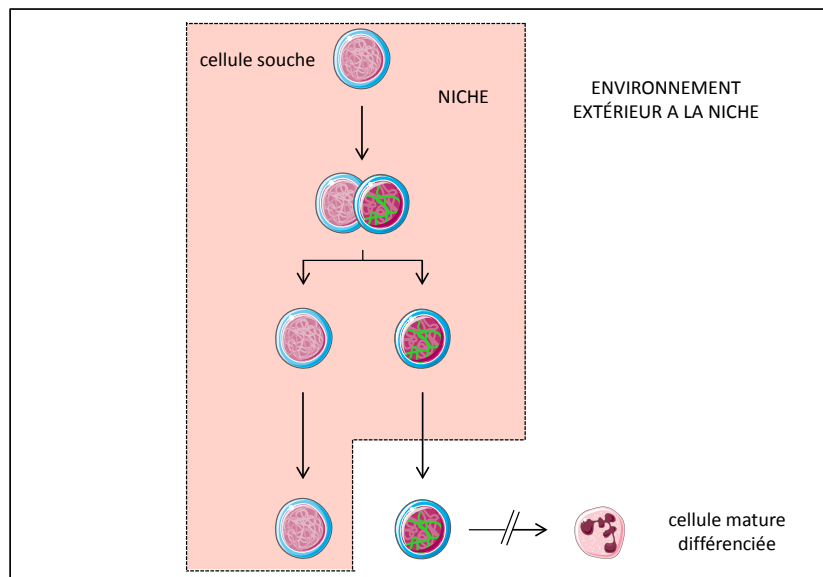


Figure 2 : Division asymétrique des cellules souches

Après la division, une des deux cellules filles reste dans le microenvironnement de la niche, préservant ainsi son potentiel d'autorenouvellement, tandis que la deuxième cellule fille quitte cette niche et rentre dans son processus de division et de différenciation (schéma adapté d'après ressources internet Servier Medical Art).

Les CHs sont organisées en différents compartiments selon une hiérarchie pyramidale, partant de la CSH et aboutissant à l'ensemble des cellules matures différenciées du sang, en passant par des progéniteurs et des précurseurs hématopoïétiques (Figure 3). Le descendant direct de la CSH est le MultiPotent Progenitor (MPP) ou progéniteur multipotent, encore capable de générer l'ensemble des cellules du sang mais qui ne peut déjà plus s'autorenouveler (Adolfsson et al., 2001). Les MPP peuvent produire deux types de progéniteurs : le Common Myeloid Progenitor (CMP) (Akashi et al., 2000; Manz et al., 2002) et le Common Lymphoid Progenitor (CLP) (Kondo et al., 1997; Hao et al., 2001). Les CMP donnent naissance à des progéniteurs engagés soit dans les lignées érythroïde et mégacaryocytaire (Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor ou MEP), soit dans les lignées granulocytaire et macrophagique (Granulocyte/Monocyte Progenitor ou GMP). Les CLP donnent naissance aux lymphocytes B et T ainsi qu'aux cellules Natural Killer (NK). Quant aux cellules dendritiques, il a été montré d'après leurs phénotypes qu'elles pouvaient dériver des CMP aussi bien que des CLP (Traver et al., 2000; Manz et al., 2001a; Manz et al., 2001b). Chez l'embryon comme chez l'adulte, les CSHs sont donc les seules CHs capables d'autorenouvellement. Cependant, contrairement aux CSHs embryonnaires, les CSHs adultes ont un faible pouvoir prolifératif (Abkowitz

et al., 2002; Gordon et al., 2002), et le maintien des cellules sanguines matures est assuré essentiellement par les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques. Une étude récente indique que les CSHs adultes sont de deux types : le premier pour lequel la balance entre différenciation lymphoïde et myéloïde est à l'équilibre, l'autre pour lequel la différenciation est en faveur des lignages myéloïdes (Benz et al., 2012).

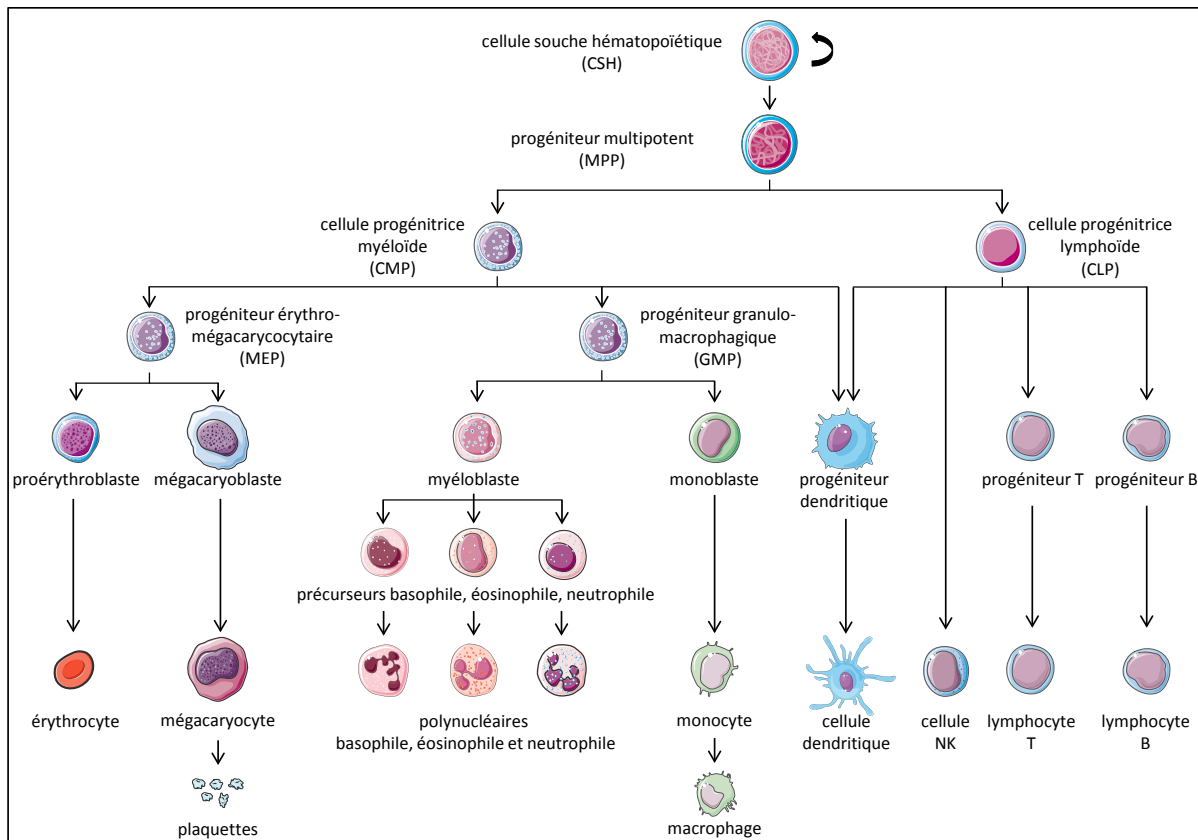


Figure 3 : Représentation schématique de la hiérarchie des cellules hématopoïétiques

NK : natural killer (schéma adapté d'après ressources internet Servier Medical Art).

CHAPITRE I - MISE EN ÉVIDENCE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

1.1 - Historique de la notion de CSH

Le début des recherches concernant les CSHs adultes remonte au XIX^{ème} siècle au cours duquel Franz Ernst Christian Neumann (1834-1918) fut le premier à postuler que la Moelle Osseuse (MO) constituait l'organe de formation des cellules différenciées du sang après la naissance, et qu'elle contenait des cellules particulières capables de donner naissance à l'ensemble des cellules sanguines (Figure 4).

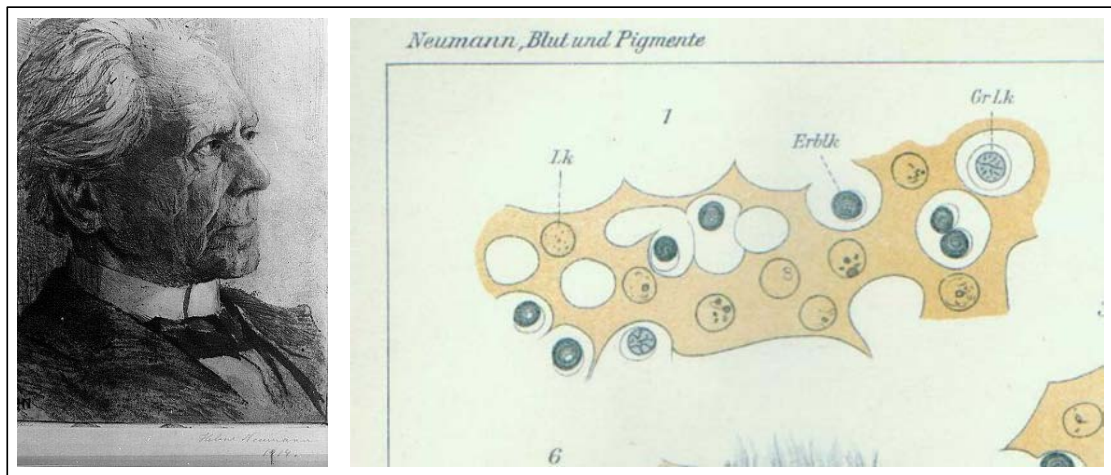


Figure 4 : Ernst Neumann illustrant sa "cellule souche", 1914

La "cellule souche super lymphocyte" (1912) ou super lymphocyte capable d'érythropoïèse et de lymphopoïèse dans la moelle osseuse adulte et ici, dans le foie fœtal. GrLk : noyau du super lymphocyte ; ErbLk : érythroblaste.

Le scientifique russe Alexander A. Maximow (1874-1928) développa par la suite cette théorie en indiquant que ces cellules sont situées dans un microenvironnement particulier de la MO appelé "niche". Le taux massif de mortalité dû aux aplasies médullaires causées par l'irradiation des bombes d'Hiroshima et Nagasaki n'ont fait que confirmer cette hypothèse. Quelques décennies plus tard, les travaux de Jacobson et ceux de Lorenz ont montré que des cellules adultes murines contenues dans la rate et la MO sont capables de reconstituer le système hématopoïétique de souris létalement irradiées, preuve de l'existence de cellules à l'origine du système sanguin (Jacobson et al., 1951; Lorenz et al., 1951). C'est en 1961 avec les travaux de Till et McCulloch qu'apparaît le concept de

CFU-S (Colony Forming Unit in the Spleen), cellule capable de donner naissance à la fois à des cellules granulocytaires myéloïdes et à des cellules érythroïdes. La MO d'une souris adulte contient de telles cellules qui, 8 jours après avoir été injectées dans des souris létalement irradiées, peuvent générer des nodules dans la rate des souris greffées. Après analyse, ces nodules se révèlent être constitués de colonies de CHs en intense prolifération (Till and McCulloch, 1961). Les nodules analysés 8 jours après l'injection contiennent principalement des CHs unipotentes engagées dans les voies de différenciation érythroblastique, macrophagique ou granuleuse, alors que ceux analysés 12 jours après l'injection contiennent des CHs moins engagées dans leur processus de différenciation. Il est donc important de noter que les CFU-S à l'origine de ces deux types de nodules (CFU-S J8 et CFU-S J12) n'ont pas le même degré d'immatrité, créant ainsi une certaine hiérarchie au sein des CFU-S. Une fois injectées dans une deuxième souris létalement irradiée, seules les CFU-S J12 sont capables de générer à nouveau des nodules dans la rate de la souris greffée, démontrant leur potentiel d'autorenouvellement et confirmant leur caractère plus immature que les CFU-S J8 (Charbord, 1994). Toutefois, plusieurs travaux ont montré que ces CFU-S ne sont pas capables de maintenir l'hématopoïèse à long terme et sont donc moins immatures que les CSHs (Hodgson and Bradley, 1979; Bertoncello et al., 1988; Jones et al., 1989; Jones et al., 1990). Ploemacher et Brons introduisent en 1988 la notion de pré-CFU-S, permettant ainsi d'aller plus loin dans la caractérisation des CFU-S (Ploemacher and Brons, 1988). Treize jours après l'injection primaire, les cellules de la MO des souris greffées sont récupérées et injectées dans une nouvelle souris létalement irradiée. Douze jours après l'injection secondaire, des CFU-S sont mises en évidence dans la rate des souris greffées. Les cellules à l'origine de ces CFU-S J12 secondaires, nommées pré-CFU-S, ont donc été capables de migrer dans la MO de la première souris et sont plus immatures que les CFU-S J12 primaires. Les pré-CFU-S ont été comparées aux LT-CSHs (LT pour Long Term, voir §1.3) en tant que cellules capables de reconstituer à long terme le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée. Aujourd'hui, le test CFU-S reste classiquement utilisé pour évaluer le potentiel hématopoïétique de certaines populations de cellules embryonnaires ou adultes *in vivo*. De façon générale, il n'a pas été possible de mettre en évidence de CFU-S au sein d'une population de cellules humaines. Seuls les travaux de Rezzoug et al. ont pu montrer que des cellules de Foie Fœtal (FF) humain peuvent générer des nodules dans la rate de souris létalement irradiées, indiquant que les CHs humaines sont capables de migrer, proliférer et se différencier dans un microenvironnement murin (Rezzoug et al., 1997).

Les CSHs adultes sont localisées dans la MO et pourtant, elles ne sont pas produites par cet organe et apparaissent au cours de la vie embryonnaire. La principale différence entre les CSHs embryonnaires et les CSHs adultes réside dans le fait que les CSHs embryonnaires sont en active prolifération alors

que les CSHs adultes sont à l'état quiescent et par conséquent, capables uniquement de maintenir leur nombre et de renouveler les cellules sanguines circulantes. Bien que la présence de CSHs embryonnaires n'ait pas été démontrée dans l'embryon très précoce, l'étude des CHs embryonnaires remonte à la fin du XX^{ème} siècle avec les travaux de Peter Hollands et al. qui montrèrent que des cellules d'embryons de souris très précoces (6-7 jours de développement embryonnaire, E6-E7) sont capables de reconstituer à court terme le système sanguin de souris létalement irradiées, preuve de l'existence de CHs immatures dans l'embryon avant la mise en place de la circulation sanguine (E8.5) (Hollands, 1987; Hollands, 1988).

Chez l'embryon comme chez l'adulte, les CSHs sont très rares et très difficiles à caractériser, ce qui limite considérablement leur étude d'un point de vue fondamental et leur utilisation d'un point de vue clinique. A l'heure actuelle, il est en effet impossible d'isoler une population pure de CSHs étant donné qu'aucun marqueur spécifique de ces cellules n'a encore été mis en évidence. Grâce à des combinaisons de différents marqueurs membranaires ou intracellulaires, certaines populations de cellules plus ou moins enrichies en CSHs peuvent toutefois être isolées, et leurs potentiels hématopoïétiques respectifs peuvent être évalués rétrospectivement grâce à des tests *in vitro* et *in vivo*.

1.2 - Tests *in vitro*

1.2.1 - Test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay

Le test clonogénique est un test utilisé *in vitro* chez la souris comme chez l'homme pour mettre en évidence des précurseurs/progéniteurs hématopoïétiques au sein d'une population donnée, embryonnaire ou adulte. Les différentes colonies hématopoïétiques observables via ce test sont caractéristiques pour chacune d'entre elles d'un progéniteur/précurseur hématopoïétique donné. Les CHs plus immatures éventuellement contenues dans la population d'étude ne peuvent pas être détectées.

A l'origine, il avait été montré que des cellules de MO de souris cultivées dans un milieu semi-solide d'agar étaient capables de former des petites colonies, allant de une à seize cellules (Metcalf, 1970). Cette étude a également montré que l'addition dans l'agar de facteurs non recombinants nommés Colony Stimulating Factors (CSF) stimule la croissance des colonies. Ces CSF sont principalement issus d'urine humaine (Stanley and Metcalf, 1969) ou de milieu conditionné de culture (Bradley and Sumner, 1968). Les deux premiers jours de culture, ces colonies contiennent uniquement des granulocytes mais par la suite, des macrophages apparaissent. Peu après, la prolifération cesse et les

colonies disparaissent. Dix ans plus tard, Johnson et Metcalf réalisent des cultures similaires à partir de cellules embryonnaires et adultes murines cultivées dans de l'agar additionné de CSF issus de milieu conditionné de rates stimulées par un mitogène "pokeweed" durant 7 jours (Johnson and Metcalf, 1977; Metcalf et al., 1979). Ces cultures ont permis la mise en évidence de colonies mixtes à composante érythroïde, granulocytaire, macrophagique et mégacaryocytaire, et le caractère clonal de ces colonies a été établi. Aujourd'hui, ce test a été modifié et consiste à cultiver la population d'étude dans un milieu semi-solide de méthylcellulose (à la place de l'agar) complémenté avec des cytokines recombinantes (Figure 5).

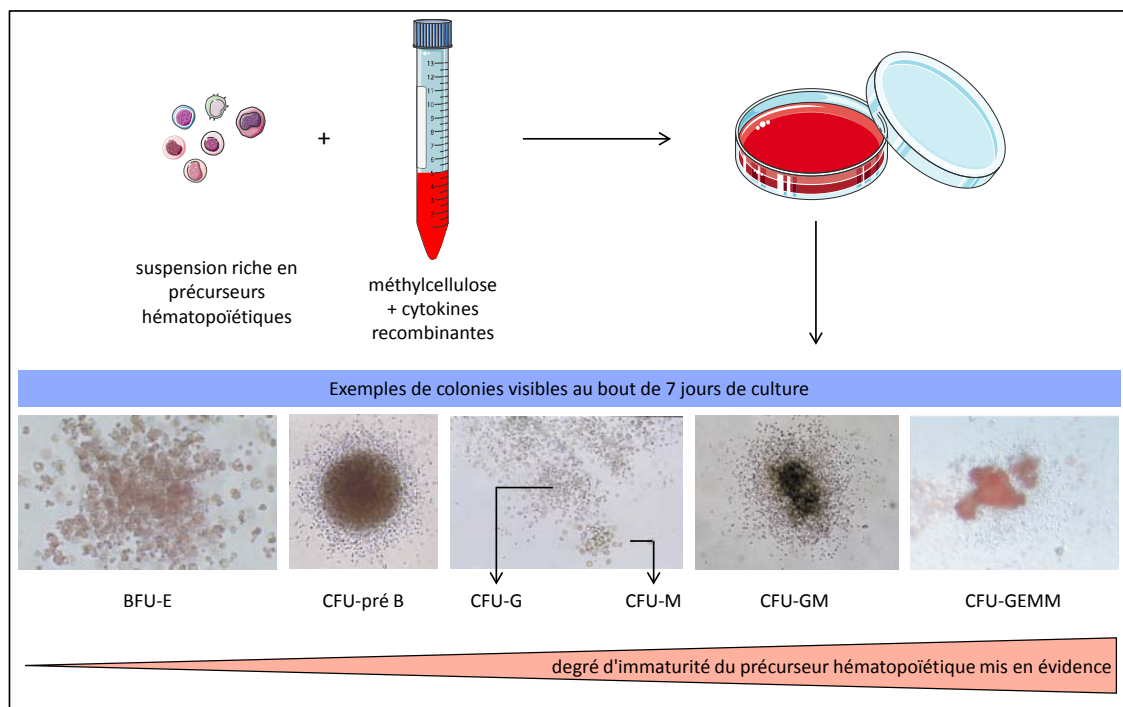


Figure 5 : Test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay

Abréviations utilisées : CFU Colony-Forming Unit, BFU Burst-Forming Unit, -E Érythroïde, -G Granulocyte, -M Monocyte/Macrophage, -GM Granulocyte/Macrophage, -GEMM Granulocyte/Érythroïde/Macrophage/Mégacaryocyte, -pré B pré-lymphocyte B.

Les cytokines recombinantes de base utilisées pour la souris sont les Interleukines (IL)-3, -6, le Stem Cell Factor (Scf - utilisé dans le cas de cellules embryonnaires), l'Érythropoïétine (EPO) et l'insuline. Selon la question biologique posée et le type de colonies souhaité, d'autres cytokines recombinantes peuvent être ajoutées telles que les IL-2,-4, -7, -11, la Thrombopoïétine (TPO), le Fms-Like Tyrosine kinase receptor 3 Ligand (Flt3L), le Granulocyte-CSF (G-CSF), le Granulocyte/Macrophage-CSF (GM-CSF), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF α). Pour les cellules ES humaines, le Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) peut également être utilisé pour promouvoir la

différenciation de ces cellules vers le lignage hématopoïétique. Au bout de 7 jours de culture pour la souris et 14 jours pour l'homme, il est possible de visualiser des colonies hématopoïétiques distinctes issues de cellules clonogéniques myéloïdes (ou Colony Forming Cell CFC) restreintes à un seul lignage hématopoïétique : la BFU-E ou Burst Forming Unit-Erythroid (plus grosse en taille et plus immature que la CFU-E, ou Colony Forming Unit-Erythroid, qui n'est visible qu'entre le deuxième et le troisième jour de culture), la CFU-Mk pour Mégacaryocyte, la CFU-G pour Granulocyte et la CFU-M pour Monocyte/Macrophage. Des colonies issues de cellules clonogéniques myéloïdes bipotentes, telles que la CFU-GM et la BFU-E/Mk, peuvent également être observées. En présence d'une faible concentration d'EPO, seules les CFU-E et CFU-GM peuvent être mises en évidence. La plus immature des CFC observables est la CFU-GEMM, visible à 10 jours de culture et qui contient à la fois les composantes Granulocytaire, Érythrocytaire, Macrophagique et Mégacaryocytaire. Cette colonie est aussi appelée CFU-mixte car elle ne possède pas toujours la composante mégacaryocytaire. Grâce à l'IL-7 additionnée à une méthylcellulose particulière promouvant la lymphopoïèse B, il est possible de mettre en évidence des colonies pré-CFU-B pour lymphocyte B. Les CFC représentatives des lymphocytes T ne sont pas observables dans ce test.

Deux autres types de précurseurs hématopoïétiques différents des CFU et plus immatures que les CFU-GEMM ont été mis en évidence par la suite :

- En 1982, Nakahata et Ogawa montrent qu'à partir de MO ou de rate adultes, il est possible de détecter des colonies différentes de celles précédemment décrites du fait qu'elles ne présentent aucun signe de différenciation terminale (Nakahata and Ogawa, 1982). Ces colonies sont visibles au bout de 16 jours de culture et sont baptisées "colonies souches" puisqu'elles sont capables de donner de nouvelles colonies multipotentes une fois repiquées. Les auteurs montrent également qu'elles contiennent des CFU-S J8, preuve de leur caractère immature.
- Des colonies issues de précurseurs hématopoïétiques nommés High Proliferative Potential-Colony Forming Cells (HPP-CFC) ont également été mises en évidence. Ces colonies sont d'aspect macrophagique mais sont bien plus immatures que les colonies CFU-M (Bradley and Hodgson, 1979). Elles sont caractérisées par leur capacité à générer de grosses colonies qui, au bout de 10-12 jours de culture, contiennent plus de 50.000 cellules de type granulocyte, érythrocyte, mégacaryocyte et macrophage. Initialement établi avec des cellules adultes, ce test est applicable également pour les cellules embryonnaires. Chez la souris, mais aussi chez l'homme, les populations résistantes au 5-FluoroUracile (5-FU - utilisé pour détruire les cellules en cycle) sont enrichies en HPP-CFC, suggérant l'état quiescent de ces cellules *in vivo*. Les HPP-CFC sont capables de produire de nouvelles

colonies une fois repiquées, démontrant leur capacité d'autorenouveau, caractéristique commune aux HPP-CFC et aux CSHs (McNiece et al., 1989; McNiece et al., 1990; Srouf et al., 1993).

Il existe par ailleurs d'autres tests *in vitro* basés sur des systèmes de cocultures qui permettent également de révéler les compartiments de progéniteurs hématopoïétiques immatures mais aussi le compartiment souche. Ces tests sont décrits dans le paragraphe suivant.

1.2.2 - Les systèmes de cocultures

Dans le microenvironnement hématopoïétique *in vivo*, les CSHs sont localisées au contact des cellules stromales, et les interactions engendrées entre ces deux types de cellules sont très importantes pour la régulation des CSHs. Cette hypothèse a été établie en 1977 par les travaux de Dexter et al. qui ont tiré profit de ces interactions pour maintenir en culture à long terme des CHs immatures de MO adulte en les ensemençant sur un tapis de cellules stromales lui-même fraîchement établi à partir de MO adulte (Dexter et al., 1977). Les cultures à long terme de CHs sont en effet incapables de s'établir sans support stromal, montrant la nécessité d'un microenvironnement favorisant la croissance et la différenciation hématopoïétique, notamment grâce à la production de facteurs de croissance hématopoïétique appartenant à la famille des CSF, mais aussi grâce à la présence de protéines d'adhésion. Ce tapis mime donc le microenvironnement naturel et permet aux CHs immatures de venir se nicher. Dans le but de simplifier ces cocultures et de s'affranchir du besoin d'établir un tapis de cellules de MO adulte à chaque expérience, des lignées stromales issues de MO de souris adulte ont été établies et une des premières à l'avoir été, la lignée de cellules stromales Murine Stromal cells 5 (MS5) (Itoh et al., 1989), reste classiquement utilisée aujourd'hui. Toutefois, d'autres lignées issues de cellules murines adultes ont été générées telles que les cellules S-17 (Collins and Dorshkind, 1987) et Sys-1 (Whitlock et al., 1987) issues de MO, les cellules OP9 issues de calvaria de souriceaux nouveaux-nés déficients pour le gène M-CSF ou Macrophage-Colony Stimulating Factor (Nakano et al., 1994), ou encore les cellules SPY3-2 issues de rate (Tsuchiyama et al., 1995). Certaines lignées ont également été établies à partir de cellules embryonnaires issues de la région intra-embryonnaire Aorte-Gonades-Mesonephros (AGM) (Ohneda et al., 1998; Xu et al., 1998; Oostendorp et al., 2002a; Oostendorp et al., 2002b), de FF (cellules AFT024 (Moore et al., 1997a)) ou encore de PI (Wang et al., 2011). Toutes ces lignées ne possèdent pas les mêmes propriétés de soutien de l'hématopoïèse et le choix de leur utilisation est à adapter à la question biologique posée. Plus le temps de la coculture est long, plus le degré d'immaturation des CHs mises en évidence est important.

La CA-FC ou Cobblestone Area-Forming Cell

La lignée de cellules stromales MS5 a été utilisée pour établir le test CA-FC qui permet de détecter au sein d'une population donnée, la présence de CHs plus immatures que celles détectées par le test clonogénique. Il consiste à cocultiver en dilution limite une population enrichie en CHs immatures sur un tapis de cellules stromales pré-établi supportant l'hématopoïèse. Le milieu utilisé promeut la myélopoïèse uniquement et deux types de cellules sont observables : les CHs, cellules rondes bien réfringentes localisées dans le surnageant de culture, et les CA-FC, cellules caractéristiques à structure pavimenteuse nichées sous le tapis stromal (Figure 6).

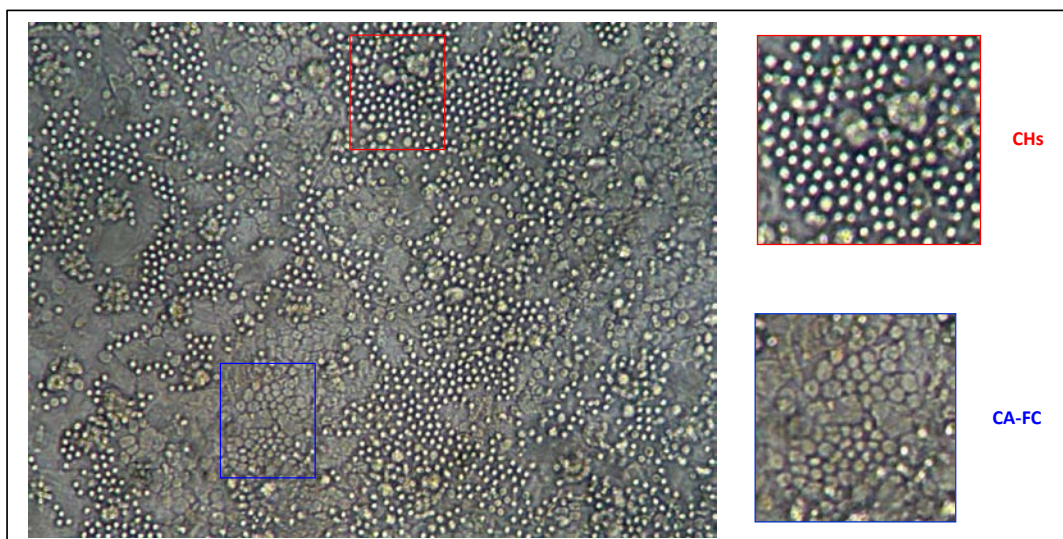


Figure 6 : Illustration d'une coculture de cellules hématopoïétiques murines sur un tapis de cellules stromales MS5

Abréviations utilisées : CA-FC Cobblestone Area-Forming Cell, CHs Cellules Hématopoïétiques.

Lorsque les cocultures concernent des cellules humaines embryonnaires, il est nécessaire de compléter le milieu avec des cytokines recombinantes telles que Scf, Flt3L, IL-2, -3, -7, -15. Tout comme pour les tests clonogéniques, le cocktail de cytokines est différent selon la question biologique posée. Selon la durée de la coculture, l'observation de CA-FC est corrélable à un compartiment donné de CHs : au bout de 7 jours de coculture (J7), la visualisation de CA-FC permet de dire que la population d'étude initiale contenait des progéniteurs hématopoïétiques ; si les CA-FC persistent encore à J28 pour la souris et J35 chez l'homme, la population de départ contenait des CHs plus immatures qui ont été capables de persister plus longtemps *in vitro*. Ce test a également été utilisé pour déterminer la sensibilité des CHs aux radiations (Ploemacher et al., 1992) et aux drogues cytotoxiques (Down and Ploemacher, 1993; Down et al., 1994).

La LTC-IC ou Long-Term Culture-Initiating Cell

Dans la continuité directe de la coculture précédemment décrite, il est possible d'aller plus loin dans la détermination du degré d'immaturation des CHs contenues dans la populationensemencée sur le tapis de cellules stromales. Ainsi, au bout de 28 à 35 jours de culture, les cellules de ce tapis ainsi que celles surnageantes peuvent être récupérées et cultivées en milieu méthylcellulose. Si 7 à 14 jours plus tard, des CFC représentatives de tous les lignages myéloïdes sont observables, il est possible de conclure rétrospectivement que la population d'étudeensemencée initialement contenait des LTC-IC, CHs plus immatures que les CA-FC J28 (Figure 7). A l'origine, les conditions de culture permettant la mise en évidence de LTC-IC au sein d'une population avaient été mises en place pour étudier la différenciation myéloïde des CHs humaines très immatures *in vitro* (Sutherland et al., 1989), mais elles s'avèrent être également pertinentes pour la souris.

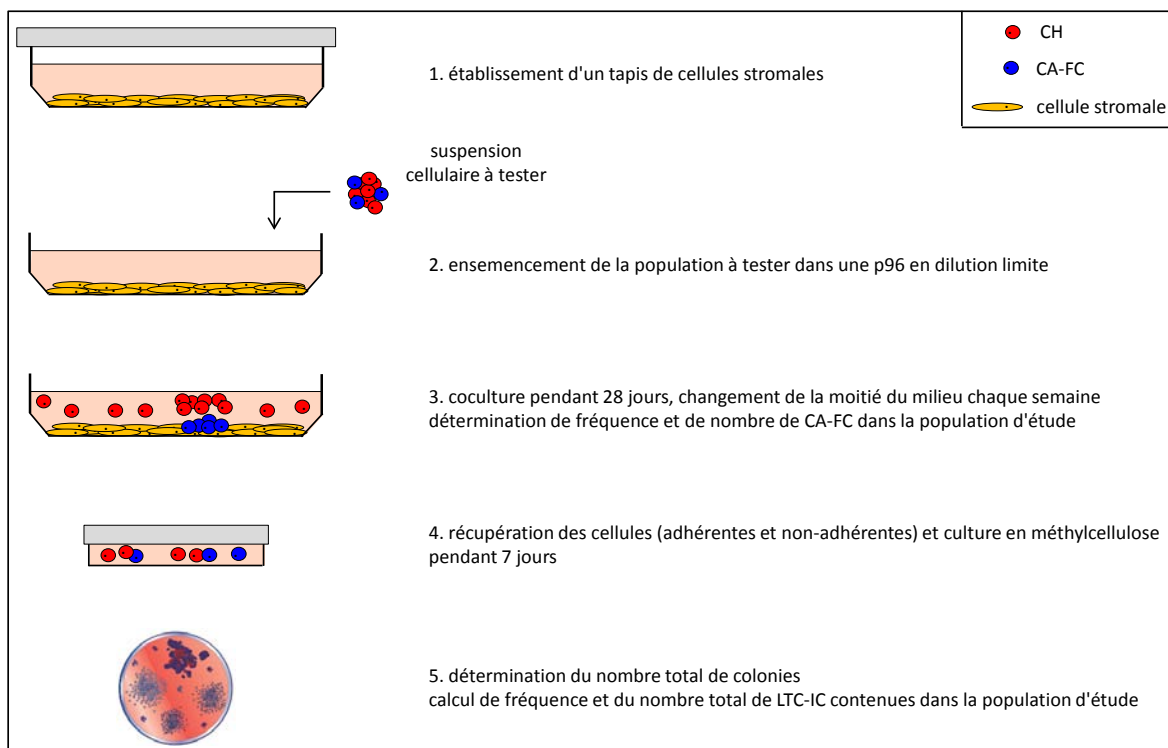


Figure 7 : Test LTC-IC ou Long-term Culture Initiating Cell assay

Abréviations utilisées : CA-FC Cobblestone Area-Forming Cell, CH Cellule Hématopoïétique, p96 plaque 96 puits.

Test de différenciation lymphocytaire B

Chez la souris, le test LTC-IC_{ML} (Myélopoïèse/Lymphopoïèse B), variation du test LTC-IC, permet de mettre en évidence le potentiel de différenciation lymphocytaire B des CHs immatures de la

population d'étude. Au bout des 28 jours du test LTC-IC classique permissif pour la myélopoïèse, la totalité du surnageant de culture est remplacé par un milieu promouvant la lymphopoïèse B (Whitlock and Witte, 1982) et la culture est maintenue durant 7 à 14 jours supplémentaires (Lemieux et al., 1995; Lemieux and Eaves, 1996). Depuis, une variante de ce test LTC-IC_{ML} a été établie et consiste à cocultiver durant 7-14 jours les cellules sur un tapis de cellules stromales, généralement sur des cellules OP9, dans le milieu de Whitlock complémenté avec les cytokines IL-7 et Flt3L (Yoshimoto et al., 2011). Dans les deux cas, les cellules non adhérentes sont récupérées à différents temps de culture et leur phénotype est analysé par cytométrie en flux. Cependant, les conditions de culture ainsi établies ne permettent pas de révéler le potentiel lymphocytaire T de la population d'étude.

Test de différenciation lymphocytaire T

Pendant plusieurs années, le seul moyen de tester le potentiel de différenciation T des CHs immatures de souris résidait dans un système de culture organotypique de thymus foëtaux (Fetal Thymic Organ Culture, FTOC) (Watanabe et al., 1989). Ce test consiste à injecter les CHs dans des lobes thymiques embryonnaires prélevés à E14 et préalablement déplétés de leurs lymphocytes T endogènes par un traitement à la déoxyguanosine. Ce test FTOC est adaptable à l'homme lorsque les lobes thymiques utilisés proviennent de souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) (Plum et al., 2000) ou NOD-SCID (Non Obese Diabetic-SCID) (Robin et al., 1999). Quelques années plus tard la lignée de cellules stromales OP9-DL1 a été établie, permettant d'induire la différenciation lymphocytaire T de cellules de FF murines (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002) et de cellules ES humaines (Schmitt et al., 2004). Ces cellules expriment de façon ectopique Delta-Like-1, le ligand de Notch, et à l'inverse des cellules OP9, elles n'ont plus la possibilité de supporter la lymphopoïèse B mais ont acquis la capacité à supporter la différenciation T.

La ELTC-IC ou Extended Long Term Culture-Initiating Cell

La ELTC-IC est une LTC-IC capable de générer des CFC jusqu'à 60 jours de culture (Hao et al., 1996). Les propriétés de prolifération et de différenciation des ELTC-IC sont donc plus importantes que celles des LTC-IC. A l'heure actuelle, les ELTC-IC sont les CHs les plus immatures détectables *in vitro*, et seraient particulièrement proches des CSHs.

Grâce à la méthylcellulose et aux différentes lignées supportrices de l'hématopoïèse, il est ainsi possible de déterminer le degré d'immaturité de CHs contenues dans une population donnée en testant d'une part leur capacité multilignage (capacité à s'engager à la fois dans les voies de

différenciation myéloïde et lymphoïde), et d'autre part leur propriété d'autorenouveaulement (repiquage des CA-FC J28 pour la souris, des CA-FC J35 pour l'homme, ou encore des ELTC-IC). Les systèmes de coculture actuels permettent de déterminer, à différents moments de la culture, une fréquence de CHs plus ou moins immatures contenues dans une population (Ploemacher et al., 1989; Ploemacher et al., 1991; Ploemacher et al., 1993). En se basant sur les puits négatifs de la coculture, cette fréquence se détermine grâce à la loi statistique de Poisson (Fazekas de St, 1982), loi appliquée dans le programme L-Calc développé par StemCell Technologies Inc.. Selon la durée de la coculture, les lignées stromales utilisées (Weaver et al., 1997; Denning-Kendall et al., 2003) et les cellules accessoires présentes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) (Koller et al., 1998; Mazini et al., 1998), ces fréquences peuvent être différentes.

1.3 - Tests *in vivo*

Il est maintenant communément admis que le seul test prouvant la présence de CSHs dans une population donnée est le test de reconstitution hématopoïétique à long terme qui consiste dans un premier temps à injecter la population d'étude dans le sang d'une souris létalement irradiée. L'irradiation détruit les CHs en cycle, libérant ainsi des espaces vacants dans la MO prêts à accueillir de nouvelles CSHs. Grâce à l'injection en dilution limite de différentes doses de la population à tester, il est possible soit de déterminer un pourcentage de reconstitution hématopoïétique (reconstitution non compétitive) soit de quantifier précisément le nombre de CSHs initialement présent dans l'échantillon (reconstitution compétitive). Les populations à tester sont en général issues d'une souris CD45.2 et sont injectées dans des souris receveuses CD45.1. Ces deux types de souris ont un fond génétique C57Bl6 et possèdent deux allèles différents du gène CD45 (ou Ly5), marqueur hématopoïétique pan-leucocytaire. Ceci permet de discriminer, au moment de l'analyse, les cellules issues de l'organisme donneur des cellules de l'organisme receveur. Deux propriétés de la population étudiée sont ainsi mises en évidence : les cellules injectées doivent permettre à la souris receveuse de survivre à l'irradiation létale tout en étant capable de maintenir une production hématopoïétique permanente par la suite. Deux types de CSHs ont été définis grâce à ce test (Harrison and Zhong, 1992; Morrison and Weissman, 1994; Morrison et al., 1997) :

- la STRC pour short-term repopulating cell (ou ST-CSH), cellule hématopoïétique capable de reconstituer à court terme les compartiments myéloïde et lymphoïde de la souris receveuse. Typiquement, la cellule CFU-S J12 de Till et McCulloch est capable, une fois injectée dans une souris létalement irradiée, de migrer dans la rate et de former des colonies macroscopiques permettant

une reconstitution hématopoïétique à très court terme de la souris (2 à 3 semaines). Ces STRC sont plus immatures que les CFC mais plus matures que les CSHs.

- la LTRC pour long-term repopulating cell (ou LT-CSH) est mise en évidence au bout de vingt semaines après l'injection primaire. Le sang périphérique, la rate, le thymus et la MO de la souris receveuse sont alors récupérés dans le but de tester, par cytométrie en flux, le degré de contribution des LT-CSHs issues de l'injection primaire à la reconstitution du système hématopoïétique de la souris greffée. Par ailleurs, différentes doses de la MO de cette souris sont injectées dans une deuxième souris receveuse létalement irradiée, pour tester la capacité des LT-CSHs à reconstituer son système hématopoïétique ; on parle de reconstitution secondaire (*Figure 8*).

Ainsi, l'injection primaire permet de tester la multipotence des CHs immatures contenues dans la population d'étude tandis que l'injection secondaire permet de tester leur potentiel d'autorenouvellement. Les CSHs possèdent en effet une activité LTRA, pour Long-Term Repopulating Ability, puisqu'elles ont la capacité de reconstituer à long terme (au-delà de 20 semaines) le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée après injection primaire et secondaire.

1.3.1 - Reconstitution hématopoïétique non compétitive

La reconstitution hématopoïétique non compétitive est un test qualitatif qui consiste simplement à injecter la population à tester dans la souris receveuse létalement irradiée et à déterminer la capacité des cellules injectées à reconstituer le système hématopoïétique de l'organisme receveur. Les seules cellules en compétition sont ici les CSHs endogènes de la souris receveuse, qui n'ont pas été détruites lors de l'irradiation. Un nombre minimal de CHs (issues de MO ou de rate) est injecté simultanément, de façon à assurer une radioprotection à court terme de l'organisme receveur, le temps que les CSHs éventuellement contenues dans la population injectée puissent s'installer dans la MO et commencer à reconstituer le système sanguin de la souris greffée. Ces CHs radioprotectrices sont CD45.1, contrairement à la population cellulaire dont le potentiel hématopoïétique est à tester qui est issue d'une souris CD45.2 (*Figure 8*).

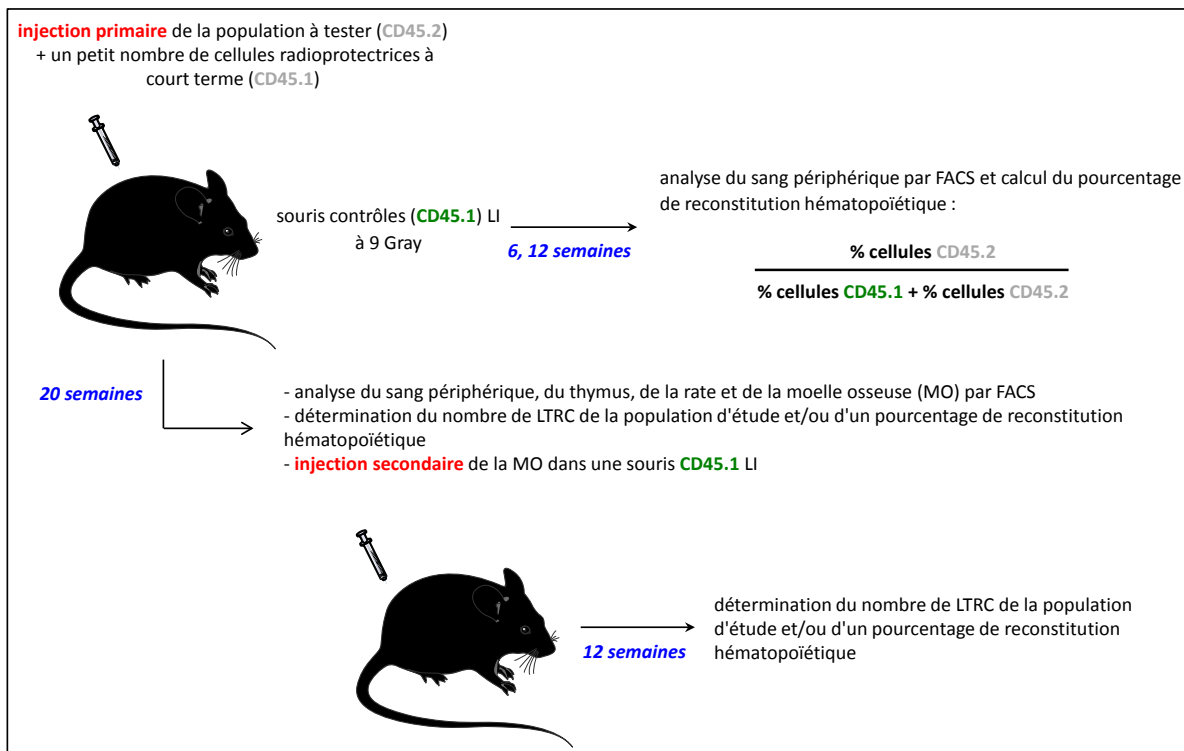


Figure 8 : Test de reconstitution hématopoïétique

La reconstitution primaire permet la mise en évidence des LTRC et la reconstitution secondaire qui suit permet de révéler le potentiel d'autorenouvellement de ces cellules, équivalentes à des cellules souches hématopoïétiques.

Abréviations utilisées : LI létalement irradiée, FACS Fluorescence Activated Cell Sorting, LTRC Long Term Repopulating Cell.

1.3.2 - Reconstitution hématopoïétique compétitive

La reconstitution hématopoïétique compétitive permet d'aller plus loin puisque contrairement à la précédente, elle est quantitative et permet d'évaluer le nombre de LT-CSHs présents au sein d'une population (Harrison, 1980). Ce test consiste à comparer le potentiel de reconstitution d'une population donnée à celui d'une population déjà connue, généralement des cellules de MO ; 10^5 cellules de MO contiennent 1 Repopulating Unit (RU), cellule capable de reconstitution hématopoïétique (Harrison et al., 1993; Yuan et al., 2005). Le nombre de RU de la population d'étude peut être déterminé grâce à la formule suivante :

$$\text{RU issues du donneur} = \% \text{ cellules issues du donneur} \times C / (100 - \% \text{ cellules issues du donneur})$$

où C représente le nombre de RU en compétition. La population compétitive peut aussi être utilisée en tant que population de comparaison (Osawa et al., 1996), par exemple en tant que contrôle négatif après déplétion des cellules Sca-1⁺ (Reya et al., 2003) ou après une série de reconstitutions

primaires dans l'optique de ne garder que le potentiel de reconstitution hématopoïétique à court terme des cellules (Szilvassy et al., 1989). En plus de pouvoir comparer les potentiels de reconstitution des populations en compétition, ce test permet d'avoir une information quantitative concernant le nombre de CSHs contenues dans la population d'étude.

Deux types de reconstitution compétitive ont été décrits en hématologie expérimentale. Le premier mesure l'activité souche hématopoïétique d'une population comparativement à celle de la population en compétition. Ainsi, en admettant que ces deux populations possèdent une activité hématopoïétique identique, chacune des populations reconstituera la moitié du système hématopoïétique de la souris receveuse létalement irradiée. Plus le pourcentage de chimérisme observé est élevé en faveur d'une des deux populations, plus le nombre de Competitive RU ou CRU/CSHs que celle-ci contient est élevé. Toutefois, cette conclusion a été controversée étant donné que le pouvoir prolifératif d'une population contenant des CSHs peut être bien plus élevé que celui d'une autre, sans pour autant que le nombre de CSHs contenues dans ces deux populations soit différent. Pour pallier cette difficulté, ce test a été modifié. Plusieurs groupes de souris receveuses sont co-injectés avec différentes doses de la population cellulaire à tester (dilution limite) et un nombre identique de cellules compétitives. Le nombre de souris non reconstituées pour chaque dose est déterminé et la fréquence de CRU/CSHs de la population d'étude peut être estimée grâce à la loi statistique de Poisson (Taswell, 1981; Szilvassy et al., 1990). Cette loi établit que le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée est reconstitué par une seule et unique CSH lorsque 63% des souris injectées par une même dose de cellules ont leur système hématopoïétique reconstitué. Il est à noter que la CRU est représentative d'une quantité de CSHs et diffère de la RU, représentant seulement la qualité fonctionnelle des CSHs. La reconstitution hématopoïétique par les cellules injectées est considérée comme négative lorsque le pourcentage de reconstitution est inférieur à 5%. Un minimum de 16 semaines après l'injection est nécessaire pour calculer un pourcentage de reconstitution pertinent mais un délai de 6 mois est considéré comme optimal pour déterminer l'activité LTRA des CHs issues de la population injectée.

Différents travaux ont montré un défaut de reconstitution hématopoïétique lors d'une reconstitution compétitive, alors qu'un potentiel normal de reconstitution est obtenu sans cellules compétitives (van Os et al., 2004). Ainsi, ne pas détecter de potentiel de reconstitution par le biais d'une reconstitution hématopoïétique compétitive ne signifie pas nécessairement que les cellules ne possèdent pas de potentiel de reconstitution *in vivo*. Ces deux types de reconstitution n'ont pas la même finalité mais sont complémentaires. En effet, la reconstitution hématopoïétique non compétitive permet simplement de déterminer l'éventuelle présence de CSHs au sein de la

population injectée, alors que la reconstitution hématopoïétique compétitive permet en plus de déterminer le nombre de CSHs contenues dans cette population.

Lors d'une reconstitution hématopoïétique non compétitive, il est également possible que deux populations possèdent une activité LTRA similaire au moment de la reconstitution primaire, mais différente après la reconstitution secondaire (Petit-Cocault et al., 2007).

1.3.3 - Reconstitutions hématopoïétiques pour des populations humaines

Pour les cellules humaines, la méthode est la même mais les modèles animaux utilisés en tant qu'organismes receveurs sont différents. Au fil du temps, de nombreux modèles ont été mis au point pour étudier les propriétés hématopoïétiques de cellules humaines, et correspondent aux souris NOD (Kataoka et al., 1983), SCID (McCune et al., 1988), aux fœtus de moutons (Srouf et al., 1992; Zanjani et al., 1995; Zanjani et al., 1996), aux souris NOD-SCID (Shultz et al., 1995; Larochelle et al., 1996), NOD-SCID- $\beta 2m^{null}$ (Christianson et al., 1997) et enfin NOD-SCID- γc^{null} (Ito et al., 2002). Pour des raisons évidentes, l'utilisation de souris immunodéficientes est plus pertinente et rend bien plus facile l'étude des CSHs humaines. Ces souris sont capables d'accepter des cellules humaines au sein de leur organisme et présentent un degré d'immunodéficiência plus ou moins élevé. L'immunodéficiência des souris NOD se rapporte principalement à un défaut d'activité NK. Quant aux souris SCID, homozygotes pour la mutation *scid*, elles présentent une absence totale de lymphocytes B et T. L'apparition des souris NOD-SCID, couramment utilisées à l'heure actuelle, a grandement amélioré la greffe des cellules humaines au sein des souris receveuses, conséquence de leur immunodéficiência accrue en cellules NK et en lymphocytes B et T. Par la suite, deux modèles murins ont encore permis d'améliorer les taux de reconstitution hématopoïétique : la souris NOD-SCID- $\beta 2m^{null}$ dépourvue des molécules d'histocompatibilité de classe I (CMH I), suivie quelques années plus tard de la souris NOD-SCID- γc^{null} entièrement dépourvue de cellules NK.

1.4 - Synthèse

Bien que les tests clonogéniques et les cocultures à long terme réalisés à partir de certaines populations cellulaires permettent d'obtenir des résultats qui peuvent être corrélés à l'activité hématopoïétique décrite *in vivo*, les tests de reconstitution hématopoïétique restent aujourd'hui les seuls capables de révéler le réel potentiel souche hématopoïétique d'une population donnée. Cependant, les tests *in vitro* et *in vivo* restent complémentaires, les uns permettant de sélectionner

les populations *a priori* les plus enrichies en CSHs, et les autres permettant de révéler les réelles propriétés souches hématopoïétiques de ces populations dans un organisme vivant (homing, migration, capacité multilignage, autorenouvellement,...) (Figure 9). En effet, plusieurs études montrent que les populations possédant une capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme sont également capables de garder un potentiel hématopoïétique à long terme *in vitro* (van der Sluijs et al., 1990; Ploemacher et al., 1991; Weilbaecher et al., 1991; Down and Ploemacher, 1993).

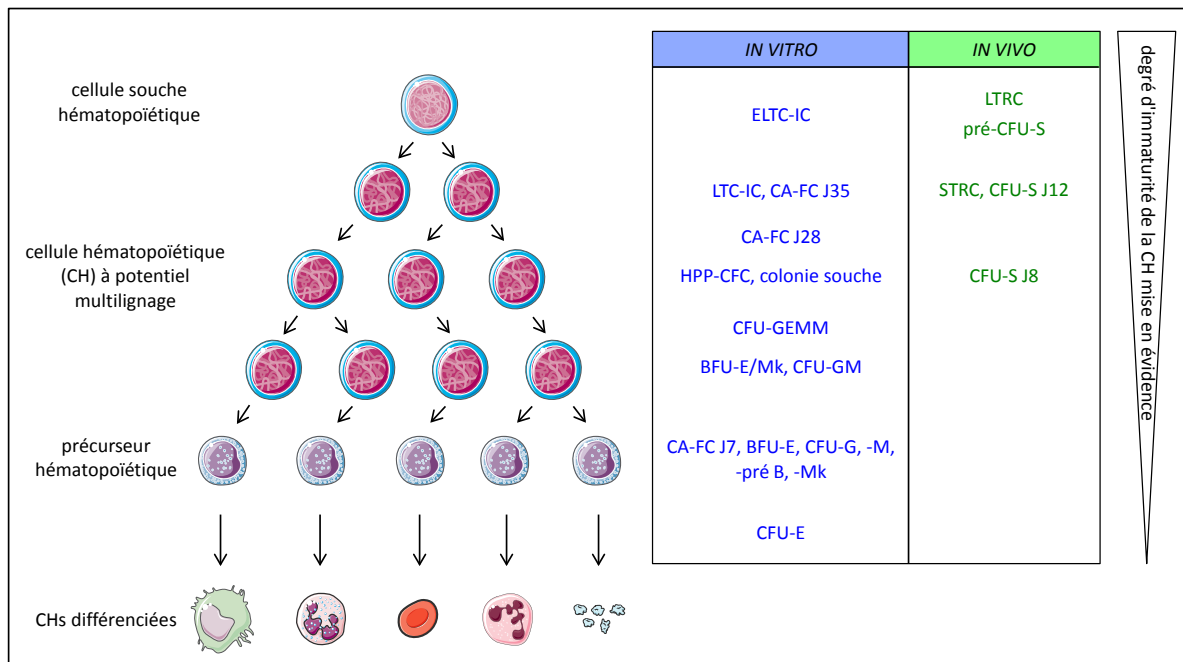


Figure 9 : Parallèle entre les tests utilisés *in vitro* et *in vivo* pour la mise en évidence des différents compartiments de cellules hématopoïétiques

Abréviations utilisées : (E)LTC-IC (Extended) Long Term Culture-Initiating Cell, CA-FC Cobblestone Area-Forming Cell, HPP-CFC High Proliferative Potential-Colony Forming Cell, CFU-S Colony Forming Unit-in the Spleen, BFU Burst Forming Unit, -E Érythroïde, -G Granulocytaire, -M Macrophagique, -Mk Mégacaryocytaire, STRC Short Term Repopulating Cell, LTRC Long Term Repopulating Cell.

Dans le cas de cellules embryonnaires, il est important de noter que les tests de reconstitution hématopoïétique sous-estiment souvent la contribution réelle des cellules issues de l'injection à la reconstitution hématopoïétique de l'organisme receveur (reconstitution non compétitive) ainsi que le nombre réel de ST-CSHs et LT-CSHs contenues dans la population injectée (reconstitution compétitive). En effet, ces tests ne peuvent pas détecter les cellules qui n'ont pas su trouver leurs niches et qui n'ont donc pas activé leur potentiel de reconstitution hématopoïétique. En plus des

propriétés de multipotence et d'autorenouvellement, l'expression de marqueurs de surface permettant aux cellules à potentiel souche hématopoïétique de se diriger et de se nicher dans le microenvironnement approprié est également testée. Les LT-CSHs indétectables avec le test « classique » de reconstitution représentent en réalité des cellules pré-LT-CSHs. Il est probable que certaines CSHs embryonnaires précoces n'aient pas encore acquis les propriétés phénotypiques et/ou fonctionnelles nécessaires à leur migration dans la MO une fois injectées dans un organisme adulte. L'acquisition de la capacité des CSHs embryonnaires à se diriger vers le microenvironnement adéquat pour leur différenciation hématopoïétique, constitue donc une étape clé dans leur processus de maturation au cours du développement. Pour remédier à ce problème et dans le but d'améliorer la détection des CSHs embryonnaires via les tests de reconstitution hématopoïétique précédemment décrits, d'autres méthodes d'injection ont été mises au point. L'injection en intra-hépatique dans des souriceaux nouveaux-nés plutôt qu'en intra-veineux dans des souris adultes permet aux cellules embryonnaires injectées de se retrouver au contact d'un microenvironnement encore favorable au maintien et à la prolifération des CSHs (Yoder et al., 1996). Ces nouveaux-nés sont conditionnés quelques jours avant leur naissance par injection de busulfan (agent myélosuppresseur) *in utero* pour les préparer à recevoir l'injection. Il est également possible de réaliser l'injection en intra-fémorale, ce qui permet aux CSHs embryonnaires injectées de se retrouver directement au contact d'un microenvironnement favorable à leur maintien (Zhan and Zhao, 2008). Toutefois l'injection intra-fémorale ne permet pas de tester la capacité des cellules injectées à pouvoir se diriger d'elles-mêmes vers leur niche.

Pour conclure, chacun des tests énoncés possède des avantages et des inconvénients. Selon la question scientifique posée, il est donc nécessaire de choisir et/ou d'adapter le test le plus pertinent.

CHAPITRE II - L'ONTOGENÈSE DE L'HÉMATOPOÏÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

Le système hématopoïétique s'établit très tôt durant la vie embryonnaire. Il joue un rôle primordial puisqu'il génère continuellement des CHs différenciées dans le but d'assurer l'homéostasie du système hématopoïétique. Grâce aux CSHs, la quantité et la qualité de ces CHs sont en perpétuel renouvellement tout au long de la vie adulte. Cependant, avant de devenir des cellules adultes pleinement fonctionnelles, les CSHs subissent une succession d'étapes de maturation au travers des différents sites et organes hématopoïétiques embryonnaires. L'étude des étapes de maturation des CSHs définitives est cruciale pour tenter de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires nécessaires à l'établissement et au maintien de ces cellules.

Les premières CHs émergent avant la mise en place de la circulation sanguine dans le SV mais ces cellules sont majoritairement des érythrocytes primitifs (servant à l'oxygénation du futur embryon) et des macrophages (éliminant les débris de cellules apoptotiques) qui ne vont pas participer à l'édification du système hématopoïétique retrouvé plus tard chez l'adulte (Baron et al., 2012). Toutefois, une étude a montré que la microglie adulte du cerveau, constituée de cellules à caractère phagocytaire, est issue des macrophages primitifs du SV (Ginhoux et al., 2010). Les CSHs définitives sont issues d'une deuxième vague d'hématopoïèse qui prend naissance dans l'embryon au niveau du plancher de l'aorte dorsale dans la région SPlanchnopleure Para-aortique (p-Sp)/AGM ainsi que dans les vaisseaux vitellins et ombilicaux. Puisque les CSHs de l'aorte sont détectées seulement pendant une courte période (entre E10.5 et E12.5) et que le nombre de progéniteurs hématopoïétiques y est très faible par rapport à ceux du SV, du PI et du FF, cette région n'est pas considérée comme étant capable d'amplification/différenciation hématopoïétique. Peu après leur émergence, les CSHs colonisent le FF qui, à l'inverse de la p-Sp/AGM, joue un rôle majeur dans l'amplification et la différenciation hématopoïétique. Puisque le FF n'a pas été décrit comme étant capable de générer des CSHs *de novo*, sa colonisation hématopoïétique a été dans un premier temps uniquement attribuée aux progéniteurs hématopoïétiques/CSHs issus de la région p-Sp/AGM. Toutefois en prenant en compte à la fois la durée moyenne de division cellulaire et l'augmentation massive et très rapide du nombre de CHs/CSHs dans le FF entre E10.5 et E14.5, les chercheurs se sont naturellement demandé si le très petit nombre de CSHs générées par la région p-Sp/AGM était réellement suffisant pour expliquer une telle amplification. Il s'avère que le SV et le PI jouent également un rôle important dans la mise en place du système hématopoïétique définitif : en effet dès E9, le SV contient des pré-

CSHs capables de reconstituer le système hématopoïétique de souriceaux nouveaux-nés, et à E12.5 il est capable de générer et/ou d'amplifier des CSHs définitives ; quant au PI, il est au moins capable d'amplifier un contingent de CSHs, si ce n'est d'en produire par lui-même. De façon intéressante, une étude suggère que le liquide amniotique contiendrait également des LT-CSHs de phénotype Lin⁻ckit⁺ (Ditadi et al., 2009). On distingue donc des sites d'émergence hématopoïétique (AGM), d'émergence/amplification (SV) et des organes d'amplification (PI et FF). Depuis le FF, les CSHs vont ensuite coloniser les organes hématopoïétiques définitifs que sont le thymus, la rate et enfin la MO où elles résident tout au long de la vie adulte (Figure 10).

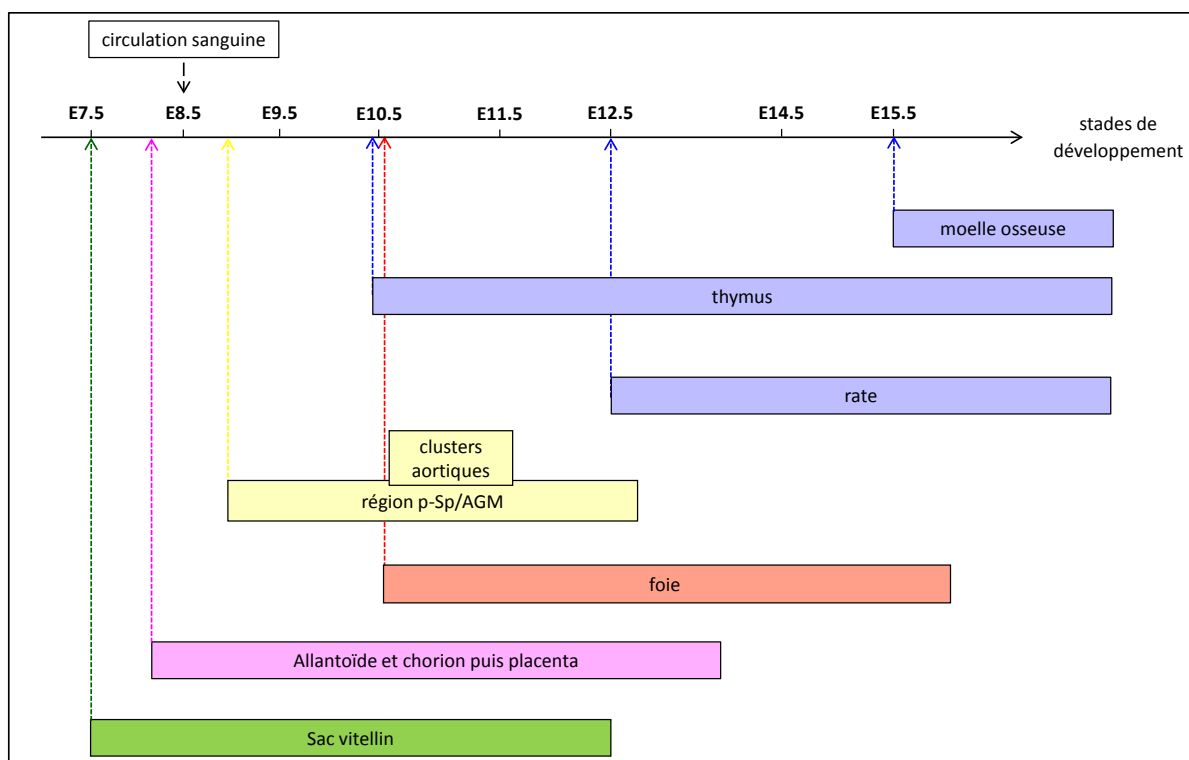


Figure 10 : Mise en place du système hématopoïétique dans l'embryon de souris

Les premières CHs apparaissent dans les îlots sanguins du SV dès E7.5. Des CHs sont détectables juste avant le début de la circulation dans l'allantoïde et le chorion, futur placenta. Les CHs de la région p-Sp/AGM sont présentes dès E9. A partir d'E10.5, le foie devient hématopoïétique et permet l'amplification massive du contingent de CSHs embryonnaires avant que celles-ci ne colonisent les organes hématopoïétiques définitifs que sont le thymus, la rate et la moelle osseuse.

2.1 - Le sac vitellin

Chez la souris, le SV est une annexe embryonnaire formant une fine membrane entourant l'embryon et relié à l'intestin moyen par les vaisseaux vitellins. Chez l'homme, il consiste en une petite vésicule connectée à l'intestin qui va progressivement régresser au cours du développement embryonnaire.

Le SV est constitué à la fois de cellules endodermiques primitives et de cellules mésodermiques, deux composantes nécessaires à l'apparition de l'hématopoïèse. Ces dernières, impliquées dans la formation de nombreux autres organes, migrent vers la région extra-embryonnaire à partir de la partie postérieure de la ligne primitive pour participer à la formation du SV. Il est clairement démontré que le SV est capable de générer des CHs transitoires lors de l'hématopoïèse primitive et il n'est pas exclu qu'il puisse également produire des CSHs définitives.

2.1.1 - Émergence des premières cellules hématopoïétiques

Grâce au développement des tests clonogéniques, le SV a été le premier organe à être identifié comme possédant une activité hématopoïétique chez la souris (Moore and Metcalf, 1970). Par la suite et grâce à une étude plus fine réalisée pour plusieurs mammifères, cette première activité hématopoïétique a été mise en évidence au niveau d'un contingent de CHs primitives situées dans la couche mésodermique du SV (Haar and Ackerman, 1971; Smith and Glomski, 1977; Tiedemann, 1977; Takashina, 1987). Ces agrégats cellulaires appelés « îlots sanguins » sont observables entre E7.5 et E9.5 chez la souris (*Figure 11*) et plusieurs modèles représentatifs de ces agrégats ont été proposés depuis leur mise en évidence (*Figure 12*).

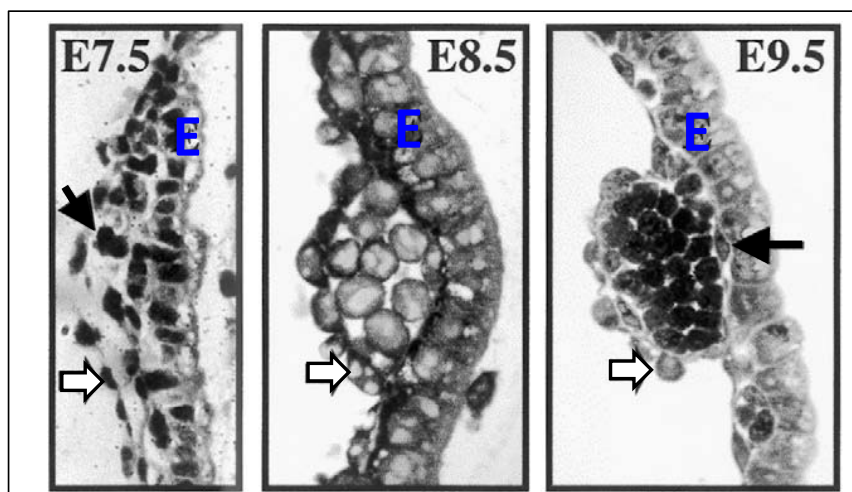


Figure 11 : Développement des îlots sanguins du sac vitellin de souris entre E7.5 et E9.5

Les îlots sanguins se forment entre une couche de cellules endodermiques (E) et une couche de cellules mésothéliales (flèches blanches). Ils se développent à partir de cellules mésodermiques indifférenciées (flèche noire E7.5) et donnent naissance à des érythrocytes nucléés entourés d'une couche de cellules endothéliales (flèche noire E9.5). La description morphologique actuelle des îlots sanguins de souris rassemble donc à la fois les définitions de Sabin FR et de Maximow A (issue de Palis et al., 2001).

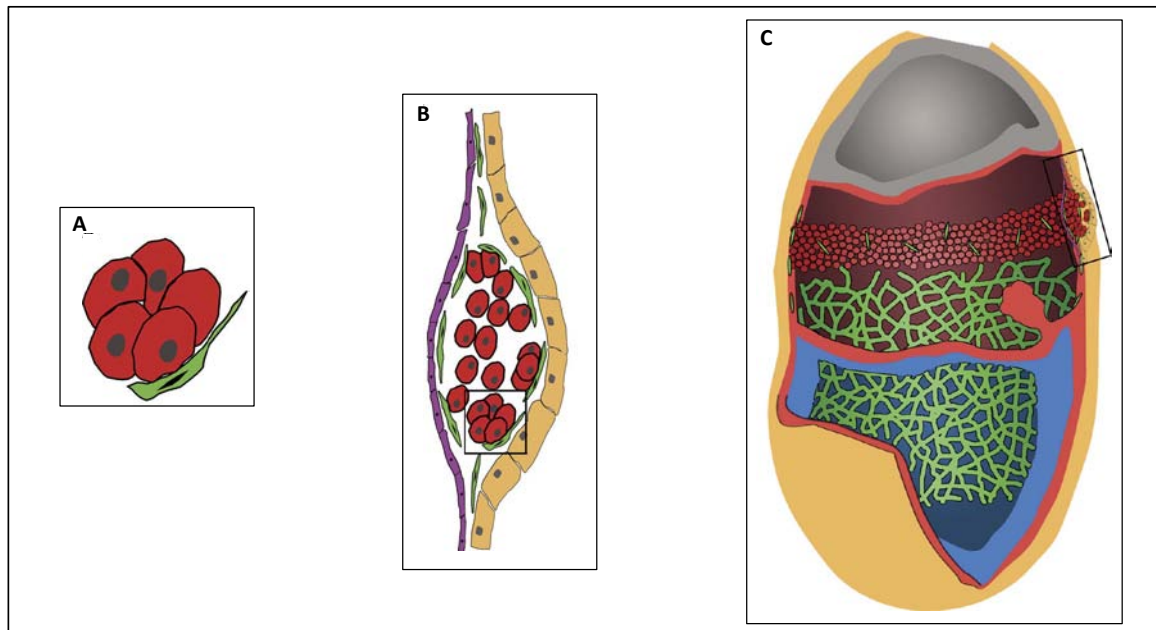


Figure 12 : Trois différents modèles représentatifs des îlots sanguins du sac vitellin

(A) Sabin FR propose en 1917 le terme d'îlot sanguin en référence à des agrégats de CHs (en rouge) attachés à l'endothélium du SV (en vert) chez l'oiseau. **(B)** Maximow A, un contemporain de Sabin FR, propose une définition plus appropriée en indiquant que l'îlot sanguin est bien constitué de CHs entourées de CE, mais que le tout est situé entre l'endoderme viscéral extérieur (en jaune) et le mésothélium intérieur (violet). **(C)** Un nouveau modèle présenté par Ferkowicz en 2003 indique que ce que l'on nomme îlot sanguin forme en réalité une bande continue constituée de précurseurs érythroïdes primitifs (cellules rouges) et de rares cellules endothéliales (cellules vertes). Le plexus capillaire primitif (réseau vert) sépare cette bande de l'embryon proprement dit. L'amnios est composé de mésoderme (en rouge) et d'ectoderme (en bleu) (schémas issus de Ferkowicz et al., 2005).

Le dernier modèle date de 2003, année pendant laquelle Ferkowicz et al. ont montré que la structure nommée îlot sanguin correspond en réalité à une bande localisée dans la région proximale du SV et constituée principalement de cellules érythroïdes nucléées exprimant le CD41, marqueur de CSHs précoces (Ferkowicz et al., 2003; Mikkola et al., 2003a). Ces précurseurs érythroïdes primitifs (EryP-CFC) jouent un rôle primordial pour la croissance et la survie de l'embryon dans les premières étapes de développement post-implantatoire et ne sont présents à aucun autre moment du développement embryonnaire, indiquant que cette vague d'hématopoïèse primitive est transitoire. Dans le SV, ils sont associés temporairement à des macrophages (Cline and Moore, 1972) et des mégacaryocytes (Xu et al., 2001), l'ensemble étant entouré d'une couche de Cellules Endothéliales (CE). Les EryP-CFC apparaissent dans le SV juste après la formation du mésoderme mais juste avant que les îlots sanguins puissent être morphologiquement observables. Ils prolifèrent très rapidement durant 48h

dans le SV en développement, et ils vont se détacher du SV au moment des premiers battements cardiaques pour partir dans la circulation sanguine (Wong et al., 1986; Palis et al., 1999; Ji et al., 2003; McGrath et al., 2003) où ils vont entamer leur processus de différenciation. Bien que ces érythrocytes "primitifs" soient approximativement six fois plus larges et contiennent six fois plus d'hémoglobine une fois matures que les érythrocytes définitifs (Steiner, 1973), ils partagent tout de même plusieurs points communs notamment dans leurs processus de maturation respectifs, incluant chacun l'accumulation progressive d'hémoglobine (Fantoni et al., 1969; Brotherton et al., 1979), la condensation du noyau (Sasaki and Kendall, 1985) et enfin l'énucléation, stade terminal de différenciation d'un érythrocyte (Kingsley et al., 2004). Toutefois contrairement à l'énucléation des érythrocytes définitifs qui a lieu dans le FF, celle des érythrocytes primitifs se fait principalement dans la circulation sanguine entre E14.5 et E16.5, justifiant ainsi leur qualité d'érythrocytes primitifs (Palis et al., 2010). Les travaux de McGrath et al. montrent grâce à des cocultures *in vitro* que cette maturation peut également avoir lieu dans le FF (McGrath et al., 2008). Une étude montre qu'avant la mise en place de la circulation sanguine, le SV est également capable de produire des lymphocytes B (Sugiyama et al., 2007). Par ailleurs, des progéniteurs hématopoïétiques bipotents capables de s'engager à la fois dans les voies de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (Megacaryocyte/Erythroid Progenitors ou MEPs) ont été identifiés au niveau du SV (Tober et al., 2007). Ils émergent à E7.5 et disparaissent à E10.5. L'ensemble de ces résultats montrent que l'hématopoïèse primitive du SV concerne plusieurs types de précurseurs hématopoïétiques différents et est donc plus complexe qu'initialement suggérée.

A la fin des années 1960, la région aortique n'avait pas encore été définie comme source principale de CSHs et l'idée que le SV puisse être à l'origine des CHs/CSHs adultes prédominait (Moore and Owen, 1965; Moore and Owen, 1967; Moore and Metcalf, 1970). Après avoir émergé du SV, il était suggéré que ces cellules colonisaient le FF via la circulation sanguine pour s'amplifier avant de rejoindre la MO. Cette théorie avait principalement été établie à partir d'injections *in utero* de cellules embryonnaires originaires des îlots sanguins du SV. Des analyses histologiques réalisées après la naissance indiquaient qu'une fraction non négligeable de cellules issues de l'injection était retrouvée dans le thymus et la MO des nouveaux-nés. Les travaux de Liu et al. de 1991 avaient renforcé cette théorie, montrant que certaines cellules du SV E8-E9 étaient capables de coloniser le thymus fœtal et de donner naissance à des cellules du lignage T (Liu and Auerbach, 1991). De façon intéressante, un pic d'activité lymphopoïétique avait été mis en évidence dans le SV E11.5 tandis qu'aucun potentiel de la sorte n'était alors détectable au niveau intra-embryonnaire.

2.1.2 - Participation à l'hématopoïèse définitive

L'hématopoïèse décrite dans le SV n'est en réalité pas seulement restreinte à l'érythropoïèse primitive. En effet, l'analyse *in vitro* des précurseurs/progéniteurs hématopoïétiques contenus dans le SV a montré deux vagues successives d'érythropoïèse. La première concerne les EryP-CFC décrits plus haut, alors que la deuxième concerne des cellules érythroïdes définitives (HPP-CFC, BFU-E et CFU-E) émergeant et proliférant entre E8.25 et E10.5 (Wong et al., 1986; Palis et al., 1999; Palis et al., 2001). Les HPP-CFC sont présentes dans le SV précoce et en plus grand nombre que dans la région p-Sp/AGM au même stade, suggérant ainsi deux émergences distinctes. Avant la mise en place de la circulation sanguine, événement qui a lieu aux alentours d'E8.5 (8 paires de somites), les BFU-E restent confinées dans le SV ; leur nombre augmente ensuite significativement dans le SV mais aussi dans la circulation sanguine où elles transitent entre E11.5 et E12.5. Un petit nombre de CFU-E est également observé mais reste inférieur à celui du FF un peu plus tard, indiquant que c'est bien dans le FF et non pas dans le SV que ces cellules érythroïdes définitives s'amplifient. Des CHs plus immatures, multipotentes, capables de générer des cellules granulocytaires, myéloïdes, lymphoïdes, macrophagiques et mégacaryocytaires, sont également détectées au niveau du SV entre E8.5 et E9.5 (Godin et al., 1995). Un peu plus tôt dans le développement embryonnaire, entre E8 et E8.5, le SV contient déjà des précurseurs lymphoïdes détectables à la fois *in vitro* et *in vivo* (Palacios and Imhof, 1993). Entre E7.5-E8.5, l'équipe de Godin a montré *in vitro* que le SV n'est pas capable de générer de précurseurs lymphoïdes T contrairement à la région p-Sp/AGM (Cumano et al., 1996). Étant donné la faible quantité de cellules présentes dans le SV à cette période du développement embryonnaire, ces résultats n'ont pas pu être confirmés *in vivo*. Toutefois, les auteurs en ont conclu que le SV ne contribue pas à la mise en place de l'hématopoïèse définitive.

Pour vérifier la présence de CHs plus immatures dans le SV, des tests de reconstitution hématopoïétique à long terme ont été réalisés soit dans des souris receveuses adultes létalement irradiées, soit dans des souriceaux nouveaux-nés conditionnés avant la naissance par une injection de busulfan. Ainsi, les travaux de Toles et al. ont montré qu'une activité érythroïde définitive est présente dans le SV avant E11.5 et qu'elle peut donner lieu à une reconstitution érythroïde à long terme après injection dans une souris adulte létalement irradiée (Toles et al., 1989). L'équipe de Yoder se pose alors la question de savoir si l'absence de détection de LT-CSHs au niveau du SV avant E11.5 (Muller et al., 1994) ne provient pas du fait que le SV précoce contient des pré-LT-CSHs qui nécessitent d'être placés dans un microenvironnement approprié pour pouvoir révéler leur réel potentiel de reconstitution hématopoïétique. Il suppose alors qu'une injection intra-hépatique dans un souriceau nouveau-né conditionné avant la naissance, plutôt qu'une injection intra-veineuse dans

une souris adulte létalement irradiée, supporterait de façon plus efficace la croissance et le développement de ces cellules embryonnaires. Utilisant ce protocole, il montre que des cellules de phénotype CD34⁺ckit⁺ issues de SV E9 (Yoder et al., 1997a; Yoder et al., 1997b) et E10 (Yoder and Hiatt, 1997) peuvent effectivement reconstituer le système hématopoïétique de souris nouveaux-nés. Les travaux récents de Yoshimoto et al. étayent ces résultats puisqu'ils montrent que le SV E9.5 est capable de produire des progéniteurs lymphoïdes T définitifs (Yoshimoto et al., 2012). Des cellules issues de SV E8.5 développent également la capacité de reconstituer le système hématopoïétique complet d'une souris adulte létalement irradiée après avoir été cocultivées sur un tapis de cellules stromales dérivées d'AGM E10.5 (Matsuoka et al., 2001). L'ensemble de ces résultats montre que le microenvironnement local joue un rôle majeur dans la régulation de la différenciation des CHs très immatures du SV.

Le SV est donc un site extra-embryonnaire qui possède un potentiel hématopoïétique important à des stades précoces, impliquant non seulement des précurseurs et progéniteurs primitifs et définitifs, mais aussi des pré-LT-CSHs. Quatre modèles de souris transgéniques ont été utilisés pour étudier l'origine de ces CHs immatures présentes dans le SV à des stades précoces du développement :

- Les embryons Ncx1^{-/-}, invalidés pour le gène Ncx1 (échangeur Na/Ca de type I) codant pour une pompe sodium-calcium spécifique du cœur, ne survivent pas au delà du stade E10, phénomène dû à une absence totale de circulation sanguine. Bien que le nombre de précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs du SV soit normal, aucune cellule de la sorte n'est retrouvée au sein de l'embryon. Les auteurs ont donc conclu que les précurseurs hématopoïétiques primitifs et définitifs détectés avant E10 sont générés par le SV et sont redistribués par la suite dans l'embryon via la circulation sanguine (Lux et al., 2008). Cette étude suggère également que la vague de précurseurs érythroïdes définitifs du SV a lieu avant l'émergence des CSHs dans la région p-Sp/AGM. Toutefois trois études montrent que la circulation sanguine (Adamo et al., 2009; North et al., 2009) et l'expression de l'IL-3 par les cellules en circulation (Robin et al., 2006) sont nécessaires à l'hématopoïèse aortique, ce qui expliquerait les résultats de Lux et al..

- Les embryons Vecad^{-/-}, invalidés pour le gène de la VE (Vascular Endothelial)-cadhérine ou VeCad, codant pour une protéine transmembranaire spécifique des jonctions entre CE, meurent vers E11 du fait d'un défaut d'intégrité vasculaire trop important entraînant une absence de communication vasculaire entre le SV et l'embryon (Gory-Faure et al., 1999). Toutefois, l'analyse du contenu hématopoïétique des SV de ces embryons a révélé la présence de globules rouges, macrophages, mégacaryocytes, polynucléaires neutrophiles et précurseurs multipotents. Ces résultats constituent

la preuve que des cellules de plusieurs lignages hématopoïétiques définitifs émergent du SV. Cependant, aucune activité lymphocytaire n'a pu être détectée (Rampon and Huber, 2003). Il n'est pas exclu que cette absence de détection soit liée aux problèmes vasculaires majeurs des embryons.

- Une étude plus récente utilisant une stratégie non-invasive de traçage cellulaire, basée sur le système Cre/loxP et la réactivation du gène Runx1 (Runt-related transcription factor 1, facteur de transcription indispensable au déroulement de l'hématopoïèse, voir §5.1) par injection de tamoxifène, suggère que le SV E7.5 contient des cellules capables de donner naissance à des précurseurs lymphoïdes mais aussi à des CSHs adultes (Samokhvalov et al., 2007).

- En réactivant l'expression de Runx1 dans des embryons précoces Runx1^{-/-} entre E6.5 et E7.5, Tanaka et al. montrent grâce à des approches *in vivo* et *ex vivo* que les CSHs définitives sont principalement issues du mésoderme extra-embryonnaire et que le SV serait l'unique source de CHs/CSHs définitives, la région p-Sp/AGM constituant simplement une niche transitoire pour les CSHs en cours de maturation (Tanaka et al., 2012). Encore une fois, ces résultats sont discutables étant donné qu'entre E6.5 et E7.5, l'hématopoïèse primitive est indispensable à la survie de l'embryon ainsi qu'à la suite du processus de mise en place de l'hématopoïèse définitive.

Toutefois, après que la circulation sanguine soit établie, les mouvements cellulaires incessants dus au flux sanguin ne permettent pas de conclure sur l'origine de CHs/CSHs observées dans le SV. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si le SV est capable de produire des CSHs ou s'il constitue seulement un réservoir transitoire d'amplification de CHs provenant d'autres sites de production.

Plusieurs auteurs ont étudié cette activité hématopoïétique plus tardive du SV, notamment Huang et al. qui montrent que le SV E11.5 possède des LT-CSHs (Huang and Auerbach, 1993). Par la suite, les travaux de Kumaravelu et al. indiquent que le SV E12.5 possède des LT-CSHs et acquiert *in vitro* la capacité d'amplifier leur quantité, alors qu'il en est incapable à E11.5 (Kumaravelu et al., 2002). En effet, au bout de 3 jours de culture, le nombre de LT-CSHs du SV E12.5 passe de 1,8 à 6,8. Toutefois, le microenvironnement du SV E12.5 n'est manifestement pas capable de maintenir à long terme ce nombre de LT-CSHs puisqu'au bout de 7 jours de culture, la présence de telles cellules est quasiment indétectable. Ces résultats reflètent l'aspect transitoire de l'activité hématopoïétique du SV *in vivo*. Par ailleurs, les estimations des auteurs montrent que les activités hématopoïétiques de la région p-Sp/AGM et du SV cumulées suffisent à expliquer le grand nombre de CSHs retrouvées dans le FF E14.5, suggérant par là-même que le SV est capable de produire des CSHs. Ainsi, la génération (et/ou l'amplification) des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs ne se ferait pas uniquement dans la région p-Sp/AGM (et/ou le FF) mais aurait également lieu dans le SV. Il est à noter qu'à l'époque, la

contribution du PI dans la mise en place de l'hématopoïèse définitive n'avait pas encore été démontrée.

2.2 - La région aortique : source principale de CHs/CSHs définitives

Première mise en évidence chez l'oiseau

L'hypothèse d'une source alternative intra-embryonnaire de CSHs a été émise pour la première fois en 1975 avec les travaux de Dieterlen-Lièvre et al. sur l'embryon de poulet (Dieterlen-Lievre, 1975). En effet, des constructions chimériques caille-poulet, combinant embryon de caille et SV de poulet, ont été utilisées pour déterminer l'origine des CHs. Les greffes ont été effectuées sur des embryons précoces, c'est-à-dire avant la mise en place de la circulation sanguine, pour pouvoir s'affranchir des mouvements cellulaires liés à la circulation sanguine. L'origine des CHs présentes dans la rate et le thymus des embryons chimériques a été analysée entre 6 et 11 jours après la greffe. Les résultats ont montré que toutes les cellules, qu'elles soient de type granulocytaire, érythrocytaire ou encore lymphocytaire, proviennent de la caille. La contribution hématopoïétique du SV ne serait donc que transitoire et n'interviendrait que lors des étapes initiales du développement embryonnaire. Des greffes similaires poulet-poulet ne différant que par le sexe (Lassila et al., 1978) ou par les molécules du CMH I (Lassila et al., 1982) ont pu montrer que les cellules lymphoïdes du thymus et de la bourse de Fabricius proviennent d'une source intra-embryonnaire. Les auteurs ont par ailleurs conclu que les CHs issues du SV ne colonisent que très peu, voire pas du tout, les organes lymphoïdes et que par conséquent, elles sont bel et bien différentes des CSHs définitives. Quelques années plus tard, il a été montré grâce à des études *in vitro* que ce sont les parois de l'aorte qui sont à l'origine des CHs intra-embryonnaires (Cormier and Dieterlen-Lievre, 1988).

Mise en évidence chez la souris

Chez la souris, cette région aortique d'origine mésodermique est nommée splanchnopleure para-aortique (p-Sp, présente jusqu'à 25 somites) ou AGM (observable entre 25 et 45 somites, E10-E12), cette dernière étant l'évolution directe de la p-Sp. La région AGM est composée de l'aorte dorsale, du pronephros, du mesonephros et des bourgeons génitaux (*Figure 13*).

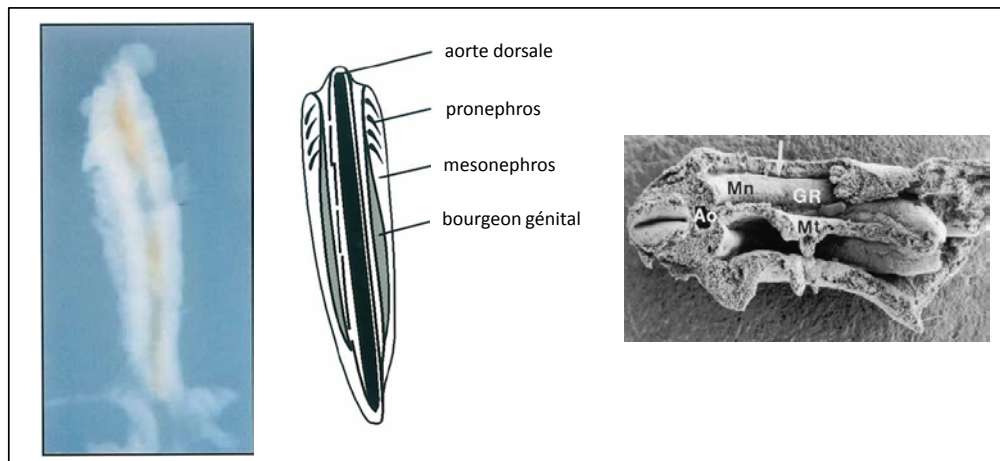


Figure 13 : La région Aorte-Gonades-Mesonephros ou AGM à E10.5

La région AGM est constituée de l'aorte au centre entourée de part et d'autre par le pronephros, le mesonephros et les bourgeons génitaux. Abréviations utilisées : Ao Aorta, GR Genital Ridge, Mn Mesonephros, Mt Mesentery (illustrations issues de Medvinsky et al., 1996, à gauche ; Godin et al., 1999 en microscopie électronique, à droite).

Ce n'est qu'à la fin des années 1960 que l'hypothèse d'une origine intra-embryonnaire de CHs a été formulée. Cette source hématopoïétique est identifiée à un stade où le FF, décrit jusqu'alors comme l'organe hématopoïétique embryonnaire principal, ne possède pas encore d'activité hématopoïétique. Tyan et Herzenberg montrent qu'à E9, le SV mais aussi la partie caudale de l'embryon peuvent produire des cellules lymphocytaires capables de reconstituer le système hématopoïétique de souris létalement irradiées (Tyan and Herzenberg, 1968). Par la suite, plusieurs équipes ont étudié plus finement *in vitro* les CHs générées par ces deux sites hématopoïétiques. Ainsi, le SV aussi bien que l'embryon sont capables de produire des colonies hématopoïétiques et notamment des colonies lymphoïdes B (Ogawa et al., 1988; Cumano et al., 1993; Huang et al., 1994). En revanche à E7.5, seule la p-Sp peut produire des cellules à potentiel lymphoïde T (Cumano et al., 1996). Les travaux de Godin et al. ont permis de montrer à la fois *in vitro* (Godin et al., 1995) et *in vivo* (Godin et al., 1993) que c'est la p-Sp qui est à l'origine de ces précurseurs hématopoïétiques détectés. Les résultats indiquent que des cellules issues de p-Sp E9 sont capables de donner des lymphocytes B matures une fois injectées dans des souris immunodéficientes SCID irradiées de façon sublétales, alors que les cellules issues de SV en sont incapables. La même année, Medvinsky et al. réalisent une étude fonctionnelle comparative des cellules issues du SV, de la région AGM et du FF à E10.5 en déterminant la fréquence de CFU-S de ces trois organes. Ainsi, la région p-Sp contient une

activité CFU-S supérieure à celle du SV, alors qu'au même moment aucune activité de la sorte n'est détectable au niveau du FF (Medvinsky et al., 1993).

Par la suite, plusieurs études *in vivo* ont renforcé cette hypothèse. Comme cela a été montré pour le SV, Yoder et al. ont mis en évidence la présence de LT-CSHs dans la population CD34⁺ckit⁺ de p-Sp E9 grâce à l'injection intra-hépatique de cette population dans des souriceaux nouveaux-nés conditionnés avant la naissance (Yoder et al., 1997a). Les auteurs ont toutefois détecté un nombre plus important de LT-CSHs CD34⁺ckit⁺ dans le SV E9, renforçant l'hypothèse selon laquelle le SV et l'embryon représentent deux sources hématopoïétiques indépendantes. Lorsque les mêmes cellules sont injectées dans des souris adultes létalement irradiées, aucun potentiel de reconstitution hématopoïétique n'est détecté, preuve du caractère très précoce des LT-CSHs CD34⁺ckit⁺ de la p-Sp E9. Il est à noter que des cellules issues de p-Sp ou de SV E8.5 sont capables de reconstituer le système hématopoïétique complet d'une souris adulte létalement irradiée après avoir été cocultivées sur un tapis de cellules stromales dérivées d'AGM E10.5, montrant qu'à défaut de pouvoir produire de véritables LT-CSHs, ces deux organes peuvent générer des pré-LT-CSHs (Matsuoka et al., 2001). Ces résultats montrent encore une fois l'importance du microenvironnement embryonnaire rencontré *in vivo* par les pré-CSHs définitives pour leur maturation complète. Toutefois, les travaux de Godin et al. de 1999 montrent qu'*in vivo*, le microenvironnement de l'AGM n'est pas capable de supporter la différenciation hématopoïétique (Godin et al., 1999), suggérant que les pré-LT-CSHs générées par le SV ne migrent pas dans l'AGM par la suite.

C'est avec les travaux de Muller et al. que les premières LT-CSHs issues d'AGM E11 (35-40 somites) et capables de reconstitution à long terme dans des souris létalement irradiées ont été mises en évidence (Muller et al., 1994). Les auteurs montrent également qu'à E11.5 (>42 somites), l'AGM et le SV contiennent des LT-CSHs. Les expériences de reconstitution compétitive de Kumaravelu et al. ont montré qu'à E10.5 l'AGM ne contient pas de LT-CSHs, en contient 1 à E11.5 et environ 3 à E12.5 (Kumaravelu et al., 2002; Gekas et al., 2005). Pour déterminer si l'AGM et le SV ne contiennent véritablement pas de CSHs à E10.5 ou si l'absence de détection est simplement liée à la technique utilisée, Medvinsky et Dzierzak ont isolé ces deux organes à E10.5 et les ont maintenus en culture organotypique durant 48h avant de tester leurs potentiels de reconstitution hématopoïétique respectifs. Ils ont ainsi pu montrer que contrairement au SV, l'AGM E10.5 contient des LT-CSHs (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Deux possibilités pouvaient expliquer cette différence de résultats : soit l'AGM E10.5 contient des pré-LT-CSHs capables de murer durant la phase de culture organotypique, soit la (ou les) LT-CSH présente dans l'AGM E10.5 est capable de proliférer en culture rendant ainsi sa détection possible. Le nombre de LT-CSHs de la région AGM E10-E11 est identique à

ceux du SV et du FF. Cependant, seule la région AGM est capable à ce stade de générer/amplifier *in vitro* un contingent de LT-CSHs, suggérant qu'*in vivo* les premières CSHs sont générées à E10.5 par la région AGM et qu'elles colonisent ensuite le SV et le FF. Il semblerait donc que les LT-CSHs détectées dans le SV à E11.5 proviennent des LT-CSHs de l'AGM E10.5. Il est à noter que le placenta constitue également une source potentielle de CSHs (voir §2.4).

Au moment de leur émergence dans l'aorte, les CSHs sont présentes au sein de bourgeonnements cellulaires visibles au niveau de la paroi ventrale du vaisseau qui sont nommés clusters. Cette notion de « cluster aortique » remonte au début du XX^{ème} siècle (Jordan, 1917). A l'époque, plusieurs équipes énoncent la présence de bourgeonnements de CHs (hémoblastes) en étroite association avec l'endothélium de la paroi ventrale de l'aorte de plusieurs vertébrés, incluant la chauve-souris (Stricht, 1899), le cochon (Emmel, 1916) et la mangouste (Jordan, 1917). Plus tard, des études histologiques ont révélé la présence de bourgeonnements cellulaires de ce type au niveau du plancher ventral de l'aorte d'autres espèces comme l'oiseau (Dieterlen-Lievre and Martin, 1981; Jaffredo et al., 1998), la souris (Garcia-Porrero et al., 1995; Wood et al., 1997), l'homme (Tavian et al., 1996) ou encore le xénope (Ciau-Uitz et al., 2000) (Figure 14).

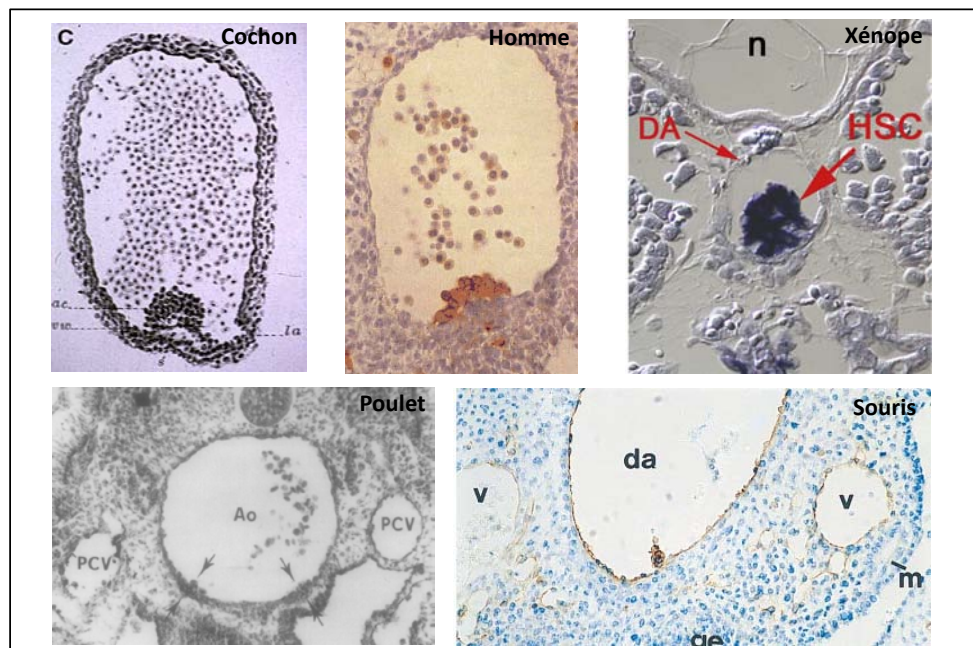


Figure 14 : Les clusters hématopoïétiques du plancher de l'aorte chez différentes espèces

Illustrations issues respectivement de : Emmel et al., 1916 ; Tavian et al., 1996 ; Ciau-Uitz et al., 2010 ; Dieterlen-Lievre et al., 1981 ; Wood et al., 1997.

Chez l'oiseau, la base d'un cluster est souvent constituée de cellules en forme de bouteille insérées entre les CE du pourtour de l'aorte (*Figure 15*).

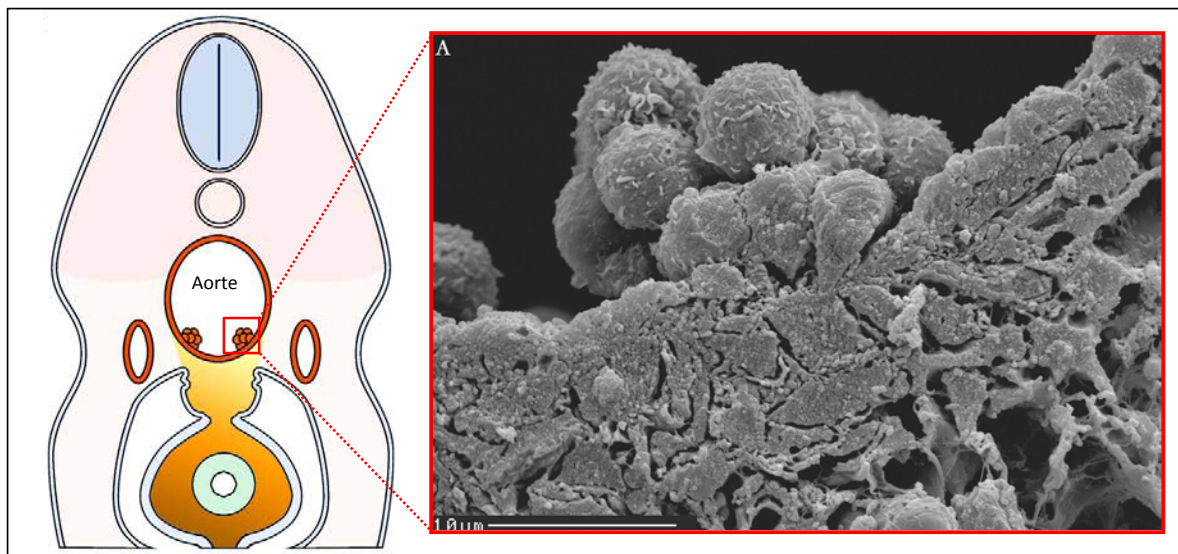


Figure 15 : Morphologie des cellules des clusters chez l'oiseau

Schéma d'une coupe d'embryon au moment de l'émergence des clusters aortiques qui bourgeonnent à partir de cellules endothéliales de la paroi ventrale de l'aorte. Visibles entre E10.5 et E11.5 chez la souris, ils sont très hétérogènes et sont constitués de CHs plus ou moins matures, incluant certaines CSHs définitives (photographie obtenue en microscopie électronique à balayage à partir d'une coupe d'embryon d'oiseau, C. Richard, thèse sur le rôle du mésenchyme aortique dans le contrôle de l'expression de Runx1 et des voies Notch et BMP au cours de l'hématopoïèse aortique).

Chez la souris, les artères ombilicale et vitelline possèdent également des clusters (de Bruijn et al., 2000; Mizuochi et al., 2012) qui sont environ deux fois plus gros que ceux de l'aorte dorsale (Yokomizo and Dzierzak, 2010). En effet, Zovein et al. ont montré que l'artère vitelline est remodelée à la mi-gestation et que lors de ce remodelage, des clusters de progéniteurs hématopoïétiques émergent sous forme de bourgeons extravasculaires pour former des structures similaires à celles trouvées au niveau des îlots sanguins du SV (Zovein et al., 2010). Quelle que soit leur localisation, ces « clusters » possèdent tous le même aspect et dans l'AGM, la majorité d'entre eux est localisée au niveau de la partie médiane de l'aorte (Mascarenhas et al., 2009). Ils sont visibles dès E9 dans l'artère vitelline (soit un jour après la formation de celle-ci), et entre E10.5 et E11.5 dans l'artère ombilicale et l'aorte dorsale. Au niveau du plancher ventral de cette dernière, les clusters sont observables en plus grande quantité à E10.5 qu'à E11.5. Ils expriment différents marqueurs endothéliaux (CD31, CD34, VeCad) et hématopoïétiques (CD41, ckit, CD45, Sca-1) et sont très hétérogènes puisqu'ils

contiennent des CSHs et des CHs immatures déjà engagées qui tendent à se détacher dans la lumière du vaisseau (Corbel and Salaun, 2002; de Bruijn et al., 2002; Fraser et al., 2003; Yokomizo and Dzierzak, 2010; Mizuochi et al., 2012). Il est également possible de visualiser des clusters dans la partie dorsale de l'aorte mais ceux-ci contiennent uniquement des précurseurs hématopoïétiques (Taoudi and Medvinsky, 2007). Ces clusters dorsaux sont visibles uniquement chez la souris et représentent 37% de la totalité des clusters observables dans la région AGM. La majorité d'entre eux se trouvant dans la région ventrale de l'aorte (Taylor et al., 2010), l'équipe de Dzierzak indique que la spécification des CSHs de l'AGM est un phénomène polarisé dû à des signaux inductifs spécifiquement ventraux tel que Hedgehog (Peeters et al., 2009). Cette polarisation avait déjà été annoncée chez l'oiseau (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993) et certains facteurs régulateurs tels que BMP et Hedgehog ont été étudiés chez l'homme (Marshall et al., 2000) et chez le poisson-zèbre (Wilkinson et al., 2009).

2.3 - Le foie foetal

Le FF, d'origine mésodermique et endodermique, constitue l'organe majeur d'amplification et de différenciation des CSHs embryonnaires. D'après les résultats des recherches actuelles, il n'est pas capable de produire des CSHs *de novo* et est simplement colonisé par les CHs circulantes d'origine extrinsèque à partir d'E10-E10.5 (28-32 somites) (Johnson and Moore, 1975; Houssaint, 1981). Le FF est colonisé par deux vagues successives de CHs : les premières établissent une connexion entre le SV et l'embryon via les vaisseaux vitellins et sont principalement enrichies en précurseurs hématopoïétiques primitifs et définitifs (§2.1). Puisque la MO n'est pas encore formée au moment où le FF commence à être colonisé, le premier rôle hématopoïétique du FF est de former des érythrocytes matures à partir des précurseurs primitifs et définitifs dérivés du SV pour pallier les besoins de l'embryon. Par opposition aux EryP-CFC du SV qui mûrissent en majorité dans la circulation sanguine, la totalité des précurseurs érythroïdes définitifs mûrissent dans les îlots érythroblastiques du FF et de la MO après la naissance (Palis, 2004; Chasis, 2006) (*Figure 16*).

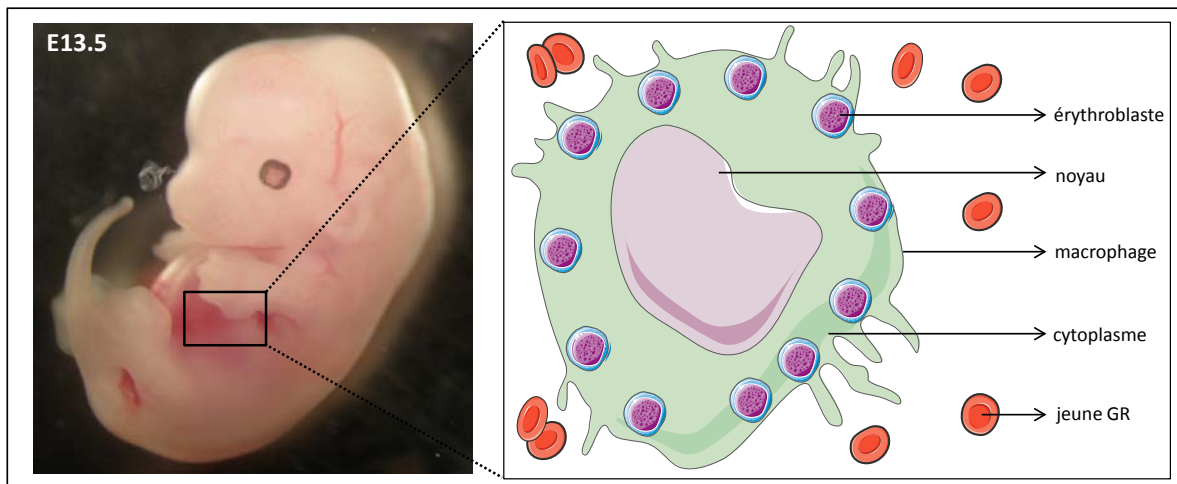


Figure 16 : Représentation schématique d'un îlot érythroblastique de foie fœtal E13.5

Les globules rouges sont produits dans le foie fœtal, d'où sa couleur rouge. La maturation des érythroblastes a lieu dans les îlots érythroblastiques. Chacun d'entre eux a un macrophage en son centre, en contact avec un anneau d'érythroblastes, globules rouges nucléés immatures. Abréviations utilisées : GR Globule Rouge. D'après Palis et al., 2004 et Chasis et al., 2006.

La seconde vague d'hématopoïèse du FF commence à E11.5 et correspond à des populations enrichies en progéniteurs hématopoïétiques/CSHs immatures provenant principalement de l'AGM (§2.2) et du PI (§2.4) via les vaisseaux ombilicaux, deuxième réseau vasculaire à être emprunté par les CHs. A ce stade, les CHs du FF sont capables de former *in vitro* des colonies BFU-E et CFU-E capables de proliférer durant plusieurs jours et de générer des cellules érythroïdes définitives. A E12.5, l'activité CFU-S du FF commence à pouvoir être détectée, moment où l'AGM ne possède pratiquement plus d'activité de la sorte. Entre E12.5 et E15.5, le nombre total de précurseurs hématopoïétiques définitifs/CSHs augmente de façon exponentielle dans le FF, doublant pratiquement chaque jour. La quantité de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes B augmente séquentiellement jusqu'à un stade proche de la naissance (Barker et al., 1969; Paige et al., 1984; Gunji et al., 1991). Quant au nombre de précurseurs lymphoïdes T, il atteint un pic à E13 (Ema et al., 1998) puis diminue. Enfin, le nombre de CSHs augmente fortement jusqu'à E16 (stade au cours duquel le FF en contient environ 1.600) puis diminue peu à peu (Morrison et al., 1995; Ema and Nakauchi, 2000; Gekas et al., 2005). Les résultats de Kurata et al. montrent qu'un petit nombre de précurseurs hématopoïétiques subsiste jusqu'à cinq semaines après la naissance (Kurata et al., 1998), corrélant avec les résultats de Taniguchi et al. qui avaient montré que le foie adulte contient des CHs immatures capables de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée (Taniguchi et al., 1996).

Les CSHs du FF ont été principalement caractérisées en comparaison avec leurs homologues nichées dans la MO adulte. Plusieurs études ont montré que les CSHs présentes dans le FF possèdent un très fort pouvoir prolifératif comparativement aux CSHs de la MO adulte (Micklethwait et al., 1972; Rebel et al., 1996a; Harrison et al., 1997). Toutefois, la fréquence de CSHs du FF E14.5 est comparable à celle de la MO adulte (Rebel et al., 1996b).

En admettant que la région AGM soit le seul site réel d'émergence de CSHs définitives et étant donné que l'AGM E12.5 n'est censée contenir que 3 CSHs définitives (Kumaravelu et al., 2002), il était malgré tout difficile d'expliquer le grand nombre de CSHs retrouvées au niveau du FF E14.5 uniquement par la vitesse de division cellulaire. Ainsi, tout comme cela a été fait pour le SV (§2.1), les recherches se sont penchées sur le cas du PI et de sa possible contribution à l'émergence/amplification des CSHs définitives.

2.4 - Le placenta

Le PI est un organe vital pour l'embryon puisqu'il constitue une barrière entre les environnements foetal et maternel. Il assure ainsi un grand nombre d'échanges materno-foetaux très régulés (Knipp et al., 1999) incluant notamment les fonctions alimentaire, pulmonaire, rénale et hépatique. Il est constitué de trois couches principales : une couche externe maternelle incluant des cellules déciduales de l'utérus et des vaisseaux sanguins maternels, une couche médiane rattachant le PI à l'utérus et contenant des cellules trophoblastiques foetales, et enfin une couche interne très vascularisée (regroupant labyrinthe et plaque chorionique, voir §2.4.1) permettant les échanges materno-foetaux (*Figure 17*). Ces échanges ont lieu dans le labyrinthe, région dans laquelle les CSHs sont connues pour résider (Ottersbach and Dzierzak, 2005). Des mutations affectant le développement de cette région très vascularisée du PI peuvent avoir de graves conséquences sur l'embryon, notamment un retard de croissance létal dès E10.5 (Watson and Cross, 2005). Grâce aux cellules trophoblastiques, le PI est également un organe endocrine sécrétant un grand nombre de facteurs de croissance et d'hormones nécessaires durant la période de gestation (Linzer and Fisher, 1999). Certaines de ces hormones sont connues pour leur influence sur la vascularisation placentaire (Ng et al., 1994; Ma et al., 1997). De plus, le PI est fortement impliqué dans la protection de l'embryon contre le système immunitaire maternel. Il résulte de la fusion de deux structures indépendantes qui apparaissent très précocément dans le développement embryonnaire : le chorion, issu du trophoctoderme qui est la couche la plus externe de l'embryon, et l'allantoïde, appendice mésodermique issu de l'épiblaste et émis par l'extrémité caudale de la ligne primitive au début de la gastrulation.

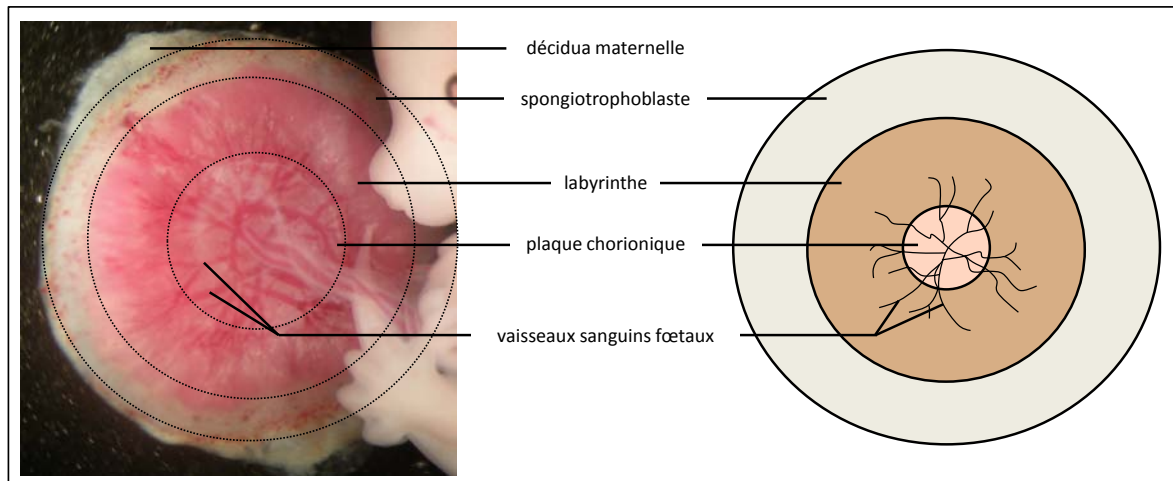


Figure 17 : Les différentes parties du placenta

La plaque chorionique contient de nombreux vaisseaux d'origine fœtale et le cordon ombilical est visible en son centre. Le labyrinthe, dans lequel résident les CSHs, résulte de la fusion de l'allantoïde et du chorion et entoure la plaque chorionique. Le tout est entouré d'une couche spongiotrophoblastique avec des cellules géantes trophoblastiques en périphérie (piqueté rouge). En extrême périphérie, on distingue la decidua maternelle recouvrant la totalité de la face non visible du placenta (illustration E14.5 à gauche ; d'après Ottersbach et al., 2005 à droite).

2.4.1 - Formation du placenta

Au stade E3.5, le trophoctoderme englobe à la fois la masse cellulaire interne (MCI), structure qui donnera naissance à l'embryon proprement dit, et une cavité nommée blastocèle (*Figure 18*). Par la suite, les cellules du trophoctoderme vont proliférer massivement. De ce fait, la partie du trophoctoderme en contact avec la MCI s'accroît en taille et donne naissance au cône ectoplacentaire à E6, tandis que l'autre partie devient à E7.5 le chorion, structure accolée au futur embryon. Quant à l'allantoïde, elle se forme à partir des cellules mésodermiques de la partie postérieure de l'embryon, de façon quasi-simultanée avec l'apparition du chorion. Le mot "allantoïde" provient du grec et signifie "en forme de saucisse", allusion à l'allure que prend cette structure au fur et à mesure de son élongation.

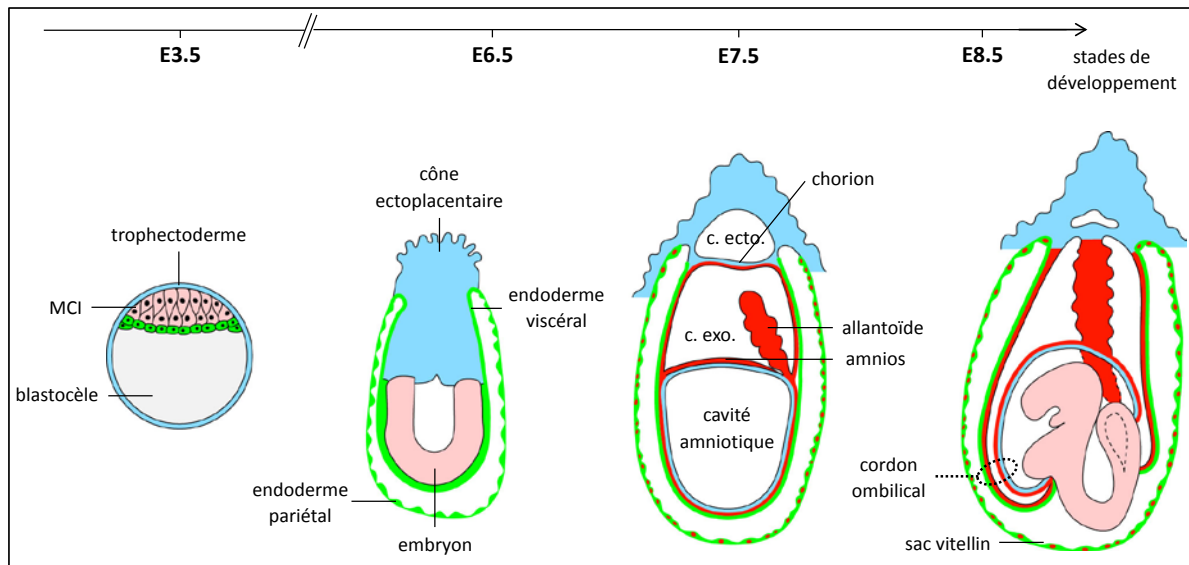


Figure 18 : Formation du placenta chez la souris

A E3.5, la MCI est entourée de trophodermes et de cellules endodermiques primitives. A E6, le trophodermes a permis la formation du cône ectoplacentaire. A E7.5, la plaque chorionique s'est formée et sépare le trophodermes de la cavité exocoelomique. L'allantoïde s'allonge à l'intérieur de cette cavité. A E8.75, l'allantoïde a fusionné avec le chorion, formant le placenta. Codes couleurs : en bleu l'ectoderme, en vert l'endoderme, en rose l'embryon. Abréviations utilisées : MCI Masse Cellulaire Interne, c. ecto. cavité ectoplacentaire, c. exo. cavité exocoelomique (d'après Dieterlen-Lièvre et al., 2010).

Ce phénomène d'élongation a pour but d'amener le bourgeon allantoïdien au contact du chorion et résulte de l'addition de trois processus distincts : l'ajout de nouvelles cellules au bourgeon allantoïdien à partir de la ligne primitive (Tam and Beddington, 1987; Downs and Bertler, 2000), la prolifération des cellules déjà ajoutées, et enfin une augmentation des espaces intercellulaires (phénomène nommé cavitation) particulièrement dans la région distale (Ellington, 1985). Durant l'élongation, deux types de cellules s'établissent dans l'allantoïde, à savoir une couche de cellules mésothéliales en périphérie et des cellules mésodermiques au centre. Parallèlement à ce phénomène, la région distale de l'allantoïde s'élargit dans le but de maximiser les contacts avec le chorion. Ainsi, l'élongation du bourgeon allantoïdien et l'élargissement de sa partie distale sont deux processus distincts nécessaires pour permettre la rencontre de l'allantoïde et du chorion aux alentours du stade E8.5 (entre 6 et 8 somites), simultanément avec les premiers battements cardiaques. Bien qu'aucune fusion cellulaire n'ait lieu à proprement parler, cette rencontre est nommée « fusion chorio-allantoïdienne ». Seules certaines cellules chorio-adhésives de l'allantoïde exprimant à leurs surfaces la molécule d'adhésion Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) sont impliquées (Gurtner et al., 1995; Kwee et al., 1995). Les cellules du chorion associées expriment le

récepteur intégrine $\alpha 4$, capable de se lier à VCAM1 (Yang et al., 1995). Cette fusion est très régulée et dépend avant tout de l'état de maturation de l'allantoïde (Downs and Gardner, 1995). L'association étroite de l'allantoïde et de l'endothélium maternel qui en résulte permet la formation du "labyrinthe", zone très dense du PI dans laquelle les endothéliums fœtal et maternel sont séparés seulement par deux couches de cellules syncytiotrophoblastiques dérivées du chorion. Le labyrinthe devient rapidement une zone très étendue entourant la « plaque chorionique », région rattachée au cordon ombilical. Le développement du labyrinthe est rendu possible grâce au spongiotrophoblaste, structure issue principalement de cellules du cône ectoplacentaire. Peu après la formation du bourgeon allantoïdien, son noyau de cellules mésodermiques entame un processus de vascularisation *de novo*, correspondant à l'engagement de ces cellules dans leur processus de différenciation (Drake and Fleming, 2000; Arora and Papaioannou, 2012). La vascularisation progresse de la partie distale vers la partie proximale du bourgeon, diffusant vers la partie la plus postérieure de la ligne primitive (Downs et al., 1998). Au même moment, la vasculogénèse a lieu dans les îlots sanguins du SV ainsi que dans la région cardiaque, et s'étend peu à peu vers la partie postérieure de la ligne primitive. Le cordon ombilical se forme lors de la rencontre de ces trois réseaux vasculaires distincts vers E8.5. La vascularisation de l'allantoïde aussi bien que son élongation nécessitent l'expression du gène Brachyury (Beddington et al., 1992; Inman and Downs, 2006). Quels que soient les mécanismes impliqués dans la formation du cordon ombilical, l'allantoïde constitue la principale voie de passage à travers laquelle le sang de l'embryon est amené au labyrinthe assurant ainsi, via le spongiotrophoblaste, les échanges vitaux nécessaires au développement de l'embryon (Figure 19). Ainsi, l'endothélium de l'artère ombilicale et de la veine ombilicale du cordon ainsi que celui des vaisseaux sanguins du PI dérivent de l'allantoïde. Les interactions entre les cellules trophoblastiques et les circulations maternelle et fœtale permettent le développement d'un réseau vasculaire très dense, se complexifiant petit à petit jusqu'aux abords de la naissance (E18.5-E19.5) (Adamson et al., 2002).

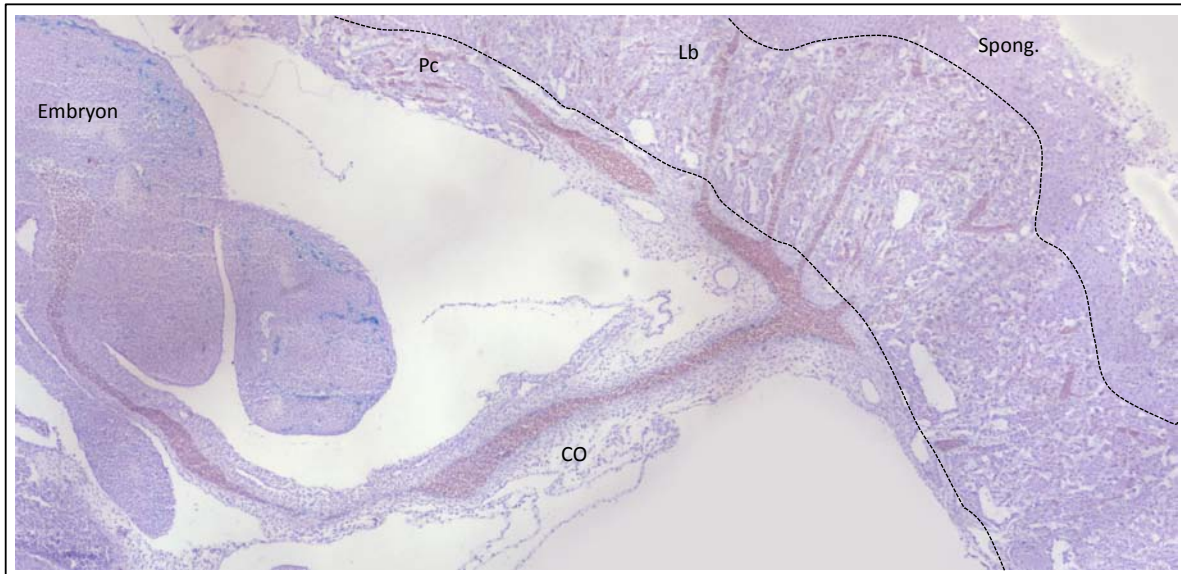


Figure 19 : Coupe d'embryon relié à son placenta à E12.5

Grâce au cordon ombilical, le sang de l'embryon est amené au labyrinthe via la plaque chorionique du placenta. A travers le spongiotrophoblaste, les échanges materno-fœtaux peuvent ainsi avoir lieu. Abréviations utilisées : CO Cordon Ombilical ; Pc Plaque Chorionique ; Lb Labyrinthe ; Spong. Spongiotrophoblaste.

2.4.2 - Activité hématopoïétique du placenta

A l'origine, le PI n'était pas considéré comme un organe hématopoïétique. Toutefois, à la lueur des résultats obtenus sur l'activité érythroïde primitive du SV, plusieurs études se sont penchées sur l'activité hématopoïétique du placenta, après fusion de l'allantoïde et du chorion. Il a fallu attendre les années 1960 avec les travaux de Dancis pour que soit suggérée une telle activité (Dancis, 1966; Dancis et al., 1966; Dancis et al., 1968). Les auteurs avaient montré que des cellules issues de PI C57Bl6 injectées dans des souriceaux nouveaux-nés BalbC induisaient la mort des organismes receveurs, et ils avaient conclu que le PI contenait des cellules immunitaires compétentes (Dancis et al., 1962). Ils avaient également montré que certaines cellules de PI possédaient un potentiel hématopoïétique *in vitro* et étaient capables de produire des cellules érythrocytaire, lymphocytaire et granulocytaire. Grâce à ces premiers résultats, des transplantations de suspensions placentaires ont été réalisées dans des souris anémiées, et le bénéfice thérapeutique de l'injection a permis de révéler le potentiel hématopoïétique du PI (Dancis et al., 1977). Deux ans plus tard, Melchers et al. ont montré que dès E9.5, certaines cellules du PI sont capables de se différencier *in vitro* en lymphocytes B et que ces précurseurs sont d'origine fœtale et non maternelle (Melchers, 1979). Par ailleurs, un pic du nombre de précurseurs lymphoïdes dans le PI E12.5 est observé, comparable à

celui retrouvé dans le foie 3 jours après la naissance. Par la suite, les greffes caille-poulet de Caprioli et al. ont montré que l'allantoïde d'oiseau possède également la capacité de produire des CHs (Caprioli et al., 1998). Un peu plus tard, l'équipe de Dieterlen affine l'étude du PI de souris en montrant qu'à E9.5, il possède des précurseurs multilignages très précoces (HPP-CFCs) (Alvarez-Silva et al., 2003) alors que ces derniers ne sont détectés dans le FF que 24h plus tard. De plus, le PI entre E12.5 et E17.5 est 2 à 4 fois plus enrichi en précurseurs myéloïdes précoces (CFU-GEMM et BFU-E) que ne l'est le FF.

Les études *in vivo* de Gekas et al. ont permis de comparer le nombre de LT-CSHs du PI à ceux des autres organes hématopoïétiques (Gekas et al., 2005). La présence de LT-CSHs est détectable entre E10.5 et E15.5 dans le PI, avec une augmentation significative de l'activité hématopoïétique entre E11.5 et E12.5, ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro* par Melchers et al.. Il est intéressant de noter que les CSHs apparaissent dans le PI avant de pouvoir être détectées dans le sang circulant (*Tableau 2*), ce qui suggère que l'origine des CSHs du PI est bien distincte de celle des CSHs circulantes. A E12.5, le nombre de CSHs du PI est de 50 et dépasse largement celui du sang circulant qui n'en contient que 2. Toutefois, la circulation sanguine étant déjà établie à ce stade du développement, il n'est pas exclu que ces CSHs proviennent d'autres sites hématopoïétiques plutôt que d'être produites par le PI lui-même. Il faut signaler que la région AGM contient très peu de CSHs (1 à 3 seulement, *Tableaux 1 et 2*), ce qui indique qu'elles s'amplifient ailleurs dans l'embryon. Comme le PI se trouve en aval de l'aorte dorsale, il est possible qu'après avoir émergé de l'AGM les CSHs passent par une phase d'amplification dans le PI avant de rejoindre le FF. De plus, étant donné que les CHs immatures du SV passent par les vaisseaux ombilicaux pour rejoindre le FF, il est logique de faire l'hypothèse que ce même réseau vasculaire puisse être emprunté par les CSHs dérivées de l'AGM dans le but d'aller s'amplifier dans le PI. A E13.5, la quantité de CSHs dans le PI est maintenue mais diminue fortement par la suite, tandis que celle du FF ne cesse d'augmenter jusqu'à E15.5 (*Figure 20*). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'évolution cinétique des CSHs du PI est unique et n'est pas retrouvée dans les autres organes hématopoïétiques embryonnaires.

A	nombre de LT-CSHs	p-SP/AGM	Foie foetal	Sac vitellin	Sang circulant
	E10	~0	0	0	0
	E11	~0.9	~0.7	~1.1	~0
	E12	~2.7	~53	~1.8	~3.1
	E13	~0.8	~260	~0.8	~5.9

B	nombre de LT-CSHs	p-Sp/AGM	Foie foetal	Placenta	Sac vitellin	Sang circulant
	E10.5	0.107	ND	0.103	0.107	0
	E11	0.306	0.05	0.48	0.13	0
	E11.5	2	3.3	2.5	2.1	0.6
	E12.5	3.3	93.3	50	3.8	1.3
	E13.5	~3	~500	~48	~7	~1

Tableaux 1 et 2 : Nombre de LT-CSHs par organe entre E10.5 et E13.5 obtenus après reconstitution hématopoïétique compétitive

(A) Kumaravelu et al., 2002. Résultats obtenus plus de 3.5 mois après transplantation. (B) Gekas et al., 2005. Résultats obtenus 10-12 semaines après transplantation. Abréviations utilisées : CSH Cellule Souche Hématopoïétique, LT Long Term-, p-Sp Splanchnopleure Para-aortique.

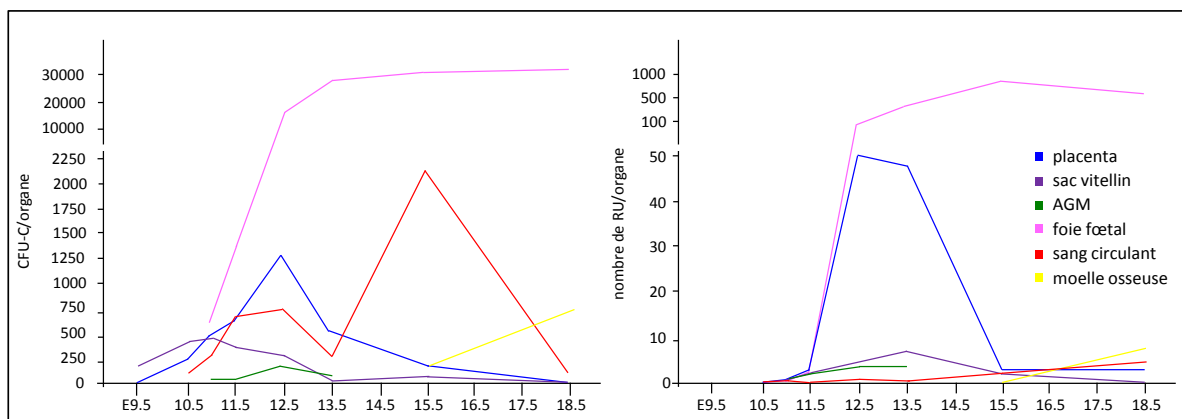


Figure 20 : Évolution cinétique de la quantité de précurseurs hématopoïétiques et de CSHs au cours du développement embryonnaire

Résultats obtenus après tests clonogéniques (à gauche) ou après tests de reconstitution hématopoïétique (à droite) (d'après Gekas et al., 2005).

Ainsi, le PI serait une niche transitoire où migrent les CSHs/précurseurs hématopoïétiques ayant émergé de l'aorte dorsale dans le but de s'amplifier avant de coloniser le FF. Quant à l'hypothèse selon laquelle le PI serait un réel site d'émergence de CSHs et pas seulement une niche transitoire d'amplification, plusieurs éléments de réponse ont été apportés grâce aux études réalisées sur le chorion et l'allantoïde, avant la mise en place de la circulation sanguine.

Les travaux de Downs et al. ont montré que la néo-vascularisation de l'allantoïde au stade 6 somites ne s'accompagne pas d'érythropoïèse primitive (Downs and Harmann, 1997; Downs et al., 1998; Downs et al., 2001; Downs, 2006). Par ailleurs, deux équipes ont travaillé sur l'hypothèse selon laquelle le PI puisse être une source de CHs/CSHs définitives (Zeigler et al., 2006; Corbel et al., 2007). Les auteurs ont réalisé des cultures d'explants à partir d'allantoïdes et/ou de chorions isolés avant leur fusion et avant la formation du cordon ombilical. Les résultats montrent que ces deux organes pris séparément possèdent une activité hématopoïétique définitive et que ce potentiel n'est pas lié à leur union. De plus, l'équipe de Speck a montré que contrairement aux explants sauvages, les explants déficients pour le gène *Runx1* sont incapables de former des CHs après avoir été ensemencées sur cellules OP9, suggérant une implication forte de l'expression de ce gène dans le potentiel hématopoïétique des explants (voir §5.1) (Zeigler et al., 2006).

Deux modèles de souris transgéniques ont également permis d'étudier le PI en tant que potentiel site d'émergence de CSHs : les souris *Runx1-lacZ* et *Ncx1^{-/-}*. Des cultures d'explants de PI issus d'embryons *Ncx1^{-/-}* dépourvus de circulation sanguine ont permis de montrer que le PI est capable de produire des cellules myéloérythroïdes et lymphoïdes (B et T), preuve que certaines cellules placentaires possèdent un potentiel hématopoïétique multilignage, une des deux propriétés principales des CSHs (Rhodes et al., 2008). Même en absence de circulation, des cellules de PI exprimant le marqueur CD41 (exprimé à la surface des CSHs précoces) semblent émerger dans la lumière des gros vaisseaux sanguins à E10, rappelant le processus d'émergence des clusters aortiques. Malheureusement, les embryons *Ncx1^{-/-}* meurent à E10.5 ce qui rend impossible l'étude du potentiel de reconstitution hématopoïétique de ces cellules dans un organisme adulte. Les cellules de ces clusters placentaires expriment *Runx1* (Ottersbach and Dzierzak, 2005) et sont plus actives au niveau mitotique que les cellules *Runx1⁺* des clusters aortiques, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle le réseau vasculaire du labyrinthe est un lieu d'amplification hématopoïétique. Les cellules *Runx1⁺* du PI sont situées dans la plaque chorionique et le labyrinthe. Certaines CE du labyrinthe sont marquées ainsi que des cellules des clusters au sein des vaisseaux. Comme dans l'aorte, plusieurs cellules sous les vaisseaux expriment également *Runx1*. Les clusters hématopoïétiques placentaires sont observables entre E10.5 et E12.5 et ont été plus finement analysés par l'équipe de Sugiyama (Sasaki et al., 2010). Les

auteurs montrent d'une part qu'ils sont absents dans les PI $Runx1^{-/-}$ et d'autre part qu'ils possèdent le phénotype $CD31^+CD34^+ckit^+$, exprimé également par les CHs des clusters aortiques. Dans les clusters placentaires, l'expression des marqueurs CD41 et CD45 n'apparaît qu'à E11.5.

2.5 - Organes hématopoïétiques définitifs : thymus, rate et moelle osseuse

A partir d'E15.5, la fréquence de CSHs présentes dans le FF commence à diminuer (Morrison et al., 1995). Cette diminution s'explique par la migration progressive des CHs/CSHs du FF vers les organes hématopoïétiques définitifs que sont le thymus, la rate et enfin la MO, lieu de résidence définitif des CSHs adultes. Ces trois organes possèdent des microenvironnements particuliers dans lesquels ont respectivement lieu la différenciation lymphocytaire T, la différenciation lymphocytaire B et le maintien/différenciation des CSHs.

Le thymus

Les CHs capables de coloniser le thymus sont présentes dans le sang circulant plusieurs jours avant le début de la colonisation thymique : le départ de cette colonisation est dépendant du degré de maturation de l'épithélium thymique qui acquiert une certaine réceptivité aux précurseurs lymphoïdes à un stade précis du développement. Ceci se fait par un mécanisme chimiotactique résultant de la production de chimiokines attractives par l'épithélium thymique. Deux équipes ont montré que le rudiment thymique est colonisé par des précurseurs lymphoïdes à partir d'E10.5 (Owen and Ritter, 1969; Fontaine-Perus et al., 1981). Durant les jours qui suivent, la colonisation du thymus s'accélère et les premiers lymphocytes matures apparaissent à E15. Des transplantations de thymus E12-E16 montrent l'existence d'une deuxième vague de colonisation thymique. Les CHs matures qui en découlent sont les seules qui vont subsister dans le thymus par la suite (Ritter, 1978; Mathieson and Fowlkes, 1984).

La rate

A défaut de pouvoir générer des CSHs, la rate est colonisée par des CHs circulantes en provenance du FF. Le microenvironnement de la rate supporte la différenciation hématopoïétique mais contrairement au FF, il n'est pas capable d'amplifier un contingent de CHs (Bertrand et al., 2006). Les premières CHs à coloniser la rate sont multipotentes (progéniteurs lymphomyéloïdes) et sont détectables à partir d'E12.5-E13 (Godin et al., 1999). A E15.5, plus de 1.000 progéniteurs par rate

sont présents. Les travaux de Christensen et al. montrent, par le biais d'expériences de reconstitution hématopoïétique, que les LT-CSHs sont détectables à partir d'E14.5 (Christensen et al., 2004). L'activité hématopoïétique de la rate augmente ensuite quotidiennement jusqu'à E17.5 et reste détectable jusqu'à 2 semaines après la naissance. En coopération avec le FF et la MO, la rate joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique (Wolber et al., 2002).

La moelle osseuse

La colonisation hématopoïétique de la MO débute à E15.5 pour les progéniteurs et E17.5 pour les CSHs (Delassus and Cumano, 1996; Christensen et al., 2004). Comme nous l'avons vu pour le thymus, les CSHs sont présentes dans la circulation plusieurs jours avant le début de la colonisation de la MO, suggérant que le microenvironnement osseux doit avoir atteint un certain niveau de maturation avant d'être capable d'attirer et d'accueillir les CSHs. Une cascade d'interactions chimiotactiques gouvernent la migration des progéniteurs/CSHs vers la MO. La chimiokine Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) aussi appelée CXCL12, semble jouer un rôle particulièrement important (voir Chapitre V). Les souris déficientes pour SDF-1 ou pour son récepteur CXCR4 (Chemokine Receptor type 4) ne parviennent pas à établir d'activité hématopoïétique dans la MO bien que le FF se développe normalement (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998; Ara et al., 2003). De plus, il a été montré que les CSHs de la MO migrent sélectivement *in vitro* en réponse à SDF-1 (Wright et al., 2002). Chez l'homme, une étude a montré qu'en réponse à SDF-1, les cellules de MO CD34⁺ injectées dans des souris létalement irradiées ont un potentiel de reconstitution hématopoïétique augmenté (Plett et al., 2002). Ainsi, SDF-1 joue un rôle important à la fois en tant que chimiokine (Imai et al., 1999), en tant qu'activateur des molécules d'adhésion des CSHs (Peled et al., 1999; Peled et al., 2000) et en tant que molécule impliquée dans le maintien des CSHs embryonnaires une fois arrivées à proximité d'une niche hématopoïétique (Kawabata et al., 1999; Ma et al., 1999).

2.6 - La mise en place de l'hématopoïèse humaine

Plusieurs aspects du développement hématopoïétique de la souris sont conservés chez l'homme (*Figure 21*). Les CSHs humaines ont été largement étudiées chez le nouveau-né et l'adulte par le biais de transplantations dans des souris immunodéficientes (Larochelle et al., 1996; Conneally et al., 1997; Wang et al., 1997), mais beaucoup moins chez l'embryon. Malgré les difficultés actuelles pour réaliser des recherches sur l'embryon humain, plusieurs équipes ont étudié les CSHs de l'AGM, du FF

et du PI à la fois *in vitro* par des tests LTC-IC, et *in vivo* par le biais de reconstitutions hématopoïétiques dans la souris NOD-SCID.

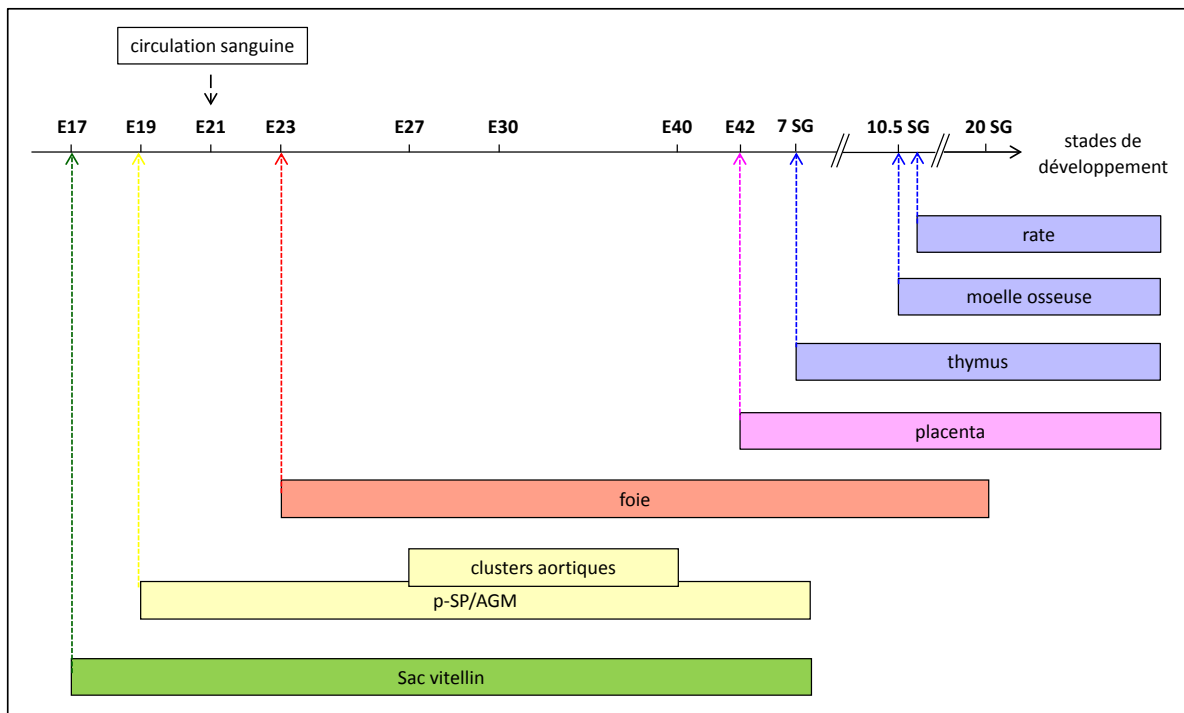


Figure 21: Mise en place du système hématopoïétique dans l'embryon humain

Les 1^{ères} CHs apparaissent dans le SV dès E17. Dès E19, des précurseurs hématopoïétiques sont retrouvés dans la région aortique. Le foie est colonisé à partir d'E23 et son activité hématopoïétique décline à partir de 20 SG. Les CHs sont détectables dans le placenta à partir d'E42 et le restent jusqu'au terme, contrairement au placenta de souris. Le thymus, la rate et la moelle osseuse sont colonisés en dernier.

Le sac vitellin

Comme chez la souris, l'hématopoïèse humaine débute avec une première vague de CHs primitives apparaissant avant la mise en place de la circulation sanguine au niveau des îlots sanguins du SV, visibles entre E17-E18 et E24 (Luckett, 1978; Tavian et al., 1999). Cette population hématopoïétique est transitoire puisqu'elle ne contient que des progéniteurs à potentiel érythromyéloïde. Toutefois plusieurs types de CHs sont détectables dans le SV plus tard dans le développement, et entre E25 et E50, le SV contient des CHs immatures capables de former des colonies myéloïdes et érythroïdes *in vitro* (Dommergues et al., 1992; Huyhn et al., 1995), suggérant qu'il possède encore une activité hématopoïétique *in vivo* à cette période du développement embryonnaire. La fréquence de ces

précurseurs reste constante entre E35 et E50 mais plus aucune activité hématopoïétique n'est détectable après E60.

La région aortique

Contrairement au SV, la région aortique contient des CHs à potentiel multilignage (lymphoïde et myéloïde) et ces cellules ont dans un premier temps été caractérisées *in vitro*. Dès 28 jours de développement, l'embryon contient des progéniteurs granulomacrophagiques capables de former des colonies hématopoïétiques lors de tests clonogéniques (Coulombel et al., 1995) et ces progéniteurs sont CD34⁺ (Huyhn et al., 1995). Les travaux de Tavian et al. montrent que ces progéniteurs hématopoïétiques intra-embryonnaires sont accolés à la paroi ventrale de l'aorte (Tavian et al., 1996) et peuvent produire des CHs pendant 4 à 5 semaines lorsqu'ils sont cocultivés sur un tapis de cellules stromales Sys-1 issues de MO murine adulte (Tavian et al., 1999). Cette population présente un profil phénotypique (Lin⁻CD45⁺CD34⁺CD31⁺ckit⁺CD38⁻) et moléculaire (GATA-2⁺GATA-3⁺c-myb⁺Scf⁺flk1⁺) caractéristique des CSHs (voir Chapitre 5) (Tavian et al., 1996; Labastie et al., 1998). Les auteurs montrent que les clusters aortiques sont visibles entre 27 et 40 jours de développement, apparaissant environ 2-3 jours avant l'apparition de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ dans le FF. Grâce à des cultures d'explants suivies de cocultures sur cellules MS5, l'équipe de Péault montre que des progéniteurs hématopoïétiques sont détectables dans la splanchnopleure para-aortique dès E19 (Tavian et al., 2001). Contrairement aux CHs immatures du SV qui ne peuvent produire que des cellules myéloïdes, la p-Sp contient également des cellules capables de produire des CHs lymphoïdes. Tout comme chez la souris et l'oiseau, ces CHs immatures sont restreintes à la région aortique de l'AGM. Ce n'est qu'en 2011 avec les travaux d'Ivanovs et al. que le potentiel hématopoïétique de ces cellules a été testé *in vivo*. Les auteurs montrent par le biais de reconstitutions hématopoïétiques que l'AGM humaine est un site d'émergence de CSHs définitives entre E35 et E44. Une seule CSH d'AGM a la capacité de produire pas moins de 300 CSHs sur une période de 8 mois (Ivanovs et al., 2011).

Le foie

La transition hématopoïétique entre le SV et le foie avait été étudiée à l'origine par l'analyse du type d'hémoglobine (Hb) synthétisée par les CHs. La transition Hb embryonnaire (ζ , ϵ) - Hb fœtale (α , γ) reflète la transition érythropoïèse primitive - érythropoïèse définitive (Peschle et al., 1984; Peschle et al., 1985). Cette hypothèse a également été suggérée par l'analyse *in vitro* de CFC issues de cellules de SV et de foie (Migliaccio et al., 1986). Durant la 5^{ème} Semaine de Gestation (SG), le nombre de

BFU-E issues du SV diminue très fortement tandis que les précurseurs hématopoïétiques qui en sont à l'origine augmentent en nombre dans le parenchyme du foie. Les auteurs suggèrent alors que des précurseurs hématopoïétiques du SV migrent dans le parenchyme du foie via la circulation sanguine. A la fin du premier trimestre, des CHs plus immatures telles que des CFU-GEMM peuvent être mises en évidence (Hann et al., 1983). En comparant le potentiel hématopoïétique *in vitro* des cellules de foie du deuxième trimestre avec celui des cellules de MO, Nicolini et al. montrent que les LTC-IC du foie produisent plus de CFC que les LTC-IC de la MO et que la plupart de ces CFC sont érythroïdes, résultats qui se confirment également *in vivo* (Nicolini et al., 1999). Toutefois, l'équipe de Péault observe sur coupes histologiques des progéniteurs érythromyéloïdes CD34⁺CD45⁺ dès E23, suggérant que la première vague de colonisation du foie débute à un stade plus précoce qu'initialement pensé (Tavian et al., 1999). Les auteurs indiquent également que les premiers progéniteurs hématopoïétiques/CSHs CD34⁺CD45⁺ arrivent dans le foie à partir d'E30, stade correspondant au début de la deuxième vague de colonisation du foie. Toutefois, ce n'est qu'après E32 qu'il est possible de maintenir en culture à long terme des précurseurs primitifs du foie. Plusieurs populations enrichies en CSHs ont été caractérisées dans cet organe. Les résultats de Plum et al. indiquent que la population CD34^{hi} de foie à 12SG est capable de se différencier en lymphocytes T lorsqu'elle est cultivée sur un stroma de thymus de souris immunodéficientes (Plum et al., 1994). Quelques années plus tard, Roy et al. montrent qu'entre 7 et 14 SG, les CSHs du foie possèdent le phénotype CD34^{hi}CD38⁻HLA-DR⁺ (Human Leukocyte Antigen-DR, récepteur membranaire du CMH II) (Roy et al., 1997). Les travaux *in vitro* et *in vivo* d'Oberlin et al. ont permis la caractérisation d'une nouvelle population particulièrement enrichie en CSHs qui possède le phénotype CD34⁺CD144⁺CD45⁺ entre 7 et 8 SG (Oberlin et al., 2010b). En 2012, les travaux de Sinka et al. indiquent qu'entre 7 et 22 SG, les CSHs du foie sont contenues dans la population CD34⁺CD45⁺ACE⁺ (Angiotensine Converting Enzyme) (Sinka et al., 2012). Le stade au cours duquel l'hématopoïèse n'est plus présente dans le foie n'est pas connu. Toutefois, l'ensemble des études effectuées jusqu'à présent sur le foie montre qu'après 20 SG, le foie n'est plus hématopoïétique (Tavian and Peault, 2005a; Tavian and Peault, 2005b).

Le placenta

Étant donné que le PI murin précoce est capable de générer *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques et qu'il contient de nombreuses CSHs à E12.5, les recherches se sont naturellement portées sur le PI humain en tant que potentielle source de progéniteurs hématopoïétiques/CSHs. Deux études récentes ont apporté certains éléments de réponse par le biais d'expériences à la fois *in vitro* et *in vivo*. A la lumière des travaux de Barcena et al. montrant que le PI

humain possède des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ dès 8 SG (Barcena et al., 2009a; Barcena et al., 2009b), l'équipe de Dzierzak a étudié le potentiel hématopoïétique du PI à des stades plus précoces du développement embryonnaire (Robin et al., 2009). Les auteurs montrent que des cellules à potentiel multilignage sont détectables *in vitro* et *in vivo* dès 6 SG soit bien après que l'AGM ait commencé à produire des CSHs. L'activité hématopoïétique du PI se maintient au cours des premier et deuxième trimestres de grossesse. Les CHs immatures détectées proviennent de l'embryon, sont en partie dérivées de l'endothélium et à partir de 15 SG, elles expriment toutes le marqueur CD34. De façon surprenante et contrairement au PI murin, le PI humain à terme possède encore une activité hématopoïétique, ce qui ouvre la possibilité d'utiliser les CHs immatures qu'il contient à des fins thérapeutiques.

Contrairement aux résultats de Robin et al., Ivanovs et al. montrent en 2011 que le PI humain n'acquiert une activité hématopoïétique qu'à 15 SG. Les auteurs discutent autour de deux explications. Les souris qu'ils ont utilisées pour les expériences de reconstitution hématopoïétique sont des souris NOD-SCID- γ c^{null}, contrairement à l'équipe de Dzierzak qui a utilisé des souris NOD-SCID. Or, les souris NOD-SCID sont moins réceptives aux CSHs humaines que ne le sont les souris NOD-SCID- γ c^{null} (McDermott et al., 2010). Ayant analysé le potentiel de reconstitution des cellules de PI entre 6 et 8 SG par PCR haut débit, Robin et al. détectent 1 cellule humaine parmi 100.000 cellules murines. En absence de confirmation par cytométrie en flux, il n'est pas exclu que certaines cellules non hématopoïétiques de placenta aient persisté dans l'organisme receveur. Ivanovs et al. suggèrent ainsi que le PI humain est simplement un organe hématopoïétique colonisé par les CSHs. Il est probable que les CSHs du PI humain soient comparables à celles du sang de cordon ombilical. Les recherches sur le PI humain se portent également sur l'étude des facteurs responsables de l'amplification des CSHs. De tels facteurs pourraient permettre d'amplifier un contingent de CSHs *ex vivo* pour les utiliser ensuite dans le cadre de thérapies.

Les organes hématopoïétiques définitifs

Le thymus est colonisé par les premiers précurseurs T entre 7 et 8,5 SG (Haynes et al., 1988). En ce qui concerne la rate, deux études ont montré dans un premier temps qu'elle reçoit ces premières CHs entre la 18^{ème} et la 19^{ème} SG (Hann et al., 1983; Vellguth et al., 1985). Toutefois, une étude plus récente suggère que les premiers érythrocytes sont présents entre 11 et 12 SG (Steiniger et al., 2007). La MO, principal organe hématopoïétique chez les mammifères adultes, commence à être colonisée alors que l'hématopoïèse du SV s'est déjà éteinte et que celle du foie est encore présente. Par des approches immunohistochimiques, Charbord et al. ont étudié l'établissement de

l'hématopoïèse dans les cavités médullaires qui débute au cours de la 11^{ème} SG (Charbord et al., 1996). Les auteurs indiquent que les CHs myéloïdes CD15⁺ sont les premières à se différencier, suivies de près par les érythrocytes. D'après les résultats *in vitro* et *in vivo* de l'équipe de Péault, les CSHs de la MO entre 18 et 24 SG possèdent le phénotype Thy-1⁺Lin⁻CD34⁺ (Baum et al., 1992).

CHAPITRE III - LE DÉROULEMENT DE L'HÉMATOPOÏÈSE CHEZ LES AUTRES ESPÈCES

3.1 - La drosophile

Chez les insectes, plusieurs types de CHs, appelées hémocytes, sont présents dans la circulation sanguine désignée par le terme hémolymphe. Toutefois, comparé à la complexité des lignages hématopoïétiques des vertébrés, le système hématopoïétique de la drosophile est bien plus simple puisqu'il n'est composé que de trois types de CHs différenciées (plasmacytes, cellules à cristaux et lamellocytes) apparentés aux cellules de la lignée myéloïde. La mise en place de l'hématopoïèse chez la drosophile partage plusieurs points communs avec celle des vertébrés, incluant des voies de signalisation, des facteurs de transcription régulant la spécification, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques issus du mésoderme, ainsi que la présence d'hémangioblastes (voir §4.1) (Mandal et al., 2004). Étant donné ces points communs, l'étude moléculaire et génétique de l'hématopoïèse de la drosophile permet d'améliorer les connaissances actuelles sur la niche hématopoïétique aussi bien chez la drosophile que chez les mammifères (Crozatier and Vincent, 2011; Pannetier et al., 2012). Néanmoins, il est également intéressant de noter les différences ces deux systèmes. Alors que le transport de l'oxygène est assuré par les érythrocytes chez les vertébrés, les insectes présentent une respiration trachéenne qui n'implique pas les hémocytes. L'oxygène est transporté directement aux cellules par le système trachéal qui présente de très nombreuses ramifications. Le développement de la drosophile comprend quatre stades distincts (embryon, larve, puppe et adulte) et chacun d'entre eux est rattaché à une composition hématopoïétique spécifique (*Figure 22*). Les plasmacytes et les cellules à cristaux sont présents dans la circulation (hémolymphe) dès le stade embryonnaire, alors que les lamellocytes n'apparaissent qu'au stade larvaire. Les plasmacytes sont les seuls hémocytes à subsister chez l'adulte, stade au cours duquel le flux de l'hémolymphe dans l'organisme est assuré par les contractions rythmiques du vaisseau dorsal, l'équivalent du cœur chez les vertébrés. Bien qu'aucune CSH n'ait été identifiée chez la drosophile, les hémocytes dériveraient de précurseurs hématopoïétiques immatures, comparables à ceux des vertébrés et nommés prohémocytes, capables de donner naissance à l'ensemble des cellules sanguines présentes dans l'hémolymphe (Hartenstein, 2006).

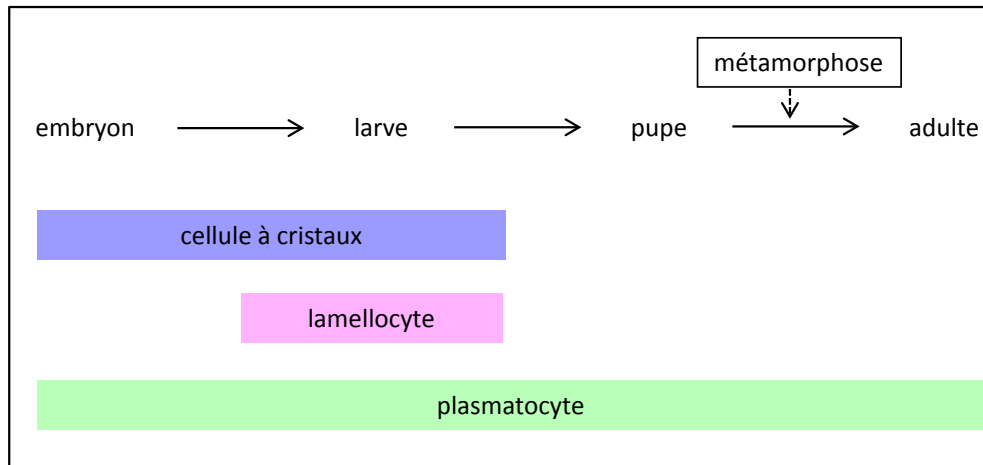


Figure 22 : Les hémocytes au cours du développement de la drosophile

Trois types de CHs différenciées sont présents chez la drosophile et chaque stade de développement est rattaché à une composition hématopoïétique spécifique : les plasmatoocytes se différencient en macrophages servant à phagocyter les microbes et les corps apoptotiques ; les lamellocytes encapsulent les agents infectieux trop gros pour être phagocytés ; les cellules à cristaux sont impliquées dans le processus de mélanisation et de cicatrisation.

3.1.1 - Les cellules hématopoïétiques

Les plasmatoocytes et la phagocytose. Formés en premier lieu par le mésoderme antérieur de la tête, les plasmatoocytes sont des cellules rondes très mobiles de 8-10 μm de diamètre qui prédominent à tous les stades du développement puisqu'ils représentent 90% à 95% des hémocytes circulants. De façon comparable aux macrophages des vertébrés, ils contiennent de nombreux lysosomes, phagosomes (vacuoles de phagocytose) et corps de résorption qui traduisent une activité phagocytaire importante. Ainsi, ces cellules assurent l'élimination des microorganismes et des cellules apoptotiques durant toute la vie de l'insecte (Wood and Jacinto, 2007) : dans l'embryon, ils ingèrent les corps apoptotiques formés durant le développement précoce ; dans la larve et l'adulte, ils sont responsables de la phagocytose des bactéries et des champignons ; dans la pupa, ils jouent un rôle fondamental dans la phagocytose des cellules condamnées au cours de la métamorphose. Par ailleurs, ils sont capables de générer des peptides antimicrobiens lors d'une infection (Dimarcq et al., 1997; Basset et al., 2000) ainsi que des protéines de la matrice extra-cellulaire telles que la *tiggrine* (Fogerty et al., 1994), la *peroxidasine* (Nelson et al., 1994), la *papiline* (Kramerova et al., 2003), ou encore deux molécules de type collagène, *Dcg1* (*Drosophila Collagen Gene 1*) et *Viking* (Fessler and Fessler, 1989; Yasothornsrikul et al., 1997), ce qui leur confère un rôle important dans le remodelage des tissus. Enfin, deux études suggèrent que les plasmatoocytes sont également

impliqués dans l'envoi de signaux à distance en réponse à une infection (Agaisse et al., 2003; Irving et al., 2005). *Croquemort* (voir §3.1.2) (Franc et al., 1996), le marqueur *P1* (Asha et al., 2003), et *Eater* (Kocks et al., 2005) sont utilisés pour l'identification des plasmatoctes.

Les cellules à cristaux et la mélanisation. Les cellules à cristaux sont produites durant les stades embryonnaire et larvaire mais leur rôle dans l'embryon n'est pas connu (Wood and Jacinto, 2007). Elles représentent 5% des hémocytes et ne sont pas retrouvées chez l'adulte (Lanot et al., 2001). Ces cellules sont un peu plus larges que les plasmatoctes (10-12 μm de diamètre) et tirent leur nom des inclusions paracrystallines qu'elles renferment dans leur cytoplasme (Rizki and Rizki, 1959; Brehelin, 1982), contenant notamment des prophénoloxydases (PPO) qui sont des enzymes nécessaires à la mélanisation, réaction de défense spécifique des insectes en réponse à une blessure ou à une invasion par un pathogène (De Gregorio et al., 2002; Ramet et al., 2002; Theopold et al., 2002; Bidla et al., 2005). De nature fragile, les cellules à cristaux sont capables de se rompre facilement et de déverser leur contenu dans l'hémolymphe où la PPO est clivée en phénoloxydase, sa forme active, qui va pouvoir oxyder les phénols en quinones (Meister, 2004). Les quinones polymérisent ensuite en mélanine qui va former un dépôt de pigment noir au niveau de la blessure ou sur la capsule en formation (voir § lamellocytes). Le processus de mélanisation libère des produits très toxiques pour les microorganismes, tels que le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique qui vont participer à la destruction des pathogènes.

Les lamellocytes et l'encapsulation. Les lamellocytes sont de larges cellules (15-40 μm de diamètre) de forme aplatie et adhérentes. Leur cytoplasme renferme très peu d'organites exceptés de nombreux ribosomes libres (Brehelin, 1982; Lanot et al., 2001). Présentes uniquement au cours du stade larvaire, ces cellules sont capables de former plusieurs couches cellulaires autour des corps étrangers trop larges pour être phagocytés par les plasmatoctes, processus nommé encapsulation. Les lamellocytes sont rarement observés dans la larve saine mais sont produits en très grand nombre en cas d'infections spécifiques telles que celle de la guêpe *Leptopilina boulardi* qui pond ses œufs dans les larves de drosophile. La capsule formée par les lamellocytes est ensuite mélanisée, ce qui crée un environnement cytotoxique pour le corps étranger (Vass and Nappi, 2000). Une fois mort, celui-ci restera dans la larve puis dans l'adulte sous la forme d'un corps inerte. Les lamellocytes peuvent être identifiés grâce à l'expression d'un gène rapporteur *misshapen-lacZ* (Braun et al., 1997), de *L1* (Asha et al., 2003) ou encore d' α -PS4 (Crozatier et al., 2004; Irving et al., 2005).

3.1.2 - Déroulement de l'hématopoïèse.

Comme pour les vertébrés, l'hématopoïèse de la drosophile se déroule en deux vagues successives. La première survient lors du stade embryonnaire au cours duquel 700 prohémoctes (Tepass et al., 1994) et 30 cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000) sont produits par le mésoderme pro-encéphalique de la tête. Une fois la circulation établie, les plasmatocytes migrent à travers l'embryon. Il est intéressant de noter que tous les plasmatocytes produits lors de cette première vague ne dégénèrent pas durant le stade larvaire et certains sont encore détectables chez l'adulte (Holz et al., 2003). Au cours de leur migration, les prohémoctes commencent leur différenciation en hémoctes (plasmatocytes) puis en macrophages. La présence de cellules apoptotiques dans l'embryon déclenche cette différenciation. L'expression de *Croquemort*, membre de la famille des récepteurs CD36 des vertébrés, confère aux hémoctes circulants leur activité phagocytaire et active leur différenciation en macrophages (Franc et al., 1996). La deuxième vague d'hématopoïèse débute au cours du stade larvaire au sein d'un organe spécialisé nommé glande de la lymphe, organe dérivé du mésoderme et composé de deux à sept paires de lobes étroitement associés au vaisseau dorsal (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010). La partie antérieure de ce vaisseau constitue l'aorte alors que la partie postérieure constitue le cœur. Considéré comme la source majeure d'hémoctes, ce site hématopoïétique correspondrait à l'AGM des vertébrés. Au stade puppe, il disparaît et relargue les prohémoctes dans la circulation en prévention des nombreuses cellules apoptotiques qui vont être produites au cours de la métamorphose (Crozatier and Meister, 2007). Bien que les hémoctes soient présents chez l'adulte avec environ 1.000 à 2.000 hémoctes par individu (Lanot et al., 2001), aucun site/organe hématopoïétique n'a été mis en évidence à ce stade.

3.1.3 - Contrôle génétique de l'hématopoïèse.

La connaissance actuelle des fonctions et des modes d'action des facteurs de transcription impliqués dans la mise en place de l'hématopoïèse permet d'établir, pour certains de ces facteurs, un parallèle entre l'hématopoïèse des vertébrés et celle des invertébrés (Waltzer et al., 2010). Chez la drosophile, la spécification hématopoïétique à partir du mésoderme embryonnaire est déterminée par l'expression du facteur *Serpent*, codé par le gène *srp*, orthologue de la famille des gènes GATA des vertébrés (Rehorn et al., 1996; Sam et al., 1996) (voir Chapitre 5.1) (*Figure 23*). L'expression de *srp* dans la glande de la lymphe suggère qu'il joue également un rôle au cours du stade larvaire. Toutefois, ce rôle n'a pas pu être clairement défini étant donné la létalité des drosophiles invalidées pour l'expression de *srp* (Lebestky et al., 2000). *Srp* agit en amont des facteurs de transcription *Lozange* (*Lz*), homologue de *Runx1/AML1*, *Glial Cells Missing-1 et -2* (*Gcm*) et *U-shaped* (*Ush*),

membre de la famille Friend of GATA (FOG) (Lebestky et al., 2000; Fossett et al., 2001). Gcm-1 et -2 sont essentiels pour la production des plasmacytes (Bernardoni et al., 1997; Alfonso and Jones, 2002). En synergie avec *Srp*, *Serrate*, acteur de la voie de signalisation Notch, active l'expression de *Lz* dans les prohémyocytes, ce qui déclenche la différenciation des cellules à cristaux (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003; Ferjoux et al., 2007). En revanche, le facteur *Ush* bloque la différenciation des cellules à cristaux (Fossett et al., 2001). En cas de parasitisme, le facteur *Collier*, orthologue d'Early B-cell Factor (EBF) impliqué dans la différenciation lymphocytaire B des mammifères (Hagman et al., 1993; Crozatier et al., 1996), joue un rôle important dans la production des lamellocytes (Crozatier et al., 2004). La voie de signalisation JAK/STAT est également impliquée dans cette production (Luo et al., 1995; Luo et al., 1997; Makki et al., 2010).

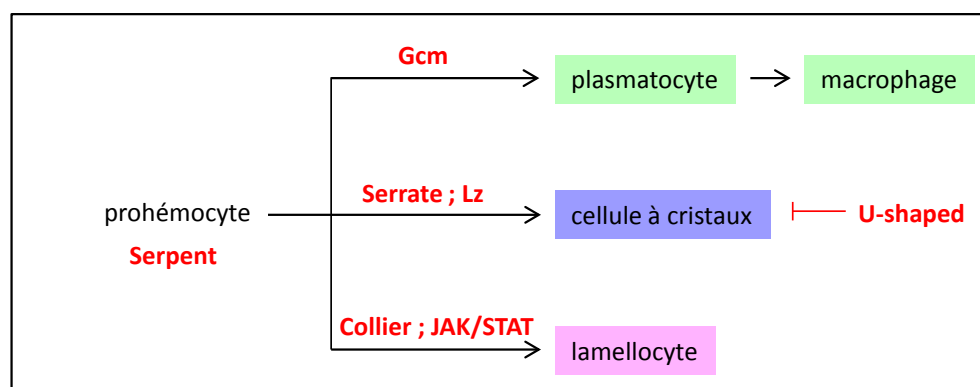


Figure 23 : Contrôle génétique de l'hématopoïèse chez la drosophile

Certains facteurs et voies de signalisation décrits dans la littérature régissent la spécification (Serpent) ou la différenciation (Gcm, Serrate, Lz, Collier, JAK/STAT, U-shaped) hématopoïétique au cours du développement. Abréviations utilisées : Lz Lozange ; Gcm Glial cell missing.

3.2 - Le poisson-zèbre

Depuis deux décennies, le modèle du poisson-zèbre (*Danio rerio*) est de plus en plus utilisé pour l'étude des CSHs du fait de ses nombreux avantages. Contrairement à la fécondation des mammifères, celle du poisson-zèbre est externe et les œufs fécondés peuvent être observés et manipulés à tout moment du développement, à partir du stade une cellule jusqu'au stade adulte. La maturité sexuelle est atteinte au bout de trois mois et chaque femelle adulte est capable de produire pas moins de 200 œufs par semaine. Les étapes du développement précoce se déroulent bien plus rapidement que celles de la souris, et les embryons sont translucides et permettent l'observation de l'intégralité du processus d'embryogenèse, ainsi que le développement, la différenciation et la migration des cellules *in vivo*. Le poisson-zèbre est également utilisé pour la réalisation d'analyses

génétiques poussées, notamment via la génération de nombreux mutants (Driever and Fishman, 1996; Haffter et al., 1996) présentant des défauts hématopoïétiques variés et permettant d'améliorer les connaissances actuelles sur le processus d'hématopoïèse (Ransom et al., 1996; Weinstein et al., 1996). L'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse ainsi que les voies de signalisation impliquées sont très conservées entre les poissons et les mammifères. Toutefois, les points communs entre le poisson-zèbre et les mammifères ne sont pas restreints à l'expression de certains gènes, et tout deux partagent la totalité des types cellulaires hématopoïétiques générés à partir des CSHs, ce qui constitue un avantage important comparativement aux modèles d'invertébrés tels que la drosophile qui possède un système hématopoïétique simplifié et qui est dépourvu de système immunitaire adaptatif. Par ailleurs, l'existence d'un hémangioblaste chez le poisson-zèbre a également été suggérée (Vogeli et al., 2006).

Comme nous l'avons vu jusqu'à présent pour les autres espèces, la mise en place du système hématopoïétique du poisson-zèbre se déroule en deux vagues successives (Figure 24).

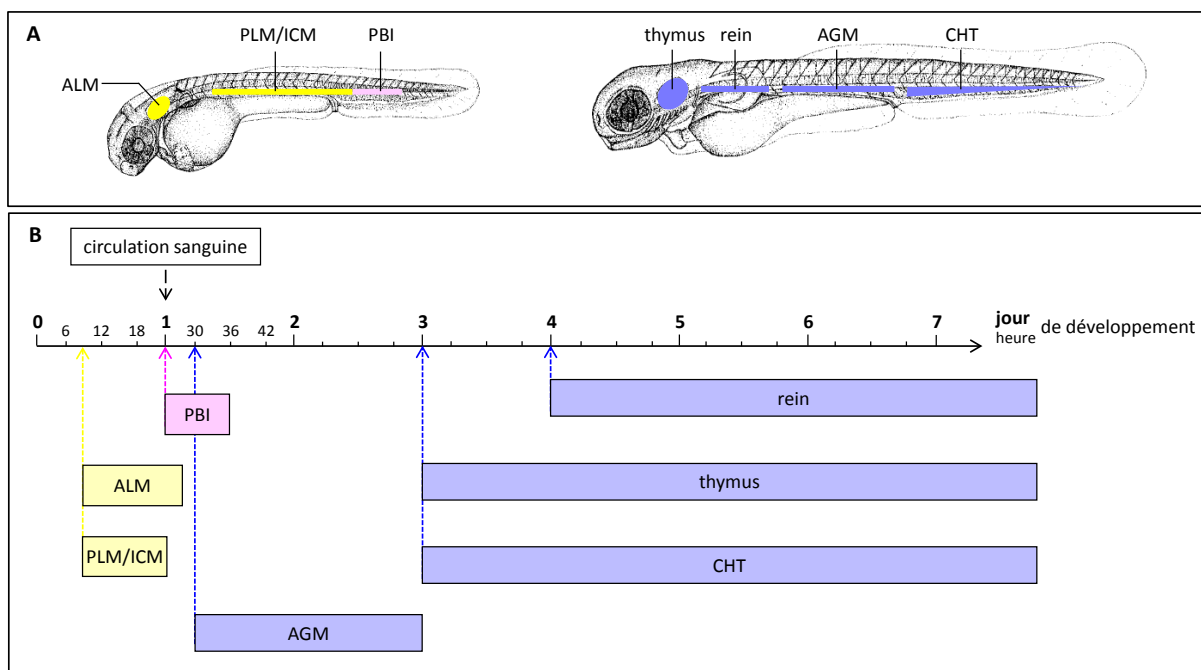


Figure 24 : Mise en place du système hématopoïétique chez le poisson-zèbre

(A) Les différentes régions participant à l'hématopoïèse primitive (en jaune) et définitive (en rose et en bleu). **(B)** L'hématopoïèse primitive permet la production de progéniteurs myéloïdes dans l'ALM (Anterior Lateral Mesoderm) et de progéniteurs érythroïdes dans le PLM (Posterior Lateral Mesoderm), futur ICM (Intermediate Cell Mass). Les premiers progéniteurs bipotents sont détectés dans le PBI (Posterior Blood Island) au cours d'une vague hématopoïétique transitoire (en rose). L'hématopoïèse définitive (en bleu) comprend des CSHs générées dans l'AGM. Le CHT (Caudal Hematopoietic Tissue, correspondant au PBI tardif), le thymus et le rein sont ensuite colonisés (d'après Chen et al., 2009 ; illustrations issues de Kimmel et al., 1995).

L'hématopoïèse primitive. Elle génère principalement des érythrocytes primitifs et des macrophages (de Jong and Zon, 2005). Contrairement à l'hématopoïèse primitive des mammifères et de l'oiseau qui se déroule en extra-embryonnaire dans le SV, celle du poisson-zèbre a lieu dans une région intra-embryonnaire située entre la notochorde et l'endoderme du tronc nommée ICM pour Inner Cell Mass (Detrich et al., 1995). Cette région se subdivise en deux parties distinctes : l'Anterior Lateral Mesoderm (ALM) qui génère les progéniteurs myéloïdes primitifs, et le Posterior Lateral Mesoderm (PLM), d'où sont issus les progéniteurs érythroïdes primitifs. 10 heures post-fécondation, deux bandes cellulaires Scl^+ sont observables à la fois dans l'ALM et le PLM, reflet de la spécification hématopoïétique de ces cellules (Davidson et al., 2003). Le mutant *spadetail* présente une myélopoïèse normale dans l'ALM mais aucune cellule érythroïde n'est produite dans l'ICM, ce qui indique que les régulations génétiques des progéniteurs de ces deux régions sont indépendantes (Thompson et al., 1998; Lieschke et al., 2002).

Comme chez la drosophile, les progéniteurs myéloïdes précoces du poisson-zèbre proviennent du mésoderme céphalique (Herbomel et al., 1999). Les macrophages et les granulocytes mûrissent à partir du SV (Bennett et al., 2001) et migrent à travers l'embryon pour éliminer les cellules apoptotiques (Herbomel et al., 1999). Les cellules myéloïdes primitives de la drosophile et du poisson-zèbre jouent ainsi des rôles similaires dans le remodelage tissulaire dans l'embryon et au cours du développement. Ces cellules correspondraient aux macrophages primitifs produits par le SV des mammifères et de l'oiseau.

L'importance des facteurs de transcription GATA-1 et Pu.1. L'ICM se forme 18 heures après fécondation à partir des cellules du PLM adjacentes aux somites en développement. Le facteur de transcription GATA-1 est crucial pour l'érythropoïèse primitive. Environ 300 proérythroblastes $GATA-1^+$ entrent dans la circulation aux alentours de 24 heures post-fécondation et se différencient en érythrocytes (Chen and Zon, 2009). Ces érythrocytes primitifs sont morphologiquement différents des érythrocytes retrouvés chez l'adulte qui ont peu de cytoplasme et qui présentent un noyau allongé. Contrairement aux érythrocytes des mammifères qui sont énucléés, les érythrocytes du poisson-zèbre possèdent un noyau et en ce sens, ils sont comparables à ceux de l'oiseau. Les cellules de l'ALM n'expriment pas GATA-1 puisque cette région ne produit pas de cellules érythroïdes. Le facteur Pu.1, nécessaire à la différenciation myéloïde, est détecté 11 heures post-fécondation dans une fraction des cellules Scl^+ dans l'ALM. Ces progéniteurs myéloïdes $Scl^+Pu.1^+$ sont présents dans la circulation entre 14 et 16 heures post-fécondation et se différencient

en macrophages et granulocytes dans le SV entre 22 et 24 heures post-fécondation (Bennett et al., 2001; Chen and Zon, 2009).

Pu.1 est coexprimé avec GATA-1 dans l'ICM entre 16 et 20 heures post-fécondation et l'équilibre entre ces deux facteurs régule la production des cellules myéloïdes et érythroïdes primitives. En effet, si GATA-1 n'est pas exprimé, les précurseurs érythroïdes de l'ICM deviennent des précurseurs myéloïdes (Galloway et al., 2005), et la perte de Pu.1 induit la formation de cellules érythroïdes dans l'ALM (Berman et al., 2005). Ces données suggèrent que chez le poisson-zèbre, les facteurs GATA-1 et Pu.1 régulent la balance entre différenciation myéloïde et érythroïde au cours de l'hématopoïèse primitive.

L'hématopoïèse définitive. L'hématopoïèse primitive se déroulant dans l'ALM et l'ICM dure moins de 24 heures, et est suivie d'une autre vague d'hématopoïèse transitoire dans la région postérieure de la queue nommée Posterior Blood Island (PBI), également appelée Tissu Hématopoïétique Caudal (CHT). Bien que ces deux termes soient utilisés de manière interchangeable, le terme PBI peut être associé à la vague d'émergence hématopoïétique transitoire précoce (entre 24 et 36 heures post-fécondation) et le terme CHT aux stades plus tardifs (Chen and Zon, 2009). La vague transitoire précoce est définie en tant que première vague d'hématopoïèse définitive puisqu'elle comprend les premiers progéniteurs hématopoïétiques bipotents observables dans l'embryon (Bertrand et al., 2007), présents dans le PBI entre E1 et E2. Une fois la circulation sanguine établie (24 heures post-fécondation), l'expression de GATA-1 diminue dans l'ICM mais est importante dans le PBI, suggérant un changement de localisation de l'activité hématopoïétique dans l'embryon. Pour appuyer cette hypothèse, l'expression de Pu.1 disparaît de l'ICM au bout de 22 heures post-fécondation, de l'ALM au bout de 28 heures post-fécondation (Bennett et al., 2001), et réapparaît dans le PBI à 30 heures post-fécondation (Bertrand et al., 2007).

Les CSHs définitives émergent à partir de la paroi ventrale de l'aorte (VDA ou Ventral wall of Dorsal Aorta), équivalent de la région AGM des vertébrés, et deux études montrent la présence de cellules endothéliales hémogéniques à cet endroit (Bertrand et al., 2010; Kissa and Herbomel, 2010). Les CSHs vont ensuite migrer dans le CHT (Murayama et al., 2006; Jin et al., 2007) qui, d'un point de vue fonctionnel, est comparable au FF des mammifères puisque les CSHs s'amplifient et se différencient dans cette région. A partir d'E3, certaines CSHs de l'AGM migrent directement dans le thymus où se déroule la lymphopoïèse (Kissa et al., 2008). Enfin, à partir d'E4, les CSHs de l'AGM et du CHT commencent à coloniser le rein, organe hématopoïétique définitif chez le poisson-zèbre adulte. La visualisation des CSHs chez l'adulte s'est révélée difficile jusqu'à ce que l'équipe de Zon mette au

point un modèle de poisson zèbre adulte transparent dénommé *Casper* (White et al., 2008). La lignée *Casper* est dépourvue de pigmentation, ce qui permet de visualiser individuellement la migration de cellules fluorescentes injectées ainsi que la colonisation du rein.

3.3 - Le xénope

Le xénope constitue un des modèles utilisés pour l'étude du développement embryonnaire des vertébrés. Le genre *Xenopus* comprend une quinzaine d'espèces d'amphibiens anoures et le succès de ce modèle expérimental est principalement dû au fait que les embryons sont de grande taille et disponibles en quantité importante. Comme ceux du poisson-zèbre, les embryons de xénope se développent de manière externe, ce qui permet l'observation macroscopique des différentes étapes de l'embryogenèse et facilite leur manipulation. Pour l'une comme pour l'autre de ces deux espèces, de nombreuses techniques sont disponibles pour l'étude de l'expression et de la fonction des gènes, notamment les techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunohistochimie sur embryons entiers qui permettent d'observer l'expression des gènes au cours du développement. La fonction des gènes peut être testée par des expériences de surexpression par microinjections d'ARN messager (ARNm). Des expériences de perte de fonction sont également possibles par la microinjection de morpholinos antisens (bloquant la traduction de l'ARNm) ou d'ARNm codant pour des formes tronquées de la protéine à effet « dominant négatif ». Plusieurs techniques de transgénèse ont également été développées chez le xénope et sont particulièrement utiles pour l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes et l'étude d'étapes tardives du développement. Concernant la mise en place du système hématopoïétique, des expériences de greffes dans des embryons de xénope ont permis de montrer que les précurseurs hématopoïétiques embryonnaires et adultes sont préférentiellement localisés au niveau du « Ventral Blood Island » (VBI) et de la plaque latérale dorsale (DLP) respectivement (Kau and Turpen, 1983).

Le « Ventral Blood Island » ou VBI. D'un point de vue fonctionnel, le VBI du xénope correspond au SV des mammifères et de l'oiseau, et se forme 24 heures post-fécondation. Étant donné que le VBI correspond au tissu le plus ventral du têtard de xénope, le sang a longtemps été considéré comme un dérivé du mésoderme ventral chez cette espèce. En effet, au cours de la gastrulation, la Zone Marginale Ventrale (VMZ) est capable de former des érythrocytes primitifs, et à l'époque, seule une faible contribution des tissus dorsaux avait été rapportée mais n'avait pas été étudiée plus avant (Dale and Slack, 1987). Depuis, plusieurs équipes se sont attachées à cette étude et ont montré que

les tissus dorsaux participaient également à la formation du VBI (Tracey et al., 1998; Lane and Smith, 1999; Mills et al., 1999; Ciau-Uitz et al., 2000; Walmsley et al., 2002). La preuve que l'hématopoïèse primitive dérive en partie de la Zone Marginale Dorsale (DMZ) provient de l'étude du facteur de transcription *Xenopus* Acute Myeloid Leukemia (*Xaml*), homologue de *Runx1/AML1* (Tracey et al., 1998) (voir Chapitre 5.1). Grâce à des cultures d'explants de DMZ, cette étude a permis de montrer que cette région exprime *Xaml* et que l'abolition de l'expression de *Xaml* induit la suppression du marqueur érythrocytaire α -globine dans la partie antérieure du VBI. De plus, l'injection d'un traceur fluorescent dans la zone marginale au stade 4 cellules révèle que le DMZ contribue à la formation de la partie la plus antérieure du VBI, l'« aVBI », alors que la VMZ contribue à la formation de la partie postérieure du VBI, le « pVBI ». Ces résultats ont été confirmés par Ciau-Uitz et al. (2010) qui ont montré qu'au stade 32 cellules, l'aVBI dérive de blastomères dorsaux (C1 et D1) tandis que la pVBI dérive du blastomère ventral D4 (Figure 25).

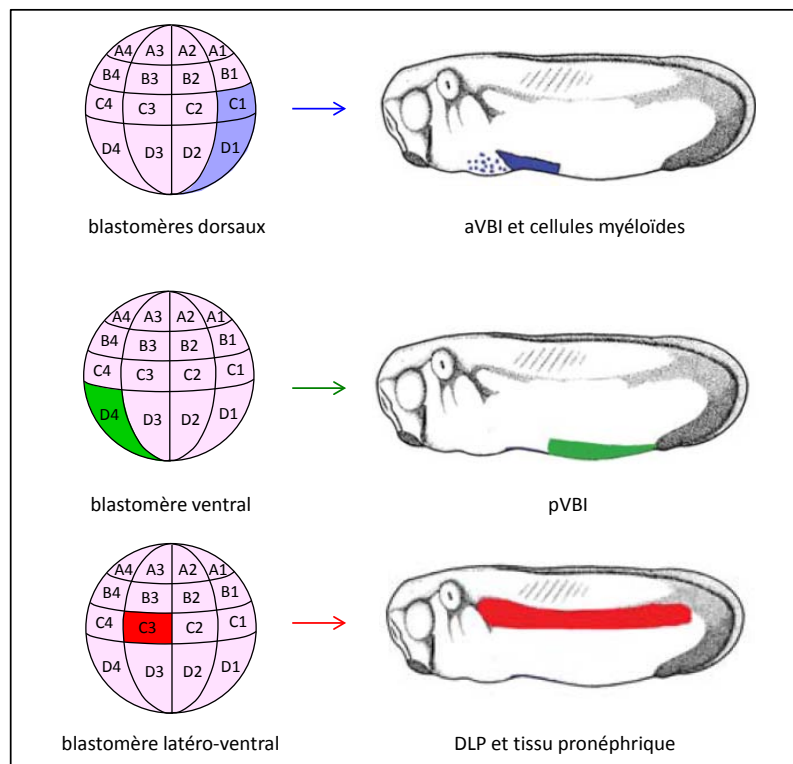


Figure 25 : Ontogenèse des différentes régions participant à la mise en place de l'hématopoïèse chez le xénope

Les CHs du VBI et celles du DLP possèdent deux origines distinctes. Alors que les cellules de la VBI proviennent des blastomères C1, D1 et D4, les cellules de la DLP proviennent du blastomère C3. Abréviations utilisées : DLP Dorsal Lateral Plate ; VBI Ventral Blood Island ; aVBI VBI antérieur ; pVBI VBI postérieur (d'après Ciau-Uitz et al., 2010).

Au stade neurula, l'expression des gènes *Scl*, *c-myb* et *GATA-1*, impliqués dans la mise en place de l'hématopoïèse (voir Chapitre 5.1), est détectée dans le VBI (Turpen et al., 1997). Dans l'aVBI, les cellules se différencient en érythrocytes primitifs, exprimant la globine à 40 heures post-fécondation, qui commencent à pouvoir circuler dans l'embryon à 50 heures post-fécondation. Outre les érythrocytes primitifs, l'aVBI est capable de générer des cellules myéloïdes, et le pVBI des progéniteurs multipotents à potentiel myéloïde et lymphoïde. Ainsi, l'aVBI contribue plutôt à l'hématopoïèse primitive tandis que le pVBI contribue plutôt à l'hématopoïèse définitive. Les CHs du pVBI colonisent par la suite le FF et le thymus où elles donneront naissance aux érythrocytes définitifs, aux thymocytes et aux précurseurs lymphoïdes B (Kau and Turpen, 1983; Smith et al., 1989; Bechtold et al., 1992).

La Plaque Latérale Dorsale ou DLP. Trois équipes et leurs études sur des embryons chimériques ont permis la mise en évidence d'un deuxième site d'émergence hématopoïétique chez le xénope, nommé DLP et composée du pronephros, des veines cardinales postérieures et de l'aorte dorsale, ce qui en fait l'équivalent de la région AGM des mammifères et de l'oiseau (Kau and Turpen, 1983; Maeno et al., 1985). L'origine des CHs adultes est longtemps restée inconnue, et ce n'est qu'en 2000 que l'équipe de Patient a pu montrer que contrairement aux CHs de la VBI (voir § ci-avant), les CHs de la DLP ainsi que les CSHs des clusters hématopoïétiques observables entre 80 et 92 heures post-fécondation au niveau de la paroi ventrale de l'aorte ont pour origine le blastomère C3 (Ciau-Uitz et al., 2000; Walmsley et al., 2002; Ciau-Uitz et al., 2010) (*Figure 25*). Le gène *c-myb* est exprimé dans la région DLP dès 18 heures post-fécondation, suivi par *Scl* (26 heures post-fécondation) et *GATA-1* (36 heures post-fécondation) (Turpen et al., 1997). Grâce à des expériences de transplantation, il a été montré que les CHs issus de la DLP ne participent pas à l'érythropoïèse primitive, mais colonisent le FF et le thymus ; ces cellules sont à l'origine des populations hématopoïétiques définitives retrouvées au cours du stade larvaire et chez l'adulte (Chen and Turpen, 1995).

Le foie. Les CHs issues du VBI et de la DLP colonisent le FF, organe hématopoïétique définitif à partir du stade larvaire et équivalent de la MO des mammifères et de l'oiseau (Galloway and Zon, 2003). 26 jours post-fécondation, les CHs retrouvées dans le FF sont principalement des érythrocytes définitifs, majoritairement issus de la DLP (Chen and Turpen, 1995). Après la métamorphose qui a lieu aux alentours de 35 jours post-fécondation, la contribution des cellules dérivées du VBI à l'activité hématopoïétique du FF ainsi qu'à la lymphopoïèse dans le thymus décroît au profit des cellules dérivées de la DLP (Bechtold et al., 1992; Chen and Turpen, 1995; Galloway and Zon, 2003).

CHAPITRE IV - HÉMANGIOBLASTE - ENDOTHÉLIUM HÉMATOGÈNE - CSH : ORIGINES ET RELATIONS POSSIBLES

La compréhension du processus conduisant à l'émergence des CSHs définitives est au cœur du débat actuel. Lors de la formation des îlots sanguins du SV, les lignages hématopoïétique et endothélial émergent simultanément et un faisceau d'arguments convergent pour dire qu'ils possèdent tous deux une origine mésodermique. La proximité de ces deux types cellulaires suggère une origine endothéliale des CSHs, et l'hypothèse de l'existence d'un précurseur commun aux deux lignages a été énoncée. Toutefois, une théorie plus récente préconise une origine mésenchymateuse des CSHs.

4.1 - L'hémangioblaste

L'hémangioblaste ainsi nommé correspondrait *in vivo* à un précurseur commun aux lignages hématopoïétique et endothélial. L'analyse des îlots sanguins détectés dans le SV précoce montre une association étroite entre les CHs et les CE, suggérant l'existence d'une cellule à l'origine de ces deux lignages. Par ailleurs, le fait que les lignages hématopoïétique et endothélial partagent l'expression de plusieurs marqueurs de surface a grandement contribué à l'hypothèse de l'hémangioblaste.

Chez la souris, la capacité d'une cellule à produire aussi bien une CH qu'une CE a été démontrée grâce aux études des corps embryoïdes (ou EB pour Embryoid Bodies) dérivés des cellules ES (pour Souches Embryonnaires). En effet, les protocoles de différenciation de cellules ES utilisés pour l'hématopoïèse précoce (Wiles and Keller, 1991; Keller et al., 1993) confirment le fait qu'une cellule mésodermique BL-CFC (ou BLast Colony-Forming Cell) peut engager son processus de différenciation vers les cellules des deux lignages, renforçant ainsi l'hypothèse de l'existence d'un hémangioblaste bipotent *in vivo* (Kennedy et al., 1997; Choi et al., 1998; Lacaud et al., 2001). Toutefois, les travaux d'Ema et al. suggèrent que ce précurseur peut aussi s'engager vers une différenciation musculaire lisse (Ema et al., 2003). Plus récemment, l'équipe de Keller a montré qu'il est possible d'obtenir des BL-CFC à partir de cellules ES humaines (Kennedy et al., 2007).

Par la suite, plusieurs études ont décrit l'existence de l'hémangioblaste chez la drosophile (Mandal et al., 2004), la souris (Huber et al., 2004), le poisson-zèbre (Vogeli et al., 2006) et l'oiseau (Weng et al., 2007). Ainsi, 12,5% des cellules mésodermiques du poisson-zèbre donnent naissance à des hémangioblastes tandis que chez l'oiseau, ce pourcentage atteint seulement 7%. Chez la souris, sa

spécification aurait lieu au niveau de la région postérieure de la ligne primitive à E7, dans le futur mésoderme du SV. Nous noterons ici que contrairement à ce qui se passe dans les îlots sanguins du SV où les CE et CHs apparaissent simultanément, la paroi endothéliale de l'aorte se forme un jour avant l'émergence des clusters hématopoïétiques. Si l'hémangioblaste s'avère exister *in vivo*, celui de la région aortique serait donc différent de celui du SV. Deux études ont montré que des cellules issues d'AGM E10.5 et d'artère ombilicale E11.5 sont capables de donner des BL-CFC *in vitro*, suggérant la présence d'hémangioblastes *in vivo* à cet endroit (He et al., 2010; Niu et al., 2012). L'ensemble des travaux réalisés jusqu'à présent suggère que s'il existe, l'hémangioblaste est très rare et seulement transitoire. Bien que les hémangioblastes extra- et intra-embryonnaires aient une origine mésodermique commune, le fait qu'ils soient générés dans des microenvironnements différents pourrait expliquer leur différence de capacité à générer des CSHs définitives.

Bien qu'aucun marqueur à ce jour ne puisse caractériser ce précurseur de façon spécifique, l'identification et la purification des hémangioblastes chez la souris sont actuellement basées sur la coexpression du facteur de croissance mésodermique Fetal Liver Kinase 1 (Flk1) (Faloon et al., 2000) et du marqueur mésodermique Brachyury (Fehling et al., 2003). Runx1 (North et al., 1999), LIM domain Only 2 ou LMO2 (Mania et al., 2000) et Scl (Chung et al., 2002) ont également été décrits comme pouvant être exprimés par l'hémangioblaste. L'expression de Flk1 a été montrée dans un premier temps comme nécessaire à la formation des îlots sanguins, à la vasculogenèse de l'embryon et à l'établissement des hématopoïèses primitive et définitive (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997). Il a été montré chez l'oiseau que Quek-1, analogue de Flk1 chez la souris, est également exprimé au niveau de la ligne primitive et que les cellules Quek-1⁺ sont capables de donner des colonies hématopoïétiques et endothéliales en conditions appropriées de culture (Eichmann et al., 1993). L'ensemble de ces observations n'explique pas précisément la relation qu'auraient les CSHs avec les hémangioblastes mais suggère des voies de développement communes.

L'hypothèse selon laquelle chaque îlot sanguin serait issu d'un hémangioblaste a été remise en question par Ueno et al. (Ueno and Weissman, 2006). Leurs travaux montrent que les îlots sanguins possèdent en réalité une origine polyclonale et que les précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux agissent de manière indépendante, sans partager de précurseur commun. Cette hypothèse avait déjà été formulée par Kinder et al. et leurs travaux sur la mise en place des précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques de la souris (Kinder et al., 1999). Ainsi, la plupart des CE et CHs des îlots sanguins sont générées à partir de précurseurs spécifiques qui ne sont pas eux-mêmes issus d'hémangioblastes. Le concept même de l'hémangioblaste a été remis en question puisque la majorité des CHs proviennent en fait de cellules Flk1⁻ et que seules les CE sont issues de

cellules Flk1⁺. Cependant, ces résultats ont été démentis par Lugus et al. en 2009 qui montrent que la totalité des CHs primitives et définitives sont bien dérivées d'un ancêtre mésodermique Flk1⁺ (Lugus et al., 2009).

L'hypothèse de la présence d'hémangioblastes chez l'adulte a également été soulevée (Bailey and Fleming, 2003). Des analyses phénotypiques et fonctionnelles de CSHs humaines CD34⁺Runx1⁺ issues de MO adulte ont montré que cette population est capable de générer des CE et des CHs en culture, ce qui indique qu'elle contiendrait des hémangioblastes (Pelosi et al., 2002). Une autre étude suggérant l'existence d'hémangioblastes chez l'adulte a été réalisée à partir de MO de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Gunsilius, 2003).

4.2 - Origine des CSHs

4.2.1 - L'endothélium hématogène

Que ce soit dans les îlots sanguins du SV ou au moment de l'émergence des clusters aortiques dans la région AGM, l'étroite association observée entre les CE et les CHs/CSHs naissantes a soulevé l'hypothèse selon laquelle les CHs sont produites à partir des CE (Jaffredo et al., 2005).

Alors que l'origine endothéliale des clusters aortiques de l'embryon d'oiseau avait déjà été montrée (Jaffredo et al., 1998), Nishikawa et al. ont voulu confirmer cette théorie chez la souris. Après avoir isolé des CE VeCad⁺CD45⁻ de SV E9.5, ils ont montré qu'elles sont capables de se différencier en CHs *in vitro* (Nishikawa et al., 1998b). L'équipe de Nishikawa a confirmé ces résultats *in vivo* par des expériences de reconstitution hématopoïétique dans des souriceaux nouveaux-nés (Fraser et al., 2002). Un peu plus tôt dans le développement, la population endothéliale Flk1⁺Tie2⁺ issue de SV E8.25 a également été décrite comme possédant une activité hémogénique (Li et al., 2005). Une fois ensemencées sur cellules OP9, la fraction Flk1⁺Tie2⁺CD41⁺ est capable de donner des CHs. Concernant la fraction Flk1⁺Tie2⁺CD41⁻, elle est capable de générer *in vitro* des colonies hématopoïétiques ainsi que des colonies endothéliales, propriétés caractéristiques de l'hémangioblaste.

Dans la région AGM, les études phénotypiques et fonctionnelles menées sur les clusters aortiques par l'équipe de Dzierzak ont montré que les CSHs sont localisées préférentiellement au contact des CE de la paroi aortique (de Bruijn et al., 2002). Ces CSHs sont contenues dans une population exprimant à la fois le marqueur hématopoïétique CD45 et le marqueur endothélial VeCad (Taoudi et al., 2005; Taoudi et al., 2008). Grâce à des expériences de coculture sur cellules OP9, les travaux de

Rybtzov et al. indiquent que le phénotype $\text{VeCad}^+\text{CD45}^-$ correspond à des pré-CSHs de type I qui mûrissent par la suite en pré-CSHs de type II $\text{VeCad}^+\text{CD45}^+$, lesquelles vont ensuite mûrir en CSHs définitives (Rybtzov et al., 2011). D'après les auteurs, les pré-CSHs de type I ne sont pas des CE hémogéniques puisqu'elles sont incapables de former des colonies endothéliales *in vitro*. La transition type I-type II aurait lieu dans le mésenchyme sous-aortique alors que la transition type II-CSH définitive aurait lieu dans l'endothélium aortique. Ce modèle suggère donc une intégration temporaire des pré-CSHs de type II dans l'endothélium, probablement favorisée par l'expression de la VeCad. Ceci n'exclut pas que les CSHs définitives proviennent de l'endothélium, mais ouvre la voie à un scénario plus complexe que celui de l'endothélium hématogène.

Pour affiner l'étude de l'origine des CHs embryonnaires, Sugiyama et al. ont développé une méthode de traçage cellulaire *in vivo* (Sugiyama et al., 2003). Après avoir injecté du Dil-AcLDL dans le cœur d'embryons E10 pour marquer l'ensemble du réseau vasculaire, les embryons ont été cultivés *in toto* pendant plusieurs heures. Une heure après l'injection, les cellules Dil^+ sont $\text{CD31}^+\text{CD34}^+\text{CD45}^-$, phénotype caractéristique de CE. 12 heures après l'injection, 43% des cellules Dil^+ ont un phénotype hématopoïétique. Ces cellules sont capables d'une part de reconstituer le système hématopoïétique de souris nouveaux-nés, et d'autre part de coloniser le FF d'embryons E10.5 (Sugiyama et al., 2005). Quatre autres équipes ont étudié la filiation hématopoïétique des premières CE grâce au modèle de souris transgénique VECR. Ce modèle basé sur le système CRE/loxP permet de suivre la descendance des cellules ayant exprimé le marqueur endothélial VeCad à un moment donné du développement embryonnaire. Kogata et al. ont étudié la réactivation de la VeCad dans les cas d'ischémies cardiaques (Kogata et al., 2006). Zovein et al. montrent que des cellules d'origine endothéliale vont coloniser le FF et plus tard, la MO (Alva et al., 2006; Monvoisin et al., 2006; Zovein et al., 2008). Elles sont capables de s'amplifier et présentent des propriétés hématopoïétiques multilignes lorsqu'elles sont cultivées sur méthylcellulose. Chen et al. indiquent que l'expression de Runx1 est essentielle pour que les CE hémogéniques de l'AGM conservent leur capacité de production hématopoïétique (Chen et al., 2009). Enfin, l'équipe de Souyri a montré que la majorité des CHs adultes sont dérivées d'un ancêtre endothélial (Oberlin et al., 2010a).

Les souris Tie2-CRE ont également été utilisées pour étudier l'origine des CHs (Kisanuki et al., 2001). Grâce à ces souris, l'équipe de Medvinsky a montré que les CHs adultes proviennent toutes d'un ancêtre Tie-2⁺ (Liakhovitskaia et al., 2009). D'après les travaux de Tang et al., plus de 80% des CHs du SV E9.5, de la rate et de la MO adulte sont issues de CE Tie-2⁺ (Tang et al., 2010).

Ce n'est que récemment qu'il a été possible de visualiser en direct la transition CE-CH. Grâce à des vidéos en temps réel prises en microscopie confocale, Boisset et al. montrent que certaines CHs

générées par la paroi ventrale de l'aorte possèdent bien un phénotype souche ($CD41^+Sca-1^+ckit^+$) et expriment également les marqueurs endothéliaux CD31 et CD34 (Boisset et al., 2010). Reste à déterminer le potentiel de reconstitution à long terme de ces cellules pour confirmer leur degré d'immaturité. Cette transition endothélio-hématopoïétique a également pu être observée en direct chez le poisson-zèbre (Bertrand et al., 2010; Kissa and Herbomel, 2010; Lam et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble des études réalisées jusqu'à présent sur l'endothélium hématogène a permis d'attribuer l'activité hématopoïétique de la région AGM à des cellules exprimant certains marqueurs communs aux lignages hématopoïétique et endothélial, en particulier la VeCad, CD31 et CD34 (Garcia-Porrero et al., 1998; Bollerot et al., 2005), mais qui n'expriment pas le marqueur pan-hématopoïétique CD45. Chez l'homme, Oberlin et al. ont étudié le potentiel hémogénique des CE $CD34^+CD45^-$ et $CD31^+CD45^-$ issues de SV E26 ou de la région AGM E28. Il s'avère que ces cellules sont capables de produire des CHs *in vitro* (Oberlin et al., 2002). Par ailleurs, certaines CSHs du foie entre 7 et 8 SG présentent le phénotype $CD34^+VeCad^+CD45^+$, ce qui suggère leur origine endothéliale (Oberlin et al., 2010b).

Grâce aux cellules ES murines, les travaux de Lancrin et al. montrent l'existence d'une population de CE hémogéniques $Tie2^+ckit^+CD41^-$ (Lancrin et al., 2009). Les auteurs prouvent également l'existence de cette population *in vivo* dans l'AGM E10.5. Par le biais d'observations de différenciation de cellules ES faites en microscopie à temps réel, l'équipe de Schroeder a montré un détachement graduel de précurseurs hématopoïétiques à partir de CE $VeCad^+$ qui s'arrondissent au fur et à mesure (Eilken et al., 2009).

4.2.2 - Les patches sous-aortiques

Des analyses cytologiques et histologiques ont montré que le plancher de l'aorte est à l'origine des CSHs. Toutefois au cours de la dernière décennie, une autre structure caractérisée par les patches sous-aortiques (ou SAPs pour SubAortic Patches) a été mise en évidence en dessous de ce plancher. Lors de l'étude des facteurs de transcription exprimés par les différents progéniteurs/précurseurs hématopoïétiques chez la souris, une nouvelle structure embryonnaire a été découverte grâce à l'expression du facteur de transcription GATA-3 (Manaia et al., 2000) et du marqueur de surface AA4.1 (Petrenko et al., 1999). Depuis, une étude a montré que l'ubiquitine ligase Mind bomb-1, régulateur des ligands des récepteurs Notch, est impliquée dans l'hématopoïèse des SAPs (Yoon et al., 2008).

Cinq raisons mises en avant par les auteurs suggèrent une relation directe entre les SAPs et l'émergence des CSHs intra-embryonnaires chez la souris : les SAPs sont visibles durant toute la période d'émergence des CHs/CSHs intra-embryonnaires, contrairement aux clusters qui ne sont visibles qu'au moment du pic d'émergence de CSHs dans le plancher de l'aorte ; ils sont restreints à la partie ventrale de l'aorte, tout comme les clusters aortiques contenant les CSHs ; ils sont localisés préférentiellement dans le mésenchyme directement sous ces clusters ; ils sont observables nettement entre E10.5 et E11.5, stades au cours desquels le nombre de clusters aortiques détectables est le plus important ; ils disparaissent simultanément avec l'arrêt de l'émergence de CSHs dans l'AGM. Le rôle que joueraient les SAPs dans l'émergence des CSHs intra-embryonnaires reste encore mal défini. Toutefois, un modèle de génération des CSHs a été proposé : les patches sous-aortiques contiendraient le microenvironnement requis pour la génération de CSHs définitives lesquelles, après avoir émergé de cette région, rejoindraient le plancher de l'aorte. Elles seraient alors transloquées dans la lumière du vaisseau puis libérées dans la circulation sanguine, ce qui leur permettrait de coloniser les autres organes hématopoïétiques. Cette translocation conduirait à la formation des clusters hématopoïétiques aortiques visibles entre E10.5 et E11.5.

Grâce à des expériences de reconstitution hématopoïétique, Bertrand et al. ont identifié une population de CSHs E10.5 présente à la fois dans les clusters aortiques et les SAPs et qui possède le phénotype $\text{ckit}^+ \text{AA4.1}^+ \text{CD31}^+ \text{CD41}^+ \text{Flk1}^+ \text{CD45}^- \text{LMO2}^+ \text{GATA-2}^+ \text{GATA-3}^+$ (Bertrand et al., 2005). Toutefois en 2008, la théorie des SAPs a été réfutée notamment par Zovein et al. et leurs travaux sur le modèle de souris transgénique inducible VeCad CRE (Zovein et al., 2008). Les CE de ce modèle murin expriment le lacZ, ce qui permet de tracer leur descendance à long terme. Les résultats de cette étude montrent que le mésenchyme sous-aortique est en réalité incapable d'hématopoïèse et que les CSHs ont un ancêtre endothélial VeCad⁺. Toutefois, en accord avec les résultats de Bertrand et al., Rybtsov et al. ont montré que la population enrichie en CSHs VeCad⁺CD45⁺ présente dans les clusters aortiques à E11.5 provient d'une population VeCad⁺CD45⁻CD41⁺ E10.5 localisée non seulement dans l'endothélium aortique mais aussi dans le mésenchyme sous-aortique, relançant à nouveau le débat sur une potentielle origine mésenchymateuse des CSHs (Rybtsov et al., 2011).

Chez l'homme, l'existence des SAPs a également été suggérée par l'équipe de Thrasher (Marshall et al., 1999; Marshall et al., 2000). Avant E27, la population mésodermique CD34⁺CD45⁻ de la région AGM possède une activité hématopoïétique (Peault and Tavian, 2003). Les auteurs leur associent également le phénotype BB9⁺ (Tavian and Peault, 2005b; Zambidis et al., 2007). Par la suite (à partir d'E27), ce potentiel hématopoïétique est retrouvé aussi bien dans la population endothéliale CD34⁺CD45⁻ que dans les cellules des clusters CD34⁺CD45⁺.

4.3 - Synthèse

Dans le but de pouvoir relier la théorie de l'hémangioblaste à celle de l'endothélium hématogène, les changements morphologiques et phénotypiques des BL-CFC de Choi et al. ont été analysés en détail. Les premiers marqueurs acquis par l'hémangioblaste Flk1⁺ engagé dans son processus de différenciation sont endothéliaux : Tie-2 (Dumont et al., 1992), ckit, VeCad, CD31 et Meca32 (Lancrin et al., 2009). Certaines de ces cellules acquièrent l'expression du marqueur hématopoïétique CD41 et perdent l'expression de Tie-2 : elles sont alors capables de générer des CHs primitives et définitives CD45⁺ en culture. Ces résultats établissent pour la première fois un lien direct qui relirait la théorie de l'hémangioblaste à celle de l'endothélium hématogène : les CHs du SV et CHs/CSHs de l'AGM seraient donc générées à partir de l'hémangioblaste en passant par l'endothélium hématogène (*Figure 26*).

De plus en plus de travaux soutiennent aujourd'hui la théorie d'une origine purement endothéliale des CSHs définitives. Toutefois, les résultats des travaux en faveur de la théorie des SAPs suggèrent l'existence d'un modèle alternatif d'émergence de ces CSHs qui seraient issues de cellules mésenchymateuses et qui migreraient par la suite à travers l'endothélium aortique pour former les clusters dans la lumière du vaisseau, en passant possiblement par un phénotype intermédiaire de type endothélial. Il est également possible que la génération de CSHs à partir du mésenchyme sous-aortique implique un intermédiaire de type endothélium hématogène, lui-même issu d'un précurseur hémangioblastique (*Figure 27*).

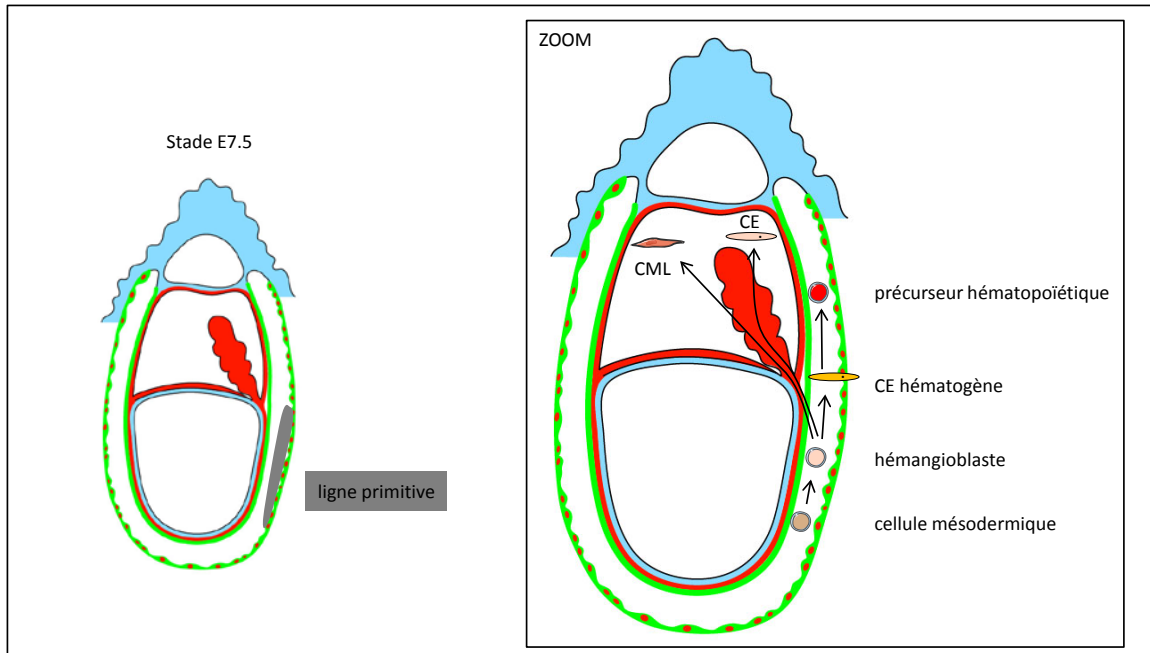


Figure 26 : Sac vitellin - lien direct entre l'endothélium hématogène et l'hémangioblaste

L'endothélium hématogène est schématisé ici par une CE à potentiel homogénique, intermédiaire direct entre l'hémangioblaste (localisé au niveau de la ligne primitive) et les précurseurs hématopoïétiques. Elle pourrait générer trois types cellulaires différents : endothélial, hématopoïétique et cellule musculaire lisse. Cette même succession d'évènements serait retrouvée au niveau du plancher ventral de l'aorte dorsale. Abréviations utilisées : CML Cellule Musculaire Lisse, CE Cellule Endothéliale (d'après Costa G et al., 2012).

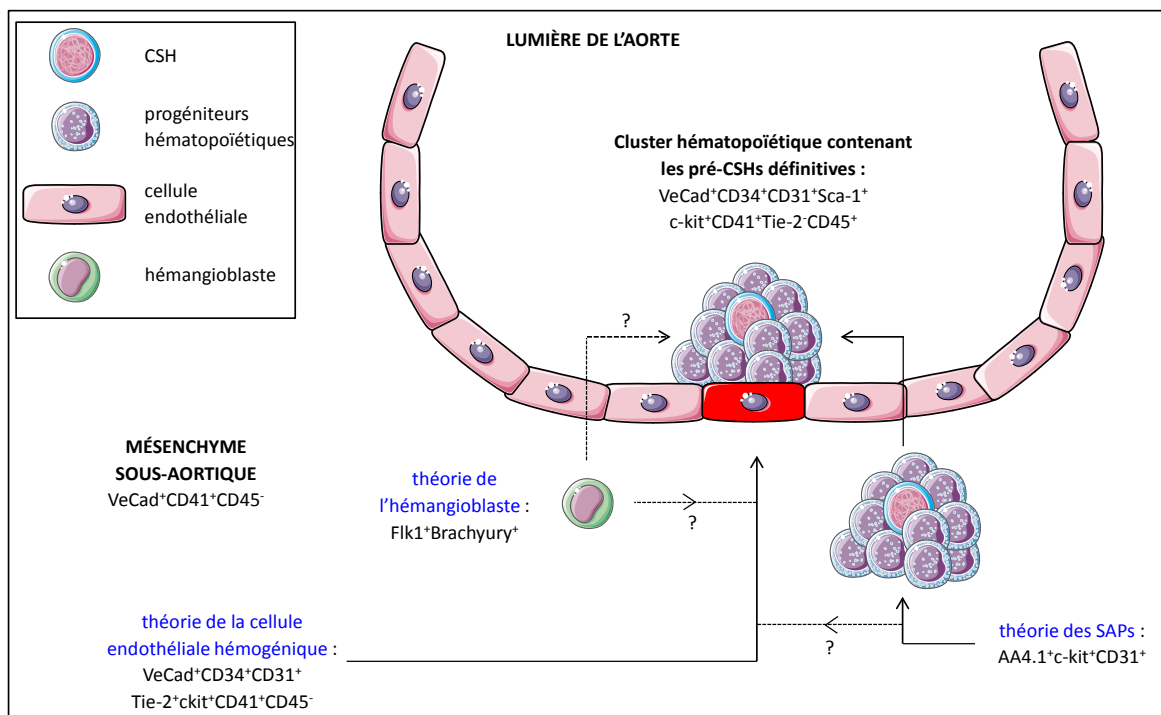


Figure 27 : Trois théories sur l'émergence des CSHs dans le plancher de l'aorte ; phénotypes principaux associés à E11.5

CHAPITRE V - CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET PHÉNOTYPIQUE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

L'identification des marqueurs spécifiques accompagnant l'émergence et l'amplification des CSHs est une étape primordiale pour la compréhension des étapes de maturation des CSHs définitives durant le développement embryonnaire. Dans cette partie, je m'attacherai à établir une liste non exhaustive des principaux facteurs de transcription et marqueurs de surface participant à l'émergence et à la différenciation des CSHs au cours du développement hématopoïétique.

5.1 - Les principaux facteurs régulateurs de l'hématopoïèse

De nombreux facteurs de transcription sont connus aujourd'hui pour jouer un rôle dans le contrôle du processus d'hématopoïèse. Leurs degrés d'implication respectifs dans ce processus sont maintenant relativement bien définis, ce qui permet d'établir une certaine hiérarchie. Tandis que certains interviennent lors de la spécification hématopoïétique, d'autres sont impliqués dans la différenciation hématopoïétique (*Figure 28*). Ce chapitre résume quelles sont ces principales molécules ainsi que leurs caractéristiques majeures.

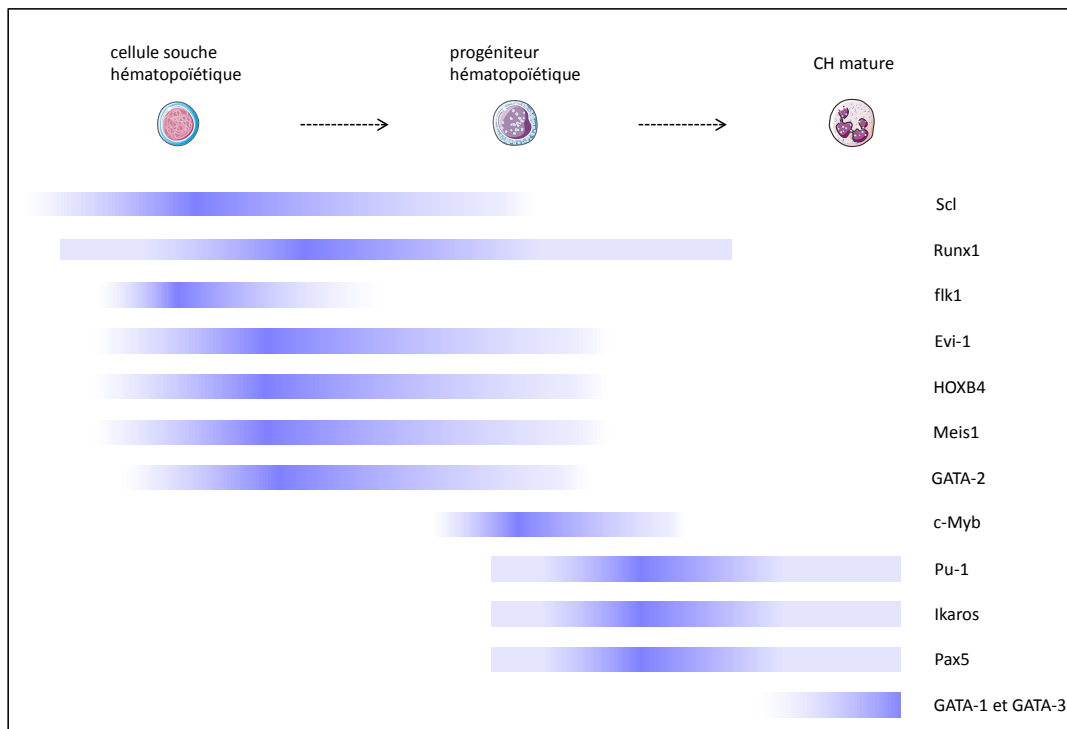


Figure 28 : Les principaux facteurs de transcription régulant l'hématopoïèse et leur hiérarchie d'expression

Stem Cell Leukemia ou Scl

Simultanément avec la découverte de GATA-1 (voir plus bas), l'étude des mécanismes à l'origine des leucémies lymphoblastiques aiguës T chez l'homme a permis la découverte d'un facteur de transcription, Stem Cell Leukemia (Scl) ou T-cell acute lymphocytic leukemia-1 (Tal-1) (Begley et al., 1989a; Begley et al., 1989b; Aplan et al., 1990; Green and Begley, 1992). Scl est un membre de la famille des facteurs de transcription à domaines hélice-boucle-hélice intervenant à plusieurs moments du processus d'hématopoïèse. Scl est exprimé dès E7.5 dans les îlots sanguins (Kallianpur et al., 1994). Par la suite, il est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules érythroïdes et les mégacaryocytes (Robb and Begley, 1996). Ce facteur de transcription joue un rôle important dans la spécification des cellules vers le lignage hématopoïétique (Elefanty et al., 1999; Drake and Fleming, 2000). En effet, les embryons $Scl^{-/-}$ sont très anémiés et meurent à E9.5, conséquence de l'absence totale d'érythrocytes primitifs et de progéniteurs myéloïdes au niveau du SV (Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995). Bien que Scl soit nécessaire pour la spécification hématopoïétique durant le développement embryonnaire, son inactivation conditionnelle dans les CSHs adultes n'a que très peu de conséquences sur les propriétés de maintien et d'autorenouvellement de ces cellules (Mikkola et al., 2003b). Toutefois, l'injection de cellules de MO adulte $Scl^{-/-}$ dans des souris létalement irradiées montre un défaut de reconstitution

hématopoïétique à court terme, suggérant que Scl joue un rôle dans les premières étapes de différenciation hématopoïétique des CSHs (Curtis et al., 2004).

Étant donné que les embryons $Scl^{-/-}$ meurent très précocement, de nombreuses équipes ont travaillé par la suite sur des cellules ES $Scl^{-/-}$ dans le but d'affiner les connaissances sur le rôle de Scl dans le processus d'hématopoïèse au cours du développement. Les travaux de Porcher et al. montrent qu'aucune production hématopoïétique n'est détectable à partir de culture de cellules ES $Scl^{-/-}$ (Porcher et al., 1996). L'équipe de Kyba montre que l'expression ectopique de Scl active l'engagement hématopoïétique du mésoderme au détriment d'autres lignages, suggérant le fait que Scl est requis à des stades embryonnaires bien plus précoces que ce qui est actuellement décrit (Ismailoglu et al., 2008). Pour étudier le degré d'implication de Scl dans l'émergence de CHs/CSHs, Lancrin et al. ont étudié l'effet de l'absence de ce gène sur les cellules $Tie2^{+}ckit^{+}CD41^{-}$ qui correspondent aux CE hémogéniques (voir §4.2.1). De façon surprenante, elles sont absentes des cultures, suggérant que Scl est nécessaire pour la formation de l'endothélium hématogène (Lancrin et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec ce qui a déjà été montré. En effet, l'expression de Scl est requise pour la production de cellules $CD41^{+}$ (Mikkola et al., 2003a) ainsi que pour la génération de cellules $VeCad^{+}$ à partir de cellules $Flk1^{+}$ (Endoh et al., 2002). Ceci suggérerait que Scl n'est pas nécessaire pour la formation de l'hémangioblaste, mais est nécessaire pour la production hématopoïétique et endothéliale qui en découle (D'Souza et al., 2005). Étant donné que l'inactivation du gène Scl dans les cellules endothéliales $Tie2^{+}$ n'affecte pas l'hématopoïèse, Scl est donc nécessaire aux cellules pour leur spécification vers le lignage hématopoïétique, avant l'apparition de cellules $Tie2^{+}$, mais pas pour la différenciation hématopoïétique qui suit (Schlaeger et al., 2005).

Runx related transcription factor 1 ou Runx1

La famille des Core Binding Factor (Cbf) compte trois membres $Cbfa$ distincts (Runx1, 2 et 3) capables de se fixer à l'ADN lorsqu'ils sont complexés à leur unique cofacteur $Cbf\beta$ (Speck and Terry, 1995; Speck and Gilliland, 2002). Ces trois gènes ont un domaine *runx* très conservé entre l'homme et la souris et leur expression ainsi que celle de $Cbf\beta$ est requise à un ou plusieurs moments du processus d'hématopoïèse (Miller et al., 2002; de Bruijn and Speck, 2004). Runx1 (également appelé $Cbf\alpha 2$, AML1 pour Acute-Myeloid Leukemia factor 1 ou encore PEBP2 α B pour PhosphatidylEthanolamine-Binding Protein 2 α B) fut le premier membre de la famille à avoir été isolé au début des années 1990. Deux études avaient alors découvert que les gènes codant pour Runx1 et $Cbf\beta$ sont impliqués dans des translocations associées aux leucémies (Miyoshi et al., 1991; Liu et al., 1993). L'équipe d'Ito a montré que la liaison de Runx1 avec $Cbf\beta$ permet de le protéger de sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (Huang et al., 2001).

Deux modèles de souris transgéniques impliquant Runx1 ont été générés dans le but de mieux comprendre l'implication de ce facteur de transcription dans le phénomène d'émergence des CSHs. L'absence totale de Runx1 au niveau embryonnaire (Runx1^{-/-}) n'abolit pas l'hématopoïèse primitive du SV bien que les érythrocytes primitifs présentent une morphologie quelque peu anormale (Yokomizo et al., 2008). Cependant, l'expression de certains gènes tels que Pu.1 ou c-myb est affectée (Okada et al., 1998) et aucune activité hématopoïétique définitive n'est détectée au niveau du FF. Les embryons présentent également un défaut plaquettaire important induisant une hémorragie consécutive au niveau du système nerveux central et meurent entre E11.5 et E12.5 (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996a). Le même phénotype est observé dans les embryons Cb β ^{-/-} (Sasaki et al., 1996; Wang et al., 1996b).

Le modèle transgénique Runx1-lacZ, dans lequel le gène du lacZ s'exprime préférentiellement dans les cellules exprimant habituellement Runx1, a permis de montrer que Runx1 est exprimé dans les différents sites et organes hématopoïétiques embryonnaires (SV, allantoïde, AGM et FF) (North et al., 1999). Dans la région AGM, les cellules lacZ⁺ sont localisées à la fois dans les clusters aortiques et dans l'endothélium du plancher de l'aorte. Les clusters aortiques ainsi que ceux des artères ombilicale et vitelline sont absents dans les embryons Runx1^{-/-}. Runx1 est donc requis pour l'émergence des CSHs dans l'embryon. En 2002, les auteurs montrent par des reconstitutions hématopoïétiques que la totalité des CSHs aortiques E11.5 exprime Runx1 et que les CHs Runx1^{-/-} n'ont aucun potentiel de reconstitution (North et al., 2002). Au moment de l'émergence des CSHs, l'expression de Runx1 est donc nécessaire au maintien du potentiel souche hématopoïétique.

Afin d'aller plus loin dans l'étude du rôle de Runx1, plusieurs modèles de souris pour lesquels l'expression de Runx1 a été invalidée de façon conditionnelle ont été mis au point. L'équipe de Speck a ainsi montré que les embryons dont les cellules Tie2⁺ n'expriment plus Runx1 présentent un phénotype quasi-identique à celui des embryons Runx1^{-/-} et meurent entre E12.5 et E13.5 (Li et al., 2006). Les auteurs concluent que l'expression de Runx1 dans les cellules Tie2⁺ est nécessaire pour l'établissement de l'hématopoïèse définitive. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Liakhovitskaia et al. indiquant que le fait de restaurer l'expression de Runx1 dans les cellules Tie2⁺ des embryons Runx1^{-/-} suffit pour rétablir l'hématopoïèse définitive des embryons jusqu'à la naissance (Liakhovitskaia et al., 2009). En 2009, l'équipe de Speck montre d'une part que l'expression de Runx1 par les cellules VeCad⁺ est indispensable pour la formation des clusters intra-aortiques, et d'autre part qu'après avoir émergé, les CSHs ne requièrent plus l'expression de Runx1 (Chen et al., 2009).

Pour étudier le rôle de Runx1 chez la souris adulte, l'équipe d'Hirai a invalidé l'expression de ce gène dans les cellules de MO. Chez ces souris, la maturation des mégacaryocytes est fortement touchée ainsi que le développement des lymphocytes B et T (Ichikawa et al., 2004). En revanche, les auteurs montrent que Runx1 n'intervient pas dans le maintien des CSHs adultes.

Plusieurs études ont également étudié le rôle de Runx1 dans l'hématopoïèse grâce aux cellules ES. Les études *in vitro* sur les cellules ES de Lacaud et al. indiquent qu'en absence de Runx1, dix à vingt fois moins de BL-CFC (voir §5.1) sont générées et les quelques CHs produites sont seulement primitives (Lacaud et al., 2002). La réactivation de Runx1 dans ces cellules permet la formation de progéniteurs hématopoïétiques définitifs (Lancrin et al., 2009). De façon simultanée, l'expression du marqueur endothélial Tie2 est fortement diminuée. Les travaux d'Hirai et al. indiquent que le début d'expression de Runx1 par les cellules endothéliales Flk1⁺ coïncide avec une diminution de l'expression de Flk1 (Hirai et al., 2005). Ceci suggère que Runx1 agit en tant que facteur régulateur de la transition endothélio-hématopoïétique. Son expression n'est pas nécessaire à la formation de l'endothélium hématogène mais par contre, la formation de progéniteurs hématopoïétiques définitifs qui en découle requiert Runx1.

Dans la région AGM, les cellules Runx1⁺ sont localisées dans l'endothélium aortique mais aussi dans le mésenchyme sous-jacent dès E10.5. Bien que toutes les cellules Runx1⁺ ne soient pas des CSHs, il a été suggéré que celles du mésenchyme aortique contiennent des pré-CSHs capables de passer à travers l'endothélium aortique et d'être relarguées directement dans la circulation sanguine, soutenant par là-même la théorie de l'hémangioblaste (§4.1). En effet, les cellules lacZ⁺ observées dans le mésenchyme sous-aortique pourraient correspondre à des pré-CSHs qui n'émergeront jamais dans la lumière de l'aorte du fait de l'absence de Runx1 (North et al., 1999). Un défaut dans l'expression de Runx1 provoque des conséquences dans l'évolution cinétique et phénotypique des CSHs tels qu'une réduction du nombre et de la taille des clusters, une distribution anormale voire une absence totale de CSHs, ou encore un défaut d'expression du CD45 (Cai et al., 2000; Takakura et al., 2000; Yokomizo et al., 2001; North et al., 2002). En conditions normales, toutes les cellules CD45⁺ expriment Runx1 mais à l'inverse, certaines cellules Runx1⁺ de type mésenchymateux ou endothélial n'expriment pas le CD45. Reste à déterminer si la distribution des cellules Runx1⁺ dans le mésenchyme sous-aortique influe sur le développement normal des CSHs. Il est également important d'identifier les gènes cibles de Runx1 impliqués dans la génération des CHs à partir de l'endothélium hématogène.

Fetal liver kinase 1 (Flk1) ou Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2)

Également appelé Kinase insert Domain Receptor (KDR), Flk1 fait partie de la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK). Elle est exprimée par les cellules vouées à donner le tissu cardiaque au niveau de la ligne primitive, et est décrit comme un marqueur de précurseurs endothéliaux (Yamaguchi et al., 1993). Les travaux de Shalaby et al. montrent que ce récepteur est essentiel à la fois pour le développement des CHs et pour la vasculogénèse (Shalaby et al., 1995; Eichmann et al., 1997; Shalaby et al., 1997). Les embryons invalidés pour le gène de Flk1 présentent une absence totale de CE et de CHs et meurent *in utero* entre E8.5 et E9.5. Un peu plus tard dans le développement, Flk1 est exprimé au niveau des clusters aortiques et contrairement au CD45, les cellules Flk1⁺ sont localisées principalement à la base des clusters, proches des CE. Ceci a été montré au niveau protéique chez l'oiseau (Jaffredo et al., 1998) et chez la souris (Yokomizo and Dzierzak, 2010), mais aussi au niveau ARNm chez l'homme (Labastie et al., 1998). Les profils d'expression de Flk1 et du CD45 s'excluent donc mutuellement dans l'aorte, résultats qui avaient déjà été suggérés par Nishikawa et al. grâce aux cellules ES (Nishikawa et al., 1998a). Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'expression de Flk1 a été rattachée à l'hémangioblaste. Les travaux de Fehling et al. sur les cellules ES confirment cette hypothèse (Fehling et al., 2003).

Ecotropic Viral Integration site-1 ou Evi-1

Evi-1 a été identifié à l'origine comme étant un site d'intégration rétroviral dans les tumeurs myéloïdes murines (Morishita et al., 1988; Mucenski et al., 1988). Membre de la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc, il est exprimé chez la souris adulte de manière préférentielle dans les reins et les ovaires (Morishita et al., 1990). Dans l'embryon, son profil d'expression est beaucoup plus large, indiquant qu'il joue un rôle dans le développement embryonnaire (Perkins et al., 1991). Perkins et al. montrent d'ailleurs que les embryons Evi1^{-/-} ont un profil hémorragique, présentent un retard de croissance et meurent à E10.5. Par la suite en 2002, il a été montré que les précurseurs mégacaryocytaires expriment Evi-1 (Shimizu et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggèreraient donc que ce facteur de transcription joue un rôle dans l'hématopoïèse. De fait, en 2005, l'équipe de Morishita montre qu'Evi-1 est exprimé dans les CSHs embryonnaires et adultes et que GATA-2 est un de ses gènes cibles (Yuasa et al., 2005).

HoxB4

Les gènes Hox (HOMeoboX) codent pour des facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (Levine and Hoey, 1988). Chez les mammifères, ces gènes sont portés par 4 chromosomes différents (Boncinelli et al., 1989). HoxB4 en fait partie et joue un rôle particulièrement important au niveau des CSHs. L'équipe d'Humphries a montré *in vitro* et *in vivo* qu'une surexpression d'HoxB4 entraîne

une amplification sélective des CHs très immatures (Sauvageau et al., 1995). De même, les CSHs surexprimant HoxB4 augmentent leur capacité à proliférer *in vitro* (Antonchuk et al., 2002) et possèdent un potentiel d'autorenouvellement *in vivo* supérieur aux CSHs témoins (Thorsteinsdottir et al., 1999; Antonchuk et al., 2001). Par ailleurs, l'expression ectopique d'HoxB4 dans les progéniteurs hématopoïétiques primitifs du SV leur confère un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme multilignage (Kyba et al., 2002). Les CSHs des souris invalidées pour l'expression d'HoxB4 sont en nombre réduit dans le FF E14.5, et à la naissance, le foie de ces souris à une cellularité diminuée, suggérant un défaut d'expansion au cours du développement (Bjornsson et al., 2003; Brun et al., 2004). Chez l'homme, les travaux d'Amsellem et al. montrent qu'une fois mises en culture au contact d'un stroma de cellules sécrétant HoxB4, les CSHs s'amplifient massivement (Amsellem et al., 2003). L'ensemble de ces études suggère qu'HoxB4 intervient dans le processus d'autorenouvellement et de prolifération des CSHs (Zon, 2008).

Myéloïd Ecotropic viral Integration Site 1 ou Meis1

Meis1 est un membre du groupe TALE (Three Amino acid Loop Extension) de la famille des protéines à homéodomaine. A l'origine, il a été isolé en tant que site d'intégration virale impliqué dans 15% des leucémies myéloïdes aiguës développées chez la souris BXH-2 (Moskow et al., 1995). Pour induire cette pathologie, une étude a montré que Meis1 agit en tant que cofacteur d'HoxA7 et HoxA9 (Nakamura et al., 1996). Au cours du développement embryonnaire, l'expression de Meis1 est détectée dans des organes non hématopoïétiques tels que les yeux (Zhang et al., 2002) et les membres (Mercader et al., 1999). Il est également exprimé au niveau du mésenchyme de l'AGM, de l'endothélium et des clusters des artères hémogéniques, du FF et de la MO (Pineault et al., 2002; Azcoitia et al., 2005). Les embryons Meis1^{-/-} présentent une absence totale de mégacaryocytes dans le FF qui est hypoplasique, des hémorragies massives au niveau du cerveau et du tronc et des défauts d'angiogenèse (Hisa et al., 2004; Azcoitia et al., 2005). En conséquence, ils meurent *in utero* entre E11.5 et E14.5. Meis1 est donc nécessaire à la survie de l'embryon, au développement des yeux et au maintien de l'hématopoïèse définitive.

Les facteurs de transcription GATA

GATA-1, GATA-2 et GATA-3 font partie de la famille de facteurs de transcription à doigts de zinc. Le premier à avoir été découvert fut **GATA-1**, initialement appelé Eryf1 ou GF-1, localisé sur le chromosome X (Evans and Felsenfeld, 1989; Tsai et al., 1989; Zon et al., 1990). Son expression est restreinte aux cellules érythroïdes, aux mégacaryocytes, aux cellules éosinophiles (Romeo et al., 1990; Zon et al., 1991; Zon et al., 1993) et aux cellules de Sertoli (Ito et al., 1993; Yomogida et al., 1994). L'invalidation du gène GATA-1 conduit à un défaut sévère de l'érythropoïèse primitive et

définitive (Pevny et al., 1991; Fujiwara et al., 1996; Takahashi et al., 1997). L'expression du facteur de transcription **GATA-2** est plus large que celle de GATA-1 puisqu'il est également exprimé au niveau des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs (Mouthon et al., 1993; Labbaye et al., 1995). Aussi bien chez le xénope (Bertwistle et al., 1996), le poisson zèbre (Amatruda and Zon, 1999) ou encore la souris (Kobayashi-Osaki et al., 2005), il constitue un marqueur précoce des cellules spécifiées vers le lignage hématopoïétique, suggérant que le rôle de GATA-2 dans l'hématopoïèse est conservé entre les espèces. Les embryons de souris invalidés pour GATA-2 ont une hématopoïèse primitive très réduite au niveau du SV et meurent vers E10-E11 d'anémie sévère (Tsai et al., 1994; Tsai and Orkin, 1997). Les auteurs montrent également que l'hématopoïèse définitive est très affectée. L'ensemble de ces résultats suggèrent que GATA-2 joue un rôle important dans le maintien de l'immaturité des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs alors que GATA-1 intervient lors de la maturation hématopoïétique. Les travaux de Minegishi et al. confirment cette hypothèse et montrent qu'une diminution de l'expression de GATA-2 est nécessaire pour la différenciation des CHs immatures (Minegishi et al., 2003). En 2004, l'équipe de Dzierzak montre que chez la souris, GATA-2 possède un double rôle puisque d'une part il est nécessaire à l'émergence des CSHs dans l'AGM, et d'autre part son expression est requise pour la prolifération des CSHs dans la MO adulte (Ling et al., 2004). **GATA-3** est exprimé au niveau des lymphocytes T et son ARNm est retrouvé au niveau thymus foetal ainsi que dans les cellules érythroïdes (Oosterwegel et al., 1992). Il est également exprimé au niveau des clusters aortiques (Manaia et al., 2000). Son invalidation chez la souris conduit à la mort des embryons entre E11 et E12, conséquence d'hémorragies internes massives, d'un retard de croissance important, ainsi que des malformations au niveau du cerveau et de la moelle épinière (Pandolfi et al., 1995). Les travaux de Ting et al. montrent que les cellules ES **GATA-3**^{-/-} contribuent normalement à l'hématopoïèse définitive excepté pour les cellules du lignage T, suggérant ainsi que GATA-3 est un régulateur spécifique de la différenciation lymphocytaire dans le thymus (Ting et al., 1996).

c-Myb

Le proto-oncogène **c-myb** constitue l'homologue de **v-myb**, initialement identifié dans le virus de la myéloblastose aviaire (Klempnauer et al., 1982). (Klempnauer et al., 1982). Le gène **c-myb** est exprimé dans les progéniteurs érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes et son expression s'éteint lorsque de la différenciation de ces cellules (Westin et al., 1982; Craig and Bloch, 1984; Sheiness and Gardinier, 1984). Les embryons invalidés pour le gène **c-myb** présentent un phénotype normal à E13.5, indiquant que **c-myb** n'intervient pas dans l'hématopoïèse primitive. En revanche à E15.5, le nombre d'érythrocytes définitifs du FF est grandement diminué et les embryons sont en anémie

sévère. Bien que n'intervenant pas dans l'émergence des CSHs, c-myb est essentiel pour la maturation et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (Mucenski et al., 1991).

Pu.1

Le facteur de transcription Pu.1 est le produit du proto-oncogène Sfp1 (Paul et al., 1991). Il est exprimé spécifiquement dans les tissus hématopoïétiques et en particulier par les macrophages et les lymphocytes B (Klemsz et al., 1990), suggérant qu'il joue un rôle dans la production de ces CHs. Les travaux de Schuetze et al. montrent que la surexpression de Pu.1 dans les érythroblastes suffit à leur immortalisation (Schuetze et al., 1993). Ainsi, Pu.1 est requis pour le développement des progéniteurs érythroïdes au cours de l'hématopoïèse. Les embryons Pu.1^{-/-} ont permis de confirmer ces résultats puisqu'ils produisent un nombre normal de mégacaryocytes et de progéniteurs érythroïdes mais présentent un défaut de différenciation érythroblastique visible à E14.5 dans le FF (Scott et al., 1994). Par ailleurs, aucun macrophage ni lymphocyte (B et T) n'est détectable et les embryons meurent *in utero* aux alentours d'E18 (Kim et al., 2004). Pu.1 joue donc un rôle important dans le maintien et/ou l'expansion du nombre de CSHs dans le FF.

Ikaros

Le facteur de transcription Ikaros été initialement décrit pour sa capacité à se lier et à activer l'enhancer du gène CD3δ, codant pour un marqueur précoce de la différenciation lymphocytaire T (Georgopoulos et al., 1992). Le phénotype des souris invalidées pour Ikaros n'est pas létal au stade embryonnaire. Toutefois, les souriceaux présentent une taille diminuée observable au bout d'une semaine de vie post-natale. Ces souris déficientes ne possèdent ni lymphocytes ni cellules NK (Georgopoulos et al., 1994). Les progéniteurs associés à ces deux types de CHs sont également absents. En revanche, les lignages érythroïdes et myéloïdes sont intacts. Ikaros semble donc promouvoir uniquement la différenciation lymphoïde des CSHs.

Pax5

Le gène Pax5 est un membre de la famille Pax qui doit son nom au domaine PBD (Paired Box Domain) de liaison à l'ADN. Ce gène code pour le facteur de transcription B cell Specific Activator Protein (BSAP) préférentiellement exprimé au niveau des cellules lymphoïdes B (Barberis et al., 1990; Adams et al., 1992). Les embryons Pax5^{-/-} ont un défaut dans le développement du cerveau visible à E16.5 et ne possèdent aucun lymphocyte B (Urbanek et al., 1994). A la naissance, ils présentent un retard de croissance et la plupart meurent 3 semaines plus tard. Les travaux de Nutt et al. montrent que les cellules pro-B Pax5^{-/-} ne sont pas capables de se différencier *in vitro* (Nutt et al., 1999). Toutefois, de façon intéressante, elles sont capables de reconstituer le thymus de souris immunodéficientes Rag2^{-/-}

(Rolink et al., 1999). Ces résultats montrent que le gène Pax5 est indispensable à la lymphopoïèse B (Cobaleda et al., 2007).

5.2 - Les principaux marqueurs des CSHs

Au cours de leur spécification, les CSHs naissantes vont acquérir et/ou perdre plusieurs marqueurs de surface. En l'absence de marqueurs spécifiques des CSHs, les marqueurs de surface accompagnant la maturation de ces cellules ne peuvent être définis qu'à partir d'expériences de reconstitution hématopoïétique. Dans ce paragraphe, je m'attacherai à décrire de façon la plus exhaustive possible les principaux marqueurs définis à l'heure actuelle comme étant exprimés par les CSHs à un moment donné du développement embryonnaire (*Figure 29*).

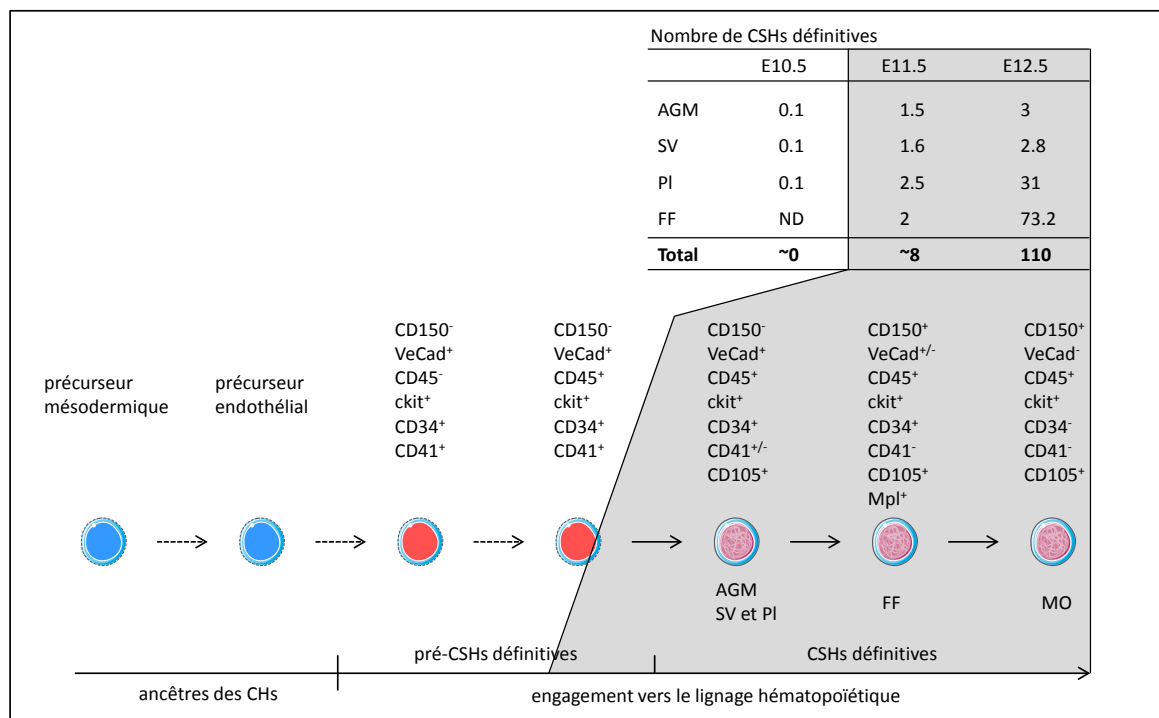


Figure 29 : Les principaux marqueurs de surface associés aux CSHs au cours de leur maturation

Les données du tableau sont issues de Kumaravelu et al., 2002, Ottersbach et al., 2005 et Gekas et al., 2005. Les flèches en pointillés représentent les transitions présumées aboutissant à la formation des CSHs (d'après Medvinsky et al., 2011).

CD41 ou intégrine α_{IIb}

La molécule α_{IIb} s'associe avec β_3 pour former un complexe, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, caractéristique de la voie de différenciation mégacaryocytaire (Naik and Parise, 1997). En plus de marquer les mégacaryocytes et les plaquettes, CD41 est le premier marqueur de surface à être exprimé par une cellule engagée dans un processus de différenciation hématopoïétique, que ce soit à partir d'une CE ou d'un autre type cellulaire d'origine mésodermique (Corbel and Salaun, 2002; Mitjavila-Garcia et al., 2002; Emambokus and Frampton, 2003; Ferkowicz et al., 2003; Mikkola et al., 2003a; Corbel et al., 2005; Kiel et al., 2005). Ainsi, il a été montré que les CSHs naissantes dans les clusters aortiques sont CD41⁺. Cependant, l'expression du CD41 par les CSHs est seulement transitoire et se perd au cours de leur maturation dans le FF (Kiel et al., 2005). Les travaux de Robin indiquent que les CSHs du PI sont également CD41⁻ (Robin et al., 2011). Seuls certains progéniteurs engagés (Bertrand et al., 2005), les mégacaryocytes et les plaquettes (Phillips et al., 1988; Nakorn et al., 2003) maintiennent son expression. Ainsi, le différentiel d'expression du CD41 par les CSHs dans les sites et organes hématopoïétiques embryonnaires suggère une régulation dynamique de l'expression de ce marqueur au cours du développement.

CD34

La glycoprotéine CD34 est exprimée préférentiellement par les progéniteurs hématopoïétiques/CSHs murins (Brown et al., 1991; Baumheter et al., 1993; Krause et al., 1994; Sanchez et al., 1996) et humains (Civin et al., 1984; Katz et al., 1985; Andrews et al., 1986); son expression est perdue au cours de la maturation de ces cellules. En effet, les CSHs embryonnaires très proliférantes sont CD34⁺ contrairement aux CSHs adultes de la MO qui sont CD34⁻. Brown et al. ont montré que cette protéine est également présente dans certains types de fibroblastes et l'équipe de Greaves indique qu'elle est exprimée au niveau des CE vasculaires (Fina et al., 1990). Les travaux de Wood et al. ont permis l'étude plus fine du profil d'expression du marqueur CD34 (Wood et al., 1997). Les niveaux d'expression du CD34 semblent être corrélés au mode de formation des vaisseaux : alors qu'ils sont hauts dans les cellules pré-endothéliales et dans les vaisseaux formés par vasculogénèse, ils sont bas dans les veines cardinales. Les auteurs indiquent que des CHs CD34⁺ sont présentes dès E10 dans le FF et dans le mésenchyme para-aortique. Deux équipes ont étudié l'effet de l'absence d'expression du gène CD34 sur l'hématopoïèse mais les souris CD34^{-/-} ne présentent que quelques défauts mineurs (Cheng et al., 1996; Suzuki et al., 1996). Chez l'homme, la combinaison CD34⁺CD38⁻ permet d'enrichir une population en CSHs dans le foie fœtal, le cordon ombilical, la MO fœtale et la MO adulte (Issaad et al., 1993; Huang and Terstappen, 1994; Muench et al., 1994; Hao et al., 1995; Reems and Torok-Storb, 1995; Roy et al., 1997).

CD31 ou Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)

La glycoprotéine CD31 est un membre de la superfamille des immunoglobulines (Newman et al., 1990) jouant un rôle dans la motilité des leucocytes à travers la paroi des vaisseaux (Newman, 1994). Elle est exprimée à la surface des plaquettes et leucocytes humains ainsi qu'à la jonction entre les CE (Ohto et al., 1985; Goyert et al., 1986; Albelda et al., 1990). Les souris CD31^{-/-} présentent une dérégulation lymphocytaire B ainsi qu'un défaut de maturation des précurseurs B (Wilkinson et al., 2002). La quantité de lymphocytes B de ces souris augmente excessivement après stimulation anti-IgM (Immunoglobuline M). Ces résultats indiquent que le CD31 régule négativement la signalisation lymphocytaire B. Au cours du développement embryonnaire, l'analyse phénotypique des CSHs du SV, du FF et de la MO adulte a montré que le CD31 est exprimé par ces cellules (Baumann et al., 2004). Les auteurs ont en effet montré à partir de SV E9.5 que contrairement aux cellules CD31⁻ckit⁺, les cellules CD31⁺ckit⁺ possèdent des propriétés multilignages *in vivo*.

ckit ou CD117

Le proto-oncogène ckit code pour un RTK appartenant à la famille de récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes CSF-1-PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Qiu et al., 1988). Les embryons homozygotes mutés pour leur gène ckit meurent d'anémie sévère au moment de la naissance (Nocka et al., 1990b). Le récepteur ckit ainsi que son ligand jouent donc un rôle essentiel dans l'hématopoïèse adulte. Le Stem Cell Factor (Scf) est le ligand de ckit et à été identifié la même année que ckit par plusieurs équipes (Huang et al., 1990; Nocka et al., 1990a; Williams et al., 1990; Zsebo et al., 1990). Grâce à des anticorps antagonistes anti-ckit, les travaux d'Ogawa et al. ont montré que ce récepteur est essentiel pour l'hématopoïèse de la MO, particulièrement pour la régulation de la survie, de la prolifération et de l'autorenouvellement des CSHs *in vivo* (Ogawa et al., 1991; Broudy, 1997; Kent et al., 2008).

La Ve-Cadhérine (VeCad) ou CD144

La Ve-Cad est une protéine endothéliale impliquée dans l'adhésion cellulaire chez l'adulte comme chez l'embryon (Breier et al., 1996; Carmeliet et al., 1999). Alors que le phénotype hétérozygote VeCad^{+/-} est tout à fait viable, les embryons VeCad^{-/-} meurent à E9.5, conséquence de l'absence totale de vasculogénèse au niveau du SV et de l'embryon (Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999). Ce marqueur de surface se révèle en effet être essentiel pour le maintien des CE. En plus de son rôle dans l'adhésion, il est impliqué dans la prolifération et l'apoptose, et régule également l'activité des facteurs de croissance vasculaires endothéliaux (Dejana, 2004; Vestweber, 2008). Il est exprimé de façon transitoire lors de l'émergence et de la maturation des CSHs. Son expression diminue au niveau du FF et n'est plus détectée dans la MO (Fraser et al., 2002; Kim et al., 2005; Taoudi et al., 2005).

Chez l'homme, les travaux d'Oberlin et al. montrent qu'une population particulièrement enrichie en CSHs dans le foie à 7-8 SG exprime la VeCad (Oberlin et al., 2010b).

CD45 (Ly5) ou Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type C (Ptpcr)

Le marqueur pan-leucocytaire CD45 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée exclusivement par les CHs nucléées ; les érythrocytes et les plaquettes ne l'expriment pas (Thomas, 1989; Trowbridge and Thomas, 1994). Le CD45 apparaît comme nécessaire au développement lymphocytaire T puisque les souris invalidées pour le gène CD45 présentent une maturation des thymocytes incomplète, et très peu de lymphocytes T sont détectables (Kishihara et al., 1993). A l'inverse, la lymphopoïèse B n'est pas touchée. Contrairement au CD41, le CD45 n'est pas exprimé par les CSHs émergeant dans la région AGM E10.5. En revanche à E11.5, les CSHs de l'aorte commencent à exprimer ce marqueur (North et al., 2002; Matsubara et al., 2005). Cependant, toutes les cellules des clusters n'expriment pas le CD45 et les cellules qui l'expriment sont localisées principalement dans la région non basale des clusters et présentent la forme sphérique caractéristique des CHs (Yokomizo and Dzierzak, 2010).

Sca-1 (Ly6a)

La glycoprotéine Sca-1 est un membre de la famille Ly-6 (van de Rijn et al., 1989). Il est utilisé chez la souris en tant que marqueur de CSHs embryonnaires dans différents organes tels que le SV, le FF ou encore la MO adulte (Spangrude et al., 1988a; Spangrude et al., 1988b; Huang and Auerbach, 1993; Ma et al., 2002). Lors du développement embryonnaire, il commence à être exprimé dans le SV et l'AGM à E10.5-E11 (Marcos et al., 1997; Miles et al., 1997; de Bruijn et al., 2002). Chez l'adulte, il est retrouvé dans certaines cellules du thymus, de la rate et des nodules lymphatiques ainsi que dans la vasculature du cerveau (Spangrude et al., 1988a; Cray et al., 1990).

AA4.1 ou CD93

Protéine transmembranaire de type I, AA4.1 a été identifiée à l'origine comme marqueur du lignage B (McKearn et al., 1985). Elle joue également un rôle dans les interactions cellulaires au cours du développement hématopoïétique et vasculaire (Petrenko et al., 1999). Les souris AA4.1^{-/-} étant viables et ne présentant pas de défauts majeurs au moment du développement embryonnaire, il est difficile d'aller plus loin dans la détermination du rôle exact de ce marqueur de surface (Norsworthy et al., 2004). Trois principaux types cellulaires expriment le AA4.1 : les CE vasculaires, les cellules de p-Sp à potentiel hématopoïétique (Godin et al., 1995) et les progéniteurs hématopoïétiques/CSHs du FF (Jordan et al., 1990; Jordan et al., 1995). Il est également exprimé par les précurseurs hématopoïétiques du SV à partir d'E9 (Huang and Auerbach, 1993; Ray et al., 1996).

CD105 ou endogline

Identifié à l'origine grâce à l'Ac monoclonal 44G4 dirigé contre la lignée cellulaire HOON composée de cellules leucémiques pré-B (Quackenbush and Letarte, 1985), le CD105 est un récepteur glycoprotéique transmembranaire capable de lier plusieurs facteurs de croissance appartenant à la famille des TGF- β , notamment TGF- β 1, - β 3, BMP2 et 7 (Barbara et al., 1999). Le marqueur CD105 est exprimé par les CE humaines des capillaires, artérioles et veinules d'une grande variété de tissus (Quackenbush and Letarte, 1985; Quackenbush et al., 1986; Gougos and Letarte, 1988). Il est également présent au niveau des CSHs de la MO (Pierelli et al., 2001; Chen et al., 2002). Certaines mutations dans le gène CD105 menant à des haploinsuffisances sont associées chez l'homme à une maladie vasculaire autosomique dominante appelée maladie de « Rendu-Osler-Weber » ou télangiectasie hémorragique familiale (McAllister et al., 1994). Les travaux de Roques et al. chez la souris montrent que le CD105 est exprimé au niveau des clusters aortiques et que plus le degré d'expression du CD105 est élevée, plus la CH concernée est immature (Roques et al., 2012). Les auteurs indiquent en effet que la population CD105^{hi} est plus enrichie en LT-CSHs que ne l'est la population CD105^{med}. L'inactivation partielle du CD105 conduit à un profil hémorragique des embryons qui présentent des défauts vasculaires importants (Bourdeau et al., 1999). Les souris CD105^{-/-} meurent à E10.5 suite à des anomalies cardiaques et vasculaires majeures (Bourdeau et al., 1999; Arthur et al., 2000). Une étude sur les cellules ES CD105^{-/-} révèle que les érythropoïèses primitive et définitive sont fortement altérées (Cho et al., 2001). Le CD105 est pourtant exprimé à des stades bien plus précoces. En effet, les CE l'expriment entre E8.5 et E10.5 et il est également retrouvé au niveau de l'ectoderme extra-embryonnaire entre E6.5 et E7.5 (Hirashima et al., 2004; Ema et al., 2006) ; ces résultats suggèrent que le CD105 joue un rôle dans l'embryon très précoce.

CD150, CD48 et CD244

Les protéines CD150, CD48 et CD244 sont des marqueurs de la famille SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) et leur expression a été étudiée au cours de la mise en place de l'hématopoïèse embryonnaire. Le marqueur de surface CD150 a été le premier membre de la famille à être identifié et avait été associé à l'origine à l'activation et la prolifération lymphocytaire (Howie et al., 2002; Wang et al., 2004), d'où le nom de la famille d'appartenance de ces récepteurs. La combinaison CD150⁺CD244⁻CD48⁻ a récemment été décrite comme caractéristique des CSHs du FF et de la MO adulte (McKinney-Freeman et al., 2009). Les marqueurs de surface CD150, CD48 et CD244 sont exprimés différenciellement sur les CHs selon leur degré d'immaturité : CD150 est exprimé par les CSHs du FF et de la MO mais plus par les MPP ; le CD244 commence à être exprimé au niveau des MPP, et CD48 est exprimé seulement par des précurseurs déjà engagés dans une voie de

différenciation hématopoïétique (Kiel et al., 2005; Kim et al., 2006; Yilmaz et al., 2006). Chez l'homme, les marqueurs de la famille SLAM sont exprimés au niveau des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs mais leur expression est différente de celle observée chez la souris (Sintes et al., 2008) et la combinaison CD150⁺CD244⁻CD48⁻ n'est pas pertinente pour enrichir une population en CSHs.

MyeloProliferative Leukemia ou Mpl

A l'origine, Mpl (CD110) et son ligand la thrombopoïétine (TPO) ont été décrits comme jouant un rôle très important dans la mégacaryopoïèse (processus de différenciation hématopoïétique aboutissant à la fabrication des mégacaryocytes) et dans la thrombopoïèse (élaboration des plaquettes sanguines) (de Sauvage et al., 1994; Gurney et al., 1994; Kaushansky, 1995; de Sauvage et al., 1996). Outre ses fonctions de stimulation de la prolifération des progéniteurs engagés dans la voie mégacaryocytaire, le couple Mpl/TPO joue également un rôle important dans la régulation de la survie des CSHs. Agissant en synergie avec l'IL-3 et le Scf, elle promeut via Mpl la prolifération et la différenciation *in vitro* des CSHs murines mais aussi humaines (Kobayashi et al., 1996; Sitnicka et al., 1996). Ces résultats se sont confirmés *in vivo* notamment grâce à des expériences de reconstitutions hématopoïétiques à partir de populations triées de FF E14.5 ou de MO adulte qui montrent que le potentiel hématopoïétique ségrège avec l'expression de Mpl (Solar et al., 1998; Yoshihara et al., 2007). Par ailleurs, l'inactivation du gène de la TPO ou de Mpl chez la souris mène à une thrombocytopenie sévère et à une diminution significative du nombre de progéniteurs hématopoïétiques/CSHs, confirmant le rôle du couple Mpl/TPO dans le maintien des CHs primitives (Carver-Moore et al., 1996; Kimura et al., 1998; Ballmaier et al., 2001).

La souris Mpl^{-/-} invalidée pour le gène Mpl (Gurney et al., 1994), présente un nombre de mégacaryocytes et de plaquettes diminué de 85% par rapport à celui d'une souris contrôle, tandis que les autres CHs différenciées et matures sont présentes en quantité normale. Ceci suggère un mécanisme de compensation pour les étapes finales de maturation hématopoïétique, palliant ainsi l'absence de Mpl. Par ailleurs, la concentration de TPO circulante est très élevée dans ces souris. Voulant mieux comprendre le déficit mégacaryocytaire des souris Mpl^{-/-} observé par Gurney et al., l'équipe de Metcalf a montré que le compartiment des progéniteurs mégacaryocytaires est touché et que leur nombre est diminué (Alexander et al., 1996). Durant le développement embryonnaire, le défaut en mégacaryocytes matures est détectable dès E14.5 dans le FF alors que le défaut en progéniteurs mégacaryocytaires ne s'observe qu'aux alentours de la naissance. Le couple Mpl/TPO joue donc un rôle important durant l'embryogenèse et est impliqué notamment dans la production de progéniteurs mégacaryocytaires. De façon surprenante, une injection de 5-FU permet aux souris

$Mpl^{-/-}$ de produire à nouveau un nombre normal de progéniteurs, mégacaryocytes et plaquettes, et ce par un mécanisme indépendant de la TPO (Levin et al., 2001). Les travaux de Challier et al. en 2002 ont montré d'une part que le domaine intracytoplasmique du récepteur Mpl est actif uniquement dans les progéniteurs hématopoïétiques du FF, et d'autre part que Mpl favorise l'engagement hématopoïétique des cellules ES, confirmant l'importance de ce récepteur au cours du développement embryonnaire (Challier et al., 2002). Par la suite, l'équipe de Souyri a montré que Mpl joue un double rôle dans l'établissement de l'hématopoïétique définitive chez la souris : tout d'abord au niveau de l'émergence des premières CSHs dans la région AGM, puis au niveau de l'amplification et de la survie de ces CSHs lors de leur passage dans le FF (Petit-Cocault et al., 2007). Des cultures de CHs ($CD34^{+}ckit^{+}$ et $CD45^{+}ckit^{+}$) issues d'AGM E10.5 $Mpl^{-/-}$ ont permis de montrer qu'il y avait un défaut d'expansion de ces cellules. L'apoptose étant un phénomène très important lors de la mise en place des CSHs *in vivo* (Orelia et al., 2004), les auteurs se sont demandé si le défaut d'expansion observé n'était pas lié à une augmentation de l'apoptose. De fait, il s'est avéré que les gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L sont sous-exprimés au niveau de l'AGM E10.5 des souris $Mpl^{-/-}$. Au même stade, le pourcentage d'annexine V, marqueur des cellules en apoptose, est plus élevé dans les CHs $Mpl^{-/-}$ que dans les CHs témoins. Il a donc été conclu que Mpl joue un rôle particulièrement important dans la régulation des molécules impliquées dans l'autorenouvellement, la prolifération ou encore l'apoptose des CHs au cours du développement embryonnaire (Fleury et al., 2010).

5.3 - Les populations enrichies en CSHs chez la souris

Au niveau des différents organes hématopoïétiques embryonnaires (AGM, SV, PI et FF) et adultes (MO), de nombreuses combinaisons de marqueurs de surface ont successivement été décrites comme permettant d'enrichir des populations en CSHs. Elles permettent d'isoler et d'étudier des populations à un moment donné du développement embryonnaire dans un organe particulier et je me suis attachée à les décrire dans ce paragraphe pour la région p-Sp/AGM, le SV, le PI, le FF et la MO adulte. A l'heure actuelle, l'enrichissement en CSHs est le seul moyen pour étudier ces cellules. En effet, il n'a pas encore été possible de déterminer un phénotype spécifique aux CSHs pour chaque organe embryonnaire, ni de définir précisément la succession de phénotypes par lesquels passent les CSHs à partir de leur émergence jusqu'à leur établissement dans la MO (Tableau 3).

	E9.5	E10.5	E11.5	E12.5	E13.5	E14.5	adulte					
p-Sp	CD34 ⁺ ckit ⁺											
AGM								CD45 ⁺ CD41 ⁺ Endomucine ⁺ CD144 ⁺ CD45 ⁺	CD34 ⁺ ckit ⁺ CD144 ⁺ CD45 ⁺ CD45 ⁺ CD41 ⁺ Endomucine ⁺	ND		
SV	CD34 ⁺ ckit ⁺ AA4.1 ⁺ ckit ⁺							ND	ND	CD144 ⁺ CD45 ⁺	ND	ND
PI	ND							ND	ND	CD34 ⁺ ckit ^{hi} CD34 ⁺ ckit ⁺ Sca-1 ⁺ CD150 ⁺ CD48 ⁻	ND	ND
FF									CD34 ⁺ ckit ⁺	CD34 ⁺ ckit ^{hi}	CD144 ⁺ CD45 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ ckit ⁺ Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ Sca-1 ⁺ AA4.1 ⁺ ckit ⁺ Mpl ⁺
MO adulte (Lin⁻)												

Tableau 3 : Les différentes populations enrichies en CSHs

Parties grisées : organes non présents aux stades annoncés. Abréviations utilisées : ND Non Déterminé ; Lin⁻ ou Lineage⁻ correspond à une population n'exprimant pas les marqueurs des précurseurs hématopoïétiques déjà engagés dans leur processus de différenciation (CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD8⁻B220⁻Gr-1⁻Ter119⁻) ; Rh Rhodamine.

Le sac vitellin

Comme montré pour la p-Sp E9, la population CD34⁺ckit⁺ du SV E9 est capable de reconstituer le système hématopoïétique de souriceaux nouveaux-nés (Yoder et al., 1997a). En 2009, les travaux de Yamane et al. montrent que la population AA4.1⁺ckit⁺ du SV E9.5 est capable de former des colonies à potentiel myéloïde et lymphoïde en culture (Yamane et al., 2009). Enfin, les résultats *in vivo* de Taoudi et al. indiquent que la population CD144⁺CD45⁺ du SV E12.5 contient des LT-CSHs (Taoudi et al., 2005).

La région p-Sp/AGM

La population CD34⁺ckit⁺ de la p-Sp E9 est décrite comme étant enrichie en pré-CSHs puisqu'elle est capable de reconstituer le système hématopoïétique de souriceaux nouveaux-nés (Yoder et al., 1997a). Dans l'AGM E10.5, la population CD144⁺CD45⁻ acquiert un potentiel de reconstitution hématopoïétique chez l'adulte après coculture sur cellules OP9 (Rybtsov et al., 2011). Par ailleurs

Matsubara a montré que la population $CD45^+CD41^+Endomucine^+$ est capable de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris adulte lorsqu'elle est injectée directement dans la MO mais son potentiel de reconstitution reste limité. A E11.5, cette même population améliore grandement son potentiel de reconstitution et acquiert le CD45 (Matsubara et al., 2005). Au même stade, la population $ckit^+$ a été décrite comme étant très enrichie en CSHs, lesquelles expriment également fortement le CD34 (Sanchez et al., 1996). Environ une décennie plus tard, les travaux de Taoudi et al. montrent qu'au même stade, la population $(VeCad^+)CD144^+CD45^+$ est également enrichie en CSHs (Taoudi et al., 2005; Taoudi et al., 2008). Elle perd l'expression du CD144 une fois arrivée dans le FF, mais il a été montré que cette perte d'expression n'est pas liée au contact du microenvironnement du FF.

Le placenta

Au moment du pic d'activité hématopoïétique placentaire à E12.5, les CSHs du PI ont un phénotype $CD34^+ckit^{hi}$ (Gekas et al., 2005) et expriment également le marqueur Sca-1 (Ottersbach and Dzierzak, 2005). A ce stade, elles perdent en partie le marqueur CD144 (Taoudi et al., 2005). En 2009, McKinney-Freeman et al. montrent que contrairement aux CSHs adultes, ces cellules n'expriment pas les marqueurs CD150 et CD48 (McKinney-Freeman et al., 2009).

Le foie fœtal

Dans le FF E11.5, Sanchez et al. montrent que la population $CD34^+ckit^+$ est enrichie en CSHs (Sanchez et al., 1996). Ce phénotype est repris par l'équipe de Mikkola en 2005 qui ajoute que les CSHs du FF E12.5 sont en réalité incluses dans la fraction exprimant fortement le $ckit$ ($CD34^+ckit^{hi}$) (Gekas et al., 2005). Toutefois, Taoudi et al. indiquent que les populations $CD144^+CD45^+$ et $CD144^-CD45^+$ du FF E13.5 sont aussi enrichies en CSHs (Taoudi et al., 2005). L'équipe de Morrison met en évidence la perte de l'expression du CD144 à partir d'E13.5 dans le FF, ce qui indique que la population $CD144^+CD45^+$ est une population transitoire (Kim et al., 2005). A E14.5, Zeigler et al. montrent à la fois *in vivo* et *in vitro* que les populations $Lin^-AA4.1^+CD34^+ckit^+$ et $Lin^-Sca-1^+AA4.1^+$ (LSA) du FF sont très enrichies en CSHs. Étant donné que les cellules $Sca-1^+AA4.1^+$ sont toutes CD34 à ce stade, il conclut que les CSHs du FF sont contenues dans la population $Lin^-CD34^+ckit^+Sca-1^+AA4.1^+$ (Zeigler et al., 1994). Les travaux de Jordan et al. montrent également que la population LSA du FF E14.5 possède un fort pouvoir de reconstitution hématopoïétique (Jordan et al., 1995). Enfin, les travaux de Solar et al. montrent que le potentiel hématopoïétique du FF E14.5 est contenu dans la population $Sca-1^+AA4.1^+ckit^+Mpl^+$ (Solar et al., 1998).

La moelle osseuse adulte

Plusieurs combinaisons de marqueurs ont successivement été décrites au cours des années 1990 comme permettant un enrichissement en CSHs conséquent dans la MO : Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺ (Okada et al., 1992), Lin⁻Thy1.1^{lo}Sca-1⁺ (Uchida and Weissman, 1992; Uchida et al., 1994), Lin⁻Thy1.1^{lo}Sca-1⁺Mac-1⁻CD4⁻ (Morrison and Weissman, 1994), Lin⁻Thy1.1^{lo}Sca-1⁺Rh123^{lo} (Spangrude et al., 1995), Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺CD34^{lo/-} (Osawa et al., 1996) et Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺CD150⁺CD48⁻ (Yilmaz et al., 2006). Osawa et al. ont montré qu'une seule cellule Lin⁻Sca-1⁺ckit⁺CD34^{lo/-} est capable de reconstituer à long terme le système lymphopoiétique d'une souris létalement irradiée (Osawa et al., 1996).

CHAPITRE VI - IMPORTANCE DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE

Depuis le moment où elles émergent jusqu'au moment où elles colonisent la MO, les CSHs se retrouvent au contact de microenvironnements spécialisés nommés « niches » constitués de cellules particulières sécrétant les facteurs nécessaires au maintien de leurs propriétés souches (autorenouvellement et multipotence). Ces niches accueillent les CSHs soit de façon transitoire (SV, le PI et le FF), soit définitivement comme c'est le cas pour la MO, organe pour lequel la niche a été la mieux caractérisée. L'approfondissement des mécanismes régulant l'ensemble de ces niches devrait faciliter le développement de nouvelles méthodes *in vitro* de génération, amplification et différenciation des CSHs. Je m'attacherai dans cette partie à décrire ce qui est aujourd'hui connu de chacune de ces niches.

Le sac vitellin

Le microenvironnement de la niche du SV au cours des étapes précoces du développement embryonnaire est encore très mal défini. Toutefois, certaines molécules impliquées ont été récemment décrites. A E8.5, les CE sécrètent du Transforming Growth Factor 1 (TGF β 1), du Scf et de l'angiopoïétine, tandis que les cellules de l'endoderme viscéral sécrètent de l'angiopoïétine ; les érythrocytes primitifs (EryP) expriment les trois récepteurs correspondants, respectivement TGF β R1, ckit et Tie-2 (Isern et al., 2011). Ainsi, l'activité des EryP est probablement contrôlée par les facteurs de croissance produits par les CE et les cellules endodermes du SV précoce. De façon intéressante, le TGF β 1 est aussi exprimé par les EryP, laissant la possibilité d'une signalisation autocrine et/ou paracrine. Par ailleurs, la nature hypoxique du SV est essentielle pour la prolifération et la survie des progéniteurs hématopoïétiques (Adelman et al., 1999; Isern et al., 2011). La protéine Hedgehog est également nécessaire à l'hématopoïèse précoce de l'embryon (Dyer et al., 2001). Enfin, chez l'oiseau, une étude a mis en évidence l'effet potentialisateur de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) dans l'apparition des CHs du SV (Gordon-Thomson and Fabian, 1994).

La région p-Sp/AGM

Bien que le microenvironnement de la région p-Sp/AGM ne fasse pas partie de ce qui est défini comme étant une « niche d'accueil » de CSHs, plusieurs signaux moléculaires ont été décrits comme étant nécessaires pour l'apparition des CSHs dans l'aorte. Ainsi, cette région pourrait être qualifiée

de « niche d'émergence » pour les CSHs. La régulation intrinsèque des CSHs de l'AGM a été en partie caractérisée. L'expression de Runx1 (facteur clé dans l'hématopoïèse aortique) dans l'endothélium aortique est indispensable à la formation des clusters (North et al., 1999), et le récepteur transmembranaire Notch1 est essentiel aux CE pour qu'elles puissent générer des CSHs (Kumano et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs études indiquent que la régulation extrinsèque des CSHs de la région AGM est importante. Les travaux de Robin et al. suggèrent que l'IL-3 régule la prolifération et la survie des CSHs aortiques (Robin et al., 2006), tandis que l'équipe de Dzierzak indique que l'IL-1 intervient en tant que régulateur homéostatique lors de l'émergence des CSHs en limitant leur différenciation vers la voie myéloïde (Orelia et al., 2008). L'ubiquitine ligase Mind bomb-1, régulateur des ligands des récepteurs Notch, serait impliquée dans l'activité hématopoïétique des CE aortiques ainsi que dans celle des SAPs (Yoon et al., 2008). Le mésenchyme sous-aortique joue également un rôle important à travers les voies de signalisations BMP et Hedgehog (Marshall et al., 2000; Durand et al., 2007; Peeters et al., 2009; Wilkinson et al., 2009). Enfin à E10.5 chez la souris, le couple Mpl/TPO joue un rôle à la fois dans la transition endothélio-hématopoïétique via l'activation de Runx1, et dans l'émergence des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs via l'activation de Meis1 et HoxB4 (Fleury et al., 2010).

Dans le but d'étudier certaines populations enrichies en CSHs *in vitro* tout en permettant à ces CSHs de pouvoir se nicher comme elles le font *in vivo*, certaines lignées stromales présentant des propriétés de support hématopoïétique ont été établies à partir de cellules murines issues de la région p-Sp/AGM (Ohneda et al., 1998; Xu et al., 1998; Oostendorp et al., 2002a; Oostendorp et al., 2002b).

Le placenta

L'existence d'un microenvironnement placentaire, favorable au maintien et à l'amplification d'un grand nombre de progéniteurs hématopoïétiques/CSHs, a été décrit pour la première fois en 2003 (Alvarez-Silva et al., 2003). Les auteurs ont montré que des précurseurs clonogéniques sont détectables dans le PI dès E9.5 (20 somites), un peu après leur détection dans l'embryon (18 somites) et dans le SV (15 somites). Jusqu'à E12.5, le nombre total de colonies obtenues dans le PI est très important mais après E13.5, le microenvironnement placentaire semble changer drastiquement puisque le nombre de progéniteurs/CSHs détectables devient proche de zéro (Gekas et al., 2005). La cause de ce déclin brutal n'a pas été déterminée à ce jour, mais il semblerait qu'il soit dû à un changement au niveau du microenvironnement qui ne devient plus capable de supporter l'hématopoïèse.

A l'heure actuelle, les signaux impliqués dans la maturation, la prolifération et la migration des CSHs dans le PI sont encore mal définis. Comme de nombreux mutants murins comportant des défauts placentaires pratiquement tous létaux l'ont prouvé, la formation du PI est une étape déterminante pour le bon développement de l'embryon. Ces défauts peuvent provenir de l'allantoïde, du trophoblaste ou encore des composants maternels du PI (Rossant and Cross, 2001). Les signaux de la niche placentaire sont issus du réseau vasculaire du labyrinthe dans lequel les CSHs résident transitoirement durant le développement (voir §2.4.2). L'équivalent du labyrinthe dans le PI humain réside dans les villosités placentaires, région dans laquelle ont lieu tous les échanges materno-fœtaux. Il est intéressant de noter que plusieurs types cellulaires dérivés du lignage trophoblastique (cellules géantes trophoblastiques, spongiotrophoblastes et syncytiotrophoblastes) sont localisées dans le labyrinthe chez la souris et dans les villosités placentaires chez l'homme, et expriment une variété de facteurs de croissance et de molécules de signalisation déjà décrits comme jouant un rôle important dans la biologie des CSHs, ce qui est le cas du Platelet Derived Growth Factor-B (PDGF-B) (Goustin et al., 1985; Holmgren et al., 1991; Holmgren et al., 1992; Leveen et al., 1994; Ohlsson et al., 1999; Kaminski et al., 2001; Chhabra et al., 2012), du Placenta Growth Factor (PlGF) (Hattori et al., 2002), de l'Insuline-like Growth Factor 2 (Igf2) (Constancia et al., 2002; Zhang and Lodish, 2004) ou encore du LIF (Takahashi et al., 2003). Le degré d'hypoxie joue probablement un rôle important dans la niche placentaire puisqu'une étude chez l'homme montre qu'un niveau d'oxygène trop important en culture bloque la prolifération des cellules trophoblastiques du PI (Genbacev et al., 1997).

D'autres facteurs régulateurs semblent également faire partie de la niche placentaire. Alors que l'IL-3 est manifestement importante au niveau de l'AGM en tant que facteur de prolifération et/ou de survie pour les CSHs émergentes, les travaux de Robin et al. montrent qu'elle n'est pas exprimée par la niche placentaire à E10 (Robin et al., 2006), résultats confirmés par Sasaki et al.. En revanche à E11, l'IL-3 régule la prolifération des CSHs dans le PI. L'absence d'expression des facteurs Runx1 ou d'Evi-1 entraîne la perte des clusters du labyrinthe, tandis que celle du facteur cMyb entraîne une augmentation de leur taille (Sasaki et al., 2010). Les auteurs montrent également que les CE régulent les clusters grâce à la signalisation Scf/ckit. Chez l'homme, les travaux de Robin et al. ont montré que les cellules périvasculaires « pericyte-like » font partie de la niche placentaire (Robin et al., 2009).

Comme nous l'avons vu plus haut pour la région p-Sp/AGM, l'équipe de McNiece a généré à partir de PI une lignée de cellules stromales supportrices de l'hématopoïèse (Wang et al., 2011).

Le foie fœtal

A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur la niche des CSHs du FF ainsi que sur les signaux impliqués dans la maturation et l'amplification de ces cellules. La quantité de CSHs s'accroît très rapidement dans le FF alors que dans la MO, la plupart des CSHs sont quiescentes, c'est pourquoi la niche du FF a dans un premier temps été comparée à celle de la MO. Il a été montré que les CSHs du FF participent bien plus activement à la reconstitution du système hématopoïétique lors de leur injection dans des souris létalement irradiées que ne le font les CSHs de la MO (Morrison et al., 1995; Rebel et al., 1996b; Harrison et al., 1997), ce qui suggère un certain nombre de différences concernant les niches respectives de ces CSHs.

Contrairement aux signaux de la niche de la MO, les signaux de la niche du FF permettent manifestement aux CSHs de se diviser de façon symétrique, créant ainsi deux CSHs à partir d'une seule et augmentant le nombre total de CSHs au sein de l'organe. Grâce à la lignée stromale AFT024 issue de FF E14.5, Moore et al. ont tenté d'identifier les molécules clés secrétées par le microenvironnement du FF promouvant l'amplification des CSHs *in vivo*. Deux gènes, delta-like/preadipocyte factor-1 (dlk/pref-1) (Moore et al., 1997b) et Wnt-5a (Hackney et al., 2002), ont ainsi été mis en évidence et jouent probablement un rôle important dans la niche du FF. Les fonctions réelles des produits d'expression de ces gènes restent toutefois à déterminer. Trois autres études ont identifié des facteurs régulateurs de l'hématopoïèse intervenant au niveau du FF : HoxB3 et HoxB4 régulent la prolifération des CSHs (Bjornsson et al., 2003), Pu.1 intervient dans le maintien ou l'expansion des CSHs (Kim et al., 2004), et Cited2 permet le maintien de l'homéostasie hématopoïétique (Chen et al., 2007).

Les travaux de Takeuchi et al. montrent qu'en plus de promouvoir le maintien du potentiel souche et la prolifération des CSHs, la niche du FF est capable de modifier les caractéristiques des CSHs en provenance de l'AGM (Takeuchi et al., 2002). En effet, après coculture sur un stroma de cellules non hématopoïétiques issu de FF E14.5, les CSHs CD34⁺ckit⁺ de l'AGM E11.5 produisent bien plus de CHs que ne le font les cellules de FF E14.5 ou E18.5, et ont un potentiel de reconstitution hématopoïétique augmenté. Deux équipes se sont alors penchées sur l'étude des différentes cellules du FF en tant que niche potentielle de CSHs.

Zhang et Lodish ont montré que la population CD3⁺Ter119(Ly76)⁻ du FF est capable de supporter l'amplification de CSHs *in vitro* (Zhang and Lodish, 2004). Bien que l'identité de cette population ne soit pas connue *in vivo*, l'analyse de son transcriptome a permis l'identification de molécules clés telles que Igf2 et certaines protéines angiopoïétine-like (Zhang and Lodish, 2004; Zhang et al., 2006). Utilisées seules ou en association avec d'autres facteurs de croissance, ces molécules supportent la

survie et/ou l'amplification des CSHs en culture. Les auteurs montrent également que le récepteur à l'Igf2 est exprimé dans la MO, preuve du rôle de cette molécule dans le maintien des CSHs. Reste à déterminer si les propriétés des cellules CD3⁺Ter119(Ly76)⁻ sont restreintes uniquement au FF où si elles peuvent être retrouvées dans d'autres organes hématopoïétiques (thymus, rate, MO) et à d'autres moments du développement embryonnaire.

Sugiyama et al. ont récemment étudié les trois types de cellules du FF séparément (hépatoblastes, CE sinusoïdes et CHs) afin de déterminer leur capacité respective à servir de niche hématopoïétique pour les CHs/CSHs (Sugiyama et al., 2011). Les analyses des ARNm montrent que les hépatoblastes exprimant dlk-1 (Tanimizu et al., 2003) expriment aussi les cytokines érythropoïétiques EPO et Scf. Par analyses immunohistochimiques et par test ELISA, les auteurs indiquent que seuls les hépatoblastes expriment l'EPO. Par ailleurs, ils observent une diminution de l'expression de l'EPO et de Scf ainsi qu'une diminution de l'érythropoïèse dans le FF d'embryons de souris transgéniques dépourvus d'hépatoblastes. L'équipe de Miyajima a montré que l'oncostatine M sécrétée par les CHs CD45⁺ est impliquée dans le développement des hépatocytes, descendants directs des hépatoblastes qui expriment le récepteur à l'oncostatine M (OSMR) (Kamiya et al., 1999; Miyajima et al., 2000). De fait, les souris OSMR^{-/-} sont viables mais présentent une hématopoïèse altérée (Tanaka et al., 2003). L'ensemble de ces données suggèrent que les hépatoblastes constituent une niche pour les CSHs du FF.

Dans le but de mimer le microenvironnement du FF *in vitro*, la lignée de cellules AFT024 issue de FF E14.5 a été générée par Moore et al. (Moore et al., 1997a). Elle est capable de supporter l'hématopoïèse murine aussi bien qu'humaine (Hackney et al., 2002; Nolte et al., 2002; Punzel et al., 2002).

La moelle osseuse

Au cours du développement embryonnaire, la migration des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs vers la MO vers E15.5, processus nommé « homing », a lieu alors que la formation des os n'est pas encore terminée. C'est au cours de la troisième semaine de gestation que l'architecture osseuse se développe chez la souris, simultanément avec la mise en place d'un microenvironnement très particulier pour les CSHs. Au sein des premières condensations mésenchymateuses observables à E12.5, des chondrocytes sont générés ce qui crée une charpente cartilagineuse de base pour la formation du squelette (Olsen et al., 2000). Les ostéoblastes remplacent ensuite les chondrocytes, générant par la même une calcification osseuse. La vascularisation des os en cours de développement permet le début de la colonisation hématopoïétique de la MO.

Dans la MO adulte, Lord et al. sont les premiers à indiquer que les CSHs sont en étroite association avec la surface interne de l'os (Lord et al., 1975). Quelques années plus tard, Schofield et al. proposent le terme de niche en montrant que les CSHs sont en réalité en contact étroit avec d'autres types cellulaires, et que ce contact cellule-cellule permet leur autorenouvellement tout en limitant leur prolifération et leur différenciation (Schofield, 1978; Suda et al., 2005; Wilson and Trumpp, 2006). Tout comme pour la niche du SV, l'environnement de la MO est hypoxique, caractéristique nécessaire au maintien des CSHs (Suda et al., 2011). Les travaux de Wilson et al. montrent que l'expression intrinsèque de c-Myc par les CSHs est fortement impliquée au niveau de leur régulation dans le microenvironnement de la MO (Wilson et al., 2004), résultats confirmés par l'équipe de Trumpp (Laurenti et al., 2008). Il existe également de nombreux signaux extrinsèques exprimés par les cellules de la niche hématopoïétique de la MO à destination des CSHs. Ils permettent de réguler la balance entre autorenouvellement et différenciation et maintiennent ainsi l'homéostasie du système hématopoïétique. Ces signaux ainsi que le type de cellules qui les expriment sont détaillés dans les paragraphes qui suivent.

La première évidence morphologique de l'existence d'une *niche endostéale* date de 2003 et montre que certaines CSHs sont en contact étroit avec l'endosteum de l'os, et plus particulièrement avec les ostéoblastes (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Wang et al., 2012) et les ostéoclastes (Kollet et al., 2006) qui le recouvrent. Ces CSHs se localisent au niveau de la paroi endostéale de la région trabéculaire des os longs, tandis que les précurseurs hématopoïétiques déjà engagés sont observés principalement dans la région centrale de la MO (Nilsson et al., 2001; Askenasy et al., 2003). La surface de l'endosteum étant très vascularisée (De Bruyn et al., 1970), la possibilité que les cellules vasculaires puissent jouer un rôle important dans la régulation des progéniteurs hématopoïétiques/CSHs avait déjà été soulevée (voir plus bas). Plusieurs études ont permis l'identification de facteurs sécrétés par les ostéoblastes et intervenant dans le maintien des CSHs tels que des régulateurs positifs comme l'angiopoïétine (Arai et al., 2004) ou négatifs comme l'ostéopontine (Nilsson et al., 2005; Stier et al., 2005). D'autres molécules participent également à la régulation des CSHs. C'est le cas de SDF-1 (Petit et al., 2002; Sugiyama et al., 2006) et de la TPO (Yoshihara et al., 2007) exprimés par les ostéoblastes, mais aussi des ions calcium. En effet, la présence d'une forte concentration en ions calcium au niveau de la région endostéale fait partie des caractéristiques particulières de la MO, permettant à cet organe d'être le lieu de migration privilégié des CSHs matures. Cette hypothèse a été vérifiée par l'équipe de Scadden qui a identifié à la surface des CSHs des récepteurs sensibles au calcium (CaR ou Calcium-Sensing Receptor) (Adams et al., 2006). Les auteurs ont donc étudié le comportement de CSHs déficientes pour ce récepteur, et

malgré le fait qu'elles soient présentes en quantité normale et pleinement fonctionnelles en termes de prolifération, différenciation, migration et homing, un nombre très limité d'entre elles est retrouvé au niveau de la niche endostéale. La grande majorité étant localisée dans les espaces extramédullaires, l'existence d'une niche différente de la niche endostéale a été suggérée. Il n'est en effet pas certain que les cellules endostéales influent directement sur la quantité totale de CSHs de la MO. Au lieu de maintenir le nombre de CSHs par le biais d'un contact direct cellule-cellule, il est également possible qu'elles puissent agir à distance en sécrétant les facteurs adéquats, et ainsi réguler les CSHs nichées dans un microenvironnement voisin (*Figure 30*).

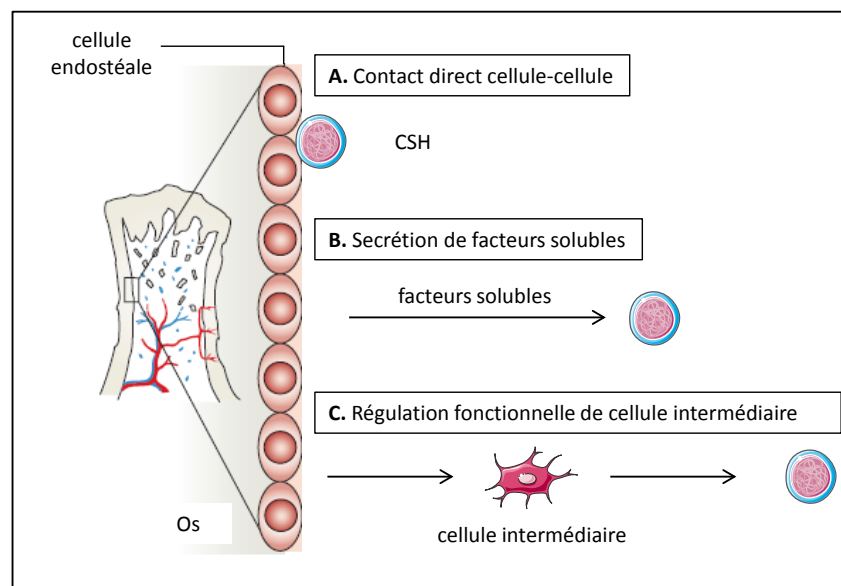


Figure 30 : Mécanismes possibles par lesquels les cellules endostéales contribuent au maintien des CSHs

(A) Les cellules endostéales pourraient réguler directement les CSHs, par contact cellule-cellule. **(B)** Elles pourraient également sécréter des facteurs solubles qui agiraient à distance sur les CSHs. **(C)** Une troisième possibilité serait qu'un troisième type cellulaire soit impliqué, régulé d'un point de vue fonctionnel par les cellules endostéales, créant ainsi une niche hématopoïétique différente de la niche endostéale. Ces trois mécanismes ne sont pas exclusifs et pourraient coexister *in vivo* (d'après Kiel et al., 2008).

C'est en 1996 avec les travaux de l'équipe de Péault que l'existence d'une *niche périvasculaire* dans le MO humaine a été énoncée (Charbord et al., 1996). Depuis, plusieurs études réalisées chez la souris ont montré qu'effectivement, les CSHs sont majoritairement localisées au niveau des vaisseaux sanguins sinusoidaux peuplant la MO (*Figure 31*) (Kiel et al., 2005; Kopp et al., 2005; Kiel et al., 2007;

Kiel and Morrison, 2008). Bien qu'elles soient également exprimées au niveau de la niche endostéale, les cellules réticulaires exprimant SDF-1 (CXCL12-abundant reticular cells, CAR cells) semblent être également des constituants clés de cette niche et jouent un rôle dans le maintien de la quiescence des CSHs de la MO (Sugiyama et al., 2006). Les cellules périvasculaires expriment également Scf qui, en association avec son récepteur ckit, participe à la régulation des CSHs (Kimura et al., 2011; Ding et al., 2012).

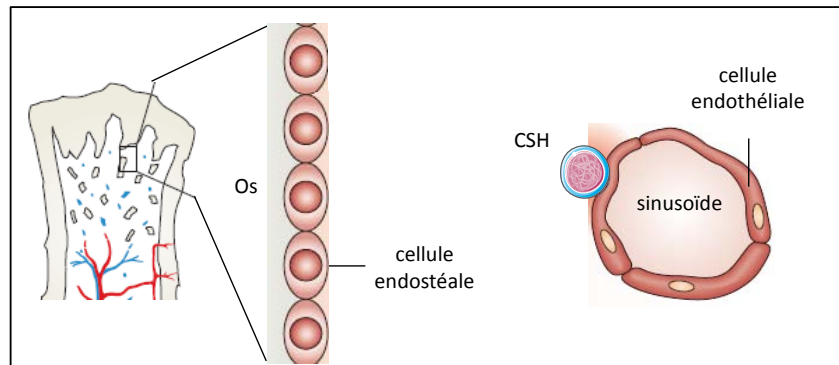


Figure 31 : La niche périvasculaire de la moelle osseuse

En plus de la niche endostéale, la niche périvasculaire permet le maintien dans la moelle osseuse de la majorité des CSHs, localisées au contact des vaisseaux sanguins sinusoiïdaux (d'après Kiel et al., 2008).

Il s'avère que les *progéniteurs mésenchymateux/cellules souches mésenchymateuses* (CSM), localisées à proximité des vaisseaux sanguins de la MO (Shi and Gronthos, 2003), jouent également un rôle important dans le maintien des CSHs (Mendez-Ferrer et al., 2010; Ehninger and Trumpp, 2011). Ils sont également présents en petite quantité au niveau de la niche endostéale. Les travaux de Mendez-Ferrer et al. montrent que les CSHs injectées dans une souris receveuse létalement irradiée viennent se nicher au côté des CSM Nestine⁺. De plus, une déplétion en cellules Nestine⁺ réduit considérablement le homing des progéniteurs hématopoïétiques dans la MO, preuve de l'importance des CSM dans le microenvironnement osseux.

Enfin, Spiegel et al. indiquent que *les cellules du système nerveux* régulent aussi directement ou indirectement les signaux de la niche à destination des CSHs (Spiegel et al., 2008).

Trois lignées cellulaires ont été établies à partir de MO adulte pour permettre de maintenir les CSHs *in vitro* : la lignée S-17 (Collins and Dorshkind, 1987), la lignée Sys-1 (Whitlock et al., 1987), et la lignée MS5 qui reste la plus communément utilisée (Itoh et al., 1989).

Objectifs du travail de thèse

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Nous avons vu au cours de cette introduction que les CSHs effectuent un voyage initiatique dans l'embryon au travers des différents sites et organes hématopoïétiques participant à la mise en place de l'hématopoïèse définitive que sont le SV, l'AGM, le PI et le FF. Cette migration est essentielle pour la maturation de ces CSHs embryonnaires qui vont acquérir au fur et à mesure les caractéristiques de CSHs adultes. Au cours de ce voyage, les CSHs vont également acquérir et/ou perdre certains marqueurs de surface. Finalement, elles vont coloniser les organes hématopoïétiques définitifs (thymus, rate et MO) et permettre ainsi de maintenir l'homéostasie du système sanguin tout au long de la vie adulte. Plusieurs populations cellulaires ont été décrites au cours du développement comme enrichies en CSHs dans différents organes hématopoïétiques. Toutefois, aucune étude comparative entre ces populations n'a été faite, et les résultats actuels de la littérature ne permettent pas de savoir si un phénotype particulier peut être attribué aux CSHs de tous les sites et organes hématopoïétiques embryonnaires quel que soit le stade du développement, ou si les combinaisons de marqueurs varient selon le tissu considéré. Le stade du développement est effectivement important pour étudier ces populations qui, selon l'état de maturation du microenvironnement rencontré, vont pouvoir soit se maintenir à cet endroit soit continuer leur migration dans l'embryon.

Mon travail de thèse s'est axé sur l'étude des CSHs présentes dans les annexes embryonnaires que sont le SV et le PI. Dans un premier temps, j'ai étudié et comparé dans ces deux organes la cinétique d'apparition et les propriétés fonctionnelles *in vitro* de trois populations déjà décrites dans la littérature comme enrichies en CSHs dans les différents sites/organes hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire, et qui sont les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet plus global développé par l'équipe, qui vise à caractériser d'un point de vue fonctionnel et moléculaire les populations les plus enrichies en CSHs dans les sites d'émergence (AGM), d'émergence/amplification (SV) et dans les organes d'amplification (PI) et d'amplification/maturation (FF). Elle est présentée dans la première partie des résultats.

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai utilisé deux modèles de souris transgéniques pour compléter les résultats acquis au niveau du PI :

1. Le modèle de souris transgénique VECR pour déterminer si les populations du PI enrichies en CSHs ont toutes une origine endothéliale ou non.

2. Le modèle de souris $Mpl^{-/-}$ déficient en CSHs adultes, et pour lequel l'équipe de M. Souyri a mis en évidence un défaut de CSHs au cours de la mise en place de l'hématopoïèse définitive. En effet, les CSHs $Lin^{-}Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ présentent un défaut d'amplification et d'autorenouvellement au niveau du FF, et les CSHs du PI présentent également un défaut d'autorenouvellement. Il est donc intéressant de comparer les propriétés fonctionnelles de la population la plus enrichie en CSHs dans le PI de souris C57Bl6 et $Mpl^{-/-}$, et de comparer par la suite les transcriptomes pour mettre en évidence des molécules régulatrices spécifiques de l'amplification des CSHs au niveau du PI.

Matériels et méthodes

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PARTIE I - OBTENTION DES TISSUS

1.1 - Accouplements contrôlés

Les souris sont mises en accouplement durant une nuit, deux femelles pour un mâle. L'observation d'un bouchon vaginal au matin est caractéristique du coït ; ces femelles, potentiellement gestantes, sont isolées. A cet instant, le stade de développement est considéré comme étant E0.5. Au jour désiré, la gestation est confirmée soit par palpation pour les stades précoces (E9.5-E11.5), soit à l'œil nu pour les stades plus tardifs (E12.5-E14.5). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les utérus sont placés en Phosphate Buffer Saline (Gibco) (PBS) 1X/SVF 2% (Sérum de Veau Fœtal, PAN Biotech GmbH) rincés avant dissection. Entre E9.5 et E11.5, le nombre de paires de somites des embryons est compté pour confirmer le stade.

stade de développement	E9.5	E10.5	E11.5
paires de somites	20-25	30-35	40-45

1.2 - Dissection

Une membrane blanche appelée decidua est accolée au PI. Cette membrane d'origine maternelle est minutieusement enlevée pour ne garder que la partie fœtale du PI. Le SV est récupéré après avoir été séparé du PI et de l'embryon (*Figure 32*).

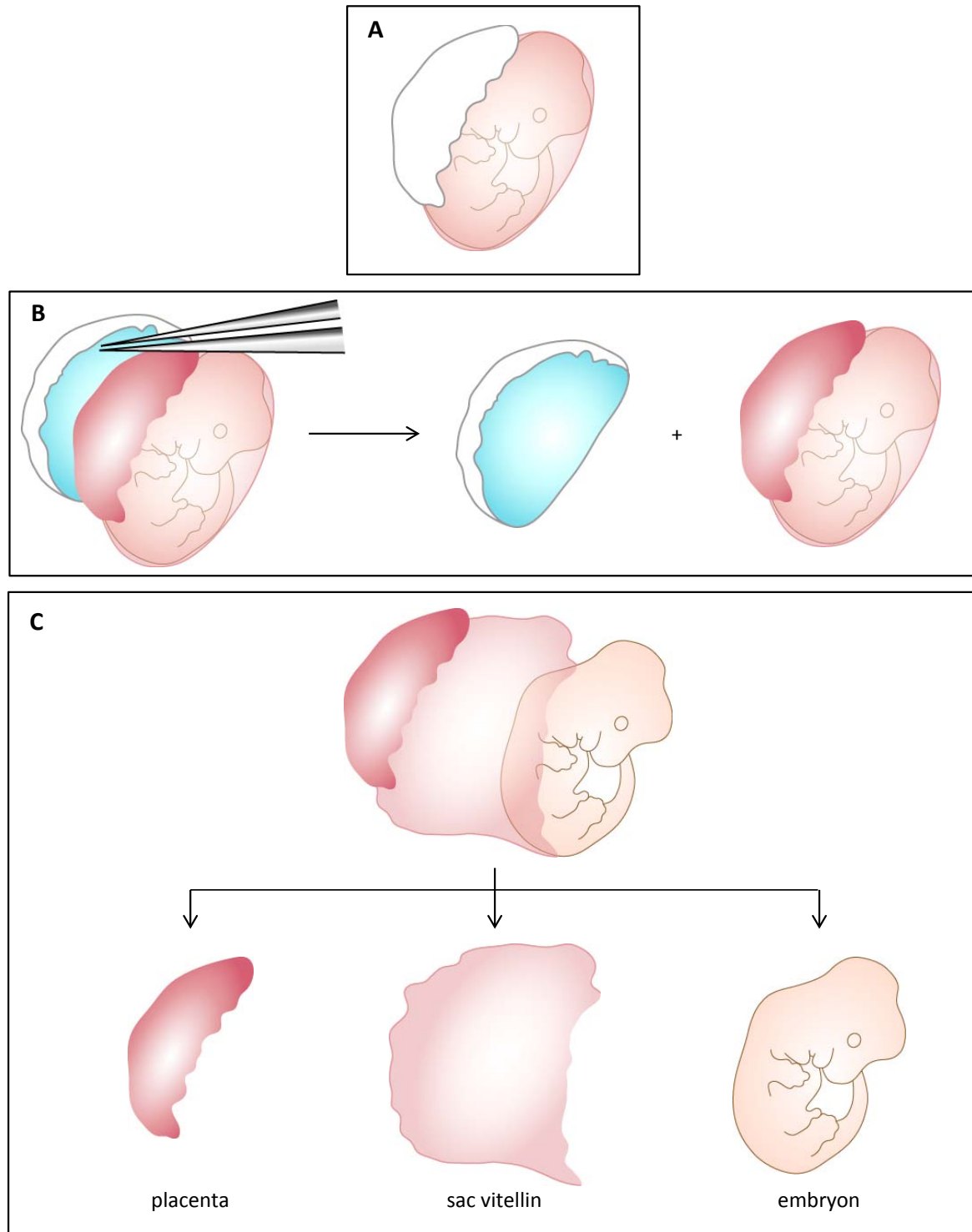


Figure 32: Étapes de dissection du placenta et du sac vitellin

(A) L'embryon est récupéré enveloppé du SV et recouvert du PI. **(B)** A l'aide de pinces fines, la partie maternelle du PI nommée decidua (blanche et bleue) est peu à peu retirée. **(C)** Après avoir incisé le SV, l'embryon est écarté. Le PI et le SV sont ensuite séparés. Il est à noter que la decidua peut être retirée après que le PI ait été séparé du SV (Illustrations Sophie Gournet).

PARTIE II - MARQUAGES SUR COUPES

2.1 - Congélation des tissus

Les tissus disséqués sont fixés 40mn dans du formaldéhyde 3.5% préparé en PBS 1X, puis rincés quatre fois 10mn en PBS 1X sous agitation. Ils sont alors placés deux nuits à 4°C successivement en tampon phosphate 0.12M (NaH₂PO₄, H₂O 23.2mM et Na₂HPO₄ 95.1mM, pH 7.2) puis en tampon phosphate 0.12M/sucrose 15% pour une bonne cryoprotection des tissus. Une incubation d'1h30 à 37°C en tampon phosphate 0.12M/sucrose 15%/gélatine 7.5% est ensuite effectuée. Durant ce temps, un socle est coulé à partir du même tampon au fond d'une coupelle et est durci à 4°C. Les tissus sont déposés sur ce socle et sont enrobés de tampon phosphate-sucrose-gélatine. Une fois figés, ils sont découpés et collés sur un socle en liège avec du Tissu Teck, orientés suivant l'axe désiré pour les coupes. De l'isopentane est refroidi à -80°C dans de l'azote liquide pour la congélation. Les blocs sont ensuite stockés à -80°C.

2.2 - Coupes au cryostat

La température de la chambre est réglée à -25°C et celle de l'objet à -23°C. Les coupes peuvent être linéaires ou sériées et ont une épaisseur de 10µm. Elles sont récupérées sur des lames SuperFrost et conservées à -20°C.

2.3 - Coloration lacZ

Celle-ci s'effectue soit *in toto* après fixation, soit sur des coupes de placentas congelées et dégelatinées. Dans ce deuxième cas, les lames sont séchées à l'air libre et la dégelatinisation se fait au bain-marie à 37°C durant 15mn dans du PBS 1X préchauffé. Un rinçage au PBS 1X est ensuite réalisé afin d'enlever la gélatine résiduelle et les coupes sont délimitées au Dakopen (feutre hydrophobe). Les tissus ou lames sont ensuite placés à 37°C dans le milieu de coloration contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (Xgal), substrat de la β-galactosidase (β-gal) donnant un précipité de couleur bleue lors de son clivage par l'enzyme.

Ce milieu est préparé dans du PBS 1X :	MgCl ₂	2mM
	ferricyanure de potassium	5mM
	ferrocyanure de potassium	5mM
	triton X100	0.01%

Après avoir préchauffé cette solution à 37°C, 1mg/mL de Xgal (Euromedex) est ajouté. L'incubation dure de 2 à 3 heures, selon la vitesse d'apparition de la coloration. Les tissus sont rincés quatre fois 10mn en PBS 1X. Les tissus colorés *in toto* sont ensuite congelés tel que décrit précédemment.

Contre coloration à l'hématoxyline

La solution d'hématoxyline est préparée dans de l'eau distillée avec :

Hématoxyline	3.3mM
Sodium iodate	0.5mM
Sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3, 18H_2O$	13.2mM
Ethylène glycol	12.5%
Acide acétique glacial	0.01%

Elle est filtrée avant chaque utilisation. Les lames y sont plongées 35-40s avant d'être rincées à l'eau courante, séchées à l'air libre, montées entre lame et lamelle avec de l'Entellan (Merck), milieu de montage rapide, puis observées au microscope optique (Nikon).

PARTIE III - MARQUAGES POUR CYTOMÉTRIE EN FLUX

3.1 - Préparation des suspensions cellulaires

Pour les PI et SV murins

Les PI et SV sont prédissoziés mécaniquement à travers une aiguille 18G avant de subir une dissociation enzymatique. Pour ce faire, ils sont resuspendus après centrifugation dans une solution de collagénase I 1.25mg/mL (Sigma) en PBS/SVF 10% à laquelle est ajoutée 50µg/mL de DNase I (DésoxyriboNucléase I, Sigma) afin d'éliminer les débris génomiques. L'incubation se fait au bain-marie à 37°C durant 1h30 avec agitation à la main toutes les 15mn pour aider à la dissociation. Afin d'obtenir une suspension monocellulaire, les cellules sont passées deux fois successivement à travers des aiguilles 18G, 23G puis 26G. Les cellules ainsi obtenues sont ensuite lavées trois fois dans du milieu Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco) (DMEM)/SVF 10%. Les globules rouges (GR) sont ensuite lysés par une solution de Gey, préparée extemporanément dans de l'eau stérile à partir des solutions A 20%, B 5% et C 5%, dont les compositions sont les suivantes :

- solution A (ajustée à pH 7.25)

NH ₄ Cl	0.65M
KCl	24.8mM
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	4.19mM
KH ₂ PO ₄	0.83mM
Glucose	27.75mM

- solution B (ajustée à pH 7.3)

MgCl ₂ , 6H ₂ O	20.7mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5.68mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	30.6mM

- solution C (ajustée à pH 8)

NaHCO ₃	0.27M
--------------------	-------

Une incubation de 5mn dans la glace est réalisée puis les cellules sont lavées deux fois en DMEM/SVF 10%. Après filtration sur tamis moléculaire 70µm (BD Falcon), les cellules sont comptées sur lame de Malassez après dilution d'un aliquot au 1/10 en PBS/acide acétique 2%, ce qui permet d'éliminer les GR restants.

3.2 - Marquage FDG

Le Fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside (FDG) est un substrat fluorescent de la β-gal qui libère un composé fluorescent lors de son clivage par l'enzyme. Le principe de la réaction consiste en un choc osmotique (le FDG étant dilué dans de l'eau) rapide à 37°C. Une solution de FDG 10X est préparée en diluant 5mg de FDG (Molecular Probes) en poudre dans 76µL d'une solution composée pour moitié

d'EtOH (éthanol) et de Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma). Cette solution est elle-même diluée dans 305µL d'eau milli-Q à 37°C, puis stockée à -20°C en aliquots de 50µL. Les cellules sont mises à 40.10⁶/mL en DMEM/SVF 10% pour procéder au marquage FDG.

Un volume identique à celui utilisé pour la suspension cellulaire et constitué d'une solution de FDG diluée au 1/10 dans de l'eau préchauffée est ajouté aux cellules. Le marquage dure 1mn à 37°C et est stoppé immédiatement après par l'ajout d'un grand volume de milieu DMEM/SVF 10% froid. Les cellules sont ensuite laissées sur glace pendant au moins 30mn pour laisser le temps aux membranes plasmiques de se reconstituer. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du PBS/BSA 0.5% (Sérum Albumine Bovine) froid pour ensuite être marquées avec les Ac adéquats. Par la suite, il est important de laisser les cellules dans la glace pour éviter que le marquage FDG redémarre et marque de façon aspécifique les cellules.

3.3 - Immunomarquages

Pour analyses par cytométrie en flux

Ils sont réalisés grâce à des Ac directement couplés à des fluorochromes, sauf le CD144 qui est biotinylé selon le protocole du kit Fluoreporter Minibiotin XX protein labelling kit (Molecular Probes). Une étape de marquage à la SA (StreptAvidine) couplée soit au PE (PhycoErythrine), soit à l'APC-Cy7 (AlloPhycoCyanine-Cyanine7) est alors ajoutée. Pour les autres Ac, ont été utilisés les fluorochromes suivants : PE, APC, FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate), PE-Cy7, APC-Cy7, PB (Pacific Blue). Les dilutions d'Ac se font dans du PBS/BSA 0.5% pour éviter le marquage non spécifique. Les cellules sont réparties dans des puits de p96, centrifugées et resuspendues dans 25µL d'Ac dont les concentrations utilisées sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Ac I	Sca-1	AA4.1	CD34	ckit	CD144	CD45
clone	D7	AA4.1	RAM34	2B8	11D4.1	30-F11
couplage	APC ; PE	PE	FITC ; eF660	PE, PE-Cy7		AF647, PB, PE
fournisseur	Biolegend	Biolegend	eBio science	Biolegend	BD Pharmingen	Biolegend
concentration (µg/mL)	2	2	5 ; 2	2	8	5

L'incubation se fait sur glace à l'obscurité durant 20mn. Les cellules sont ensuite rincées par l'ajout de 150µL de PBS/BSA 0.5% par puits. Avant le passage au cytomètre (FACS Calibur (Fluorescence

Activated Cell Sorting) ou LSR II), 1.5µL d'iodure de propidium (IP, Sigma) 1mg/mL sont ajoutés à chaque échantillon afin de marquer les cellules mortes.

Pour les tris cellulaires

Des marquages CD34/ckit, CD144/CD45, Sca-1/AA4.1, CD34/ckit/Sca-1/AA4.1, CD34/ckit/CD45/Sca-1 ont été réalisés dans le but de récupérer ces différentes populations après tri. Selon les fluorochromes choisis, deux marqueurs de viabilité cellulaires ont été utilisés : le 7-AAD (7-Amino-Actinomycine D, Beckman Coulter) sur la base d'1µL pour 10⁶ cellules, et le Dapi (4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole, Sigma) à 2µg/mL. Le 7-AAD est utilisé lors de l'utilisation du Pacific Blue. Le Dapi est utilisé lors de l'utilisation du PE-Cy7. Pour chacune de ces expériences, les simples marquages ainsi que le marquage isotypique sont réalisés en p96 à fond rond sur la base de 30.000 cellules/puits, afin d'effectuer les réglages du trieur avant le tri proprement dit. Après centrifugation de la p96, les cellules sont resuspendues dans 25µL de PBS/BSA 0.5% auxquels sont ajoutés 1µL d'Ac. Quant au reste des cellules, elles sont resuspendues à 20.10⁶ cellules/mL dans du PBS/BSA 0.5%. Les Ac sont utilisés suivant les concentrations finales indiquées dans le tableau ci-après, en y ajoutant de la DNase 50µg/mL.

Ac	CD144	SA	CD45	CD34	ckit	Sca-1	AA4.1
couplage	biotine	PE	AF647 ; PB ; PE	FITC ; AF660	PE ; PE-CY7 ; APC-Cy7	APC, PE	PE
concentration (µg/mL)	20	1	25	25 ; 10	10	10	10

L'incubation se fait sur glace à l'obscurité durant 30mn. Les Ac sont ensuite rincés dans les puits ainsi que dans le tube contenant les cellules à trier par l'ajout respectif de 150µL et 10mL de PBS/BSA 0.5%. Après centrifugation, les puits sont resuspendus dans 150µL et les cellules à 10⁷cellules/mL, DNase 100µg/mL. Les populations d'intérêt sont récupérées, après avoir été triées sur un FACS Vantage (BD) dans des tubes contenant 500µL de milieu LTC-IC (voir §4.1.1). Une fois les populations triées, leur potentiel hématopoïétique peut être testé soit *in vitro* soit *in vivo* comme décrit dans la partie IV.

PARTIE IV - MISE EN ÉVIDENCE DE LA PRÉSENCE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

4.1 - *In vitro* : cultures LTC-IC

4.1.1 - Préparation du stroma de cellules MS5

Les cellules MS5 (Itoh et al., 1989) se cultivent à 37°C, 5%CO₂, dans du milieu αMEM/SVF20%, glutamine (glut) 2mM, pénicilline/streptomycine (P/S) respectivement à 100 U/mL et 100µg/mL. La préparation du stroma se fait en général la veille de l'expérience mais il est possible de le faire le matin même. Une flasque de MS5 confluentes de 75cm² est vidée de son milieu et rincée avec 5mL de PBS 1X. 2mL d'une solution de trypsine 0.05%/EDTA 0.02% (acide Ethylène Diamine Tétra Acétique, Gibco) sont ajoutés sur les cellules pour les décoller du plastique. L'incubation se fait à 37°C et dure 3mn environ. Des chocs répétés sur la flasque permettent d'achever l'action de l'enzyme et 8mL de milieu αMEM (Gibco)/SVF 20% sont utilisés pour la stopper. Les cellules sont alors comptées sur lame de Malassez. Pour une p96 à fond plat, il est nécessaire de planter 3.000 cellules MS5 à raison de 100µL par puits dans du milieu LTC-IC. Le milieu LTC-IC utilisé est préparé dans du milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) complémenté comme suit :

SVF	12.5%
sérum de cheval	12.5%
acide ascorbique	0.5mg/L
myoinositol	37mg/L
acide folique	10mg/L

Extemporément sont ajoutés du β-mercaptoéthanol 50µM (βme, Sigma) et de l'hydrocortisone 1µM (Sigma).

4.1.2 - Ensemencement des populations

Les suspensions cellulaires sont ensemencées en dilution limite sur le stroma pré-établi, à raison de 100µL par puits. Pour ce faire, un minimum de huit dilutions est préparé avec, dans la mesure du possible, au moins huit puits par dilution. La concentration pour la première colonne de la plaque est définie dans la mesure du possible à 3.000 cellules/puits. Chaque colonne suivante voit ensuite sa concentration diluée de moitié par rapport à celle qui la précède.

4.1.3 - Entretien des cultures et calcul de fréquence

Le nombre de puits contenant des Cobblestone Area-Forming Cell (CA-FC), et/ou des Cellules Hématopoïétiques (CHs), est comptabilisé chaque semaine durant cinq semaines. Les cellules sont renourries une fois par semaine après lecture : 100µL du surnageant de chaque puits sont remplacés par une même quantité de milieu LTC-IC frais. Grâce aux données recueillies par la lecture des plaques à J35, il est possible grâce à la loi statistique de Poisson utilisée dans le programme L-Calc de StemCell Technologies Inc. de déterminer une fréquence de LTC-IC pour la population d'étude. Cette loi établit que, pour une quantité N de cellulesensemencées par puits, la fréquence de LTC-IC correspond à 1/N lorsque 37% des puits sont négatifs. Grâce à la cellularité de l'organe au stade étudié, le nombre de LTC-IC contenu dans cette population peut être déduit. Des calculs similaires à J7 permettent d'évaluer le nombre de précurseurs hématopoïétiques au sein de la population d'étude.

4.2 - *In vitro* : cultures sur cellules AFT024

Dans le but de tester à court terme l'éventuelle évolution phénotypique et/ou fonctionnelle des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ du Pl une fois en contact avec un stroma de FF, nous avons utilisé la lignée de cellules AFT024 issues de FF E14.5 (Moore et al., 1997a). Ces cellules se cultivent à 33°C, 5%CO₂, dans du milieu DMEM/SVF10%, 50µM βme, glut 2mM, P/S respectivement à 100 U/mL et 100µg/mL. Les boîtes de Pétri 6cm servant à l'établissement du stroma sont préalablement coatées à la gélatine 0.1% (Sigma) pendant 20mn à 37°C. Les cellules AFT024 confluentes sont trypsinées puis comptées (voir §4.1.1). Pour une boîte de Pétri 6cm, il est nécessaire de planter 100.000 cellules par boîte dans du milieu LTC-IC. Les populations triées à tester sontensemencées sur le stroma à raison de 20.000 ou 30.000 cellules par boîte. Après 2, 4 ou 9 jours de coculture, le tapis est récupéré. Après dissociation, les cellules sont analysées par cytométrie en flux pour les marqueurs CD34, ckit, Sca-1, AA4.1 et CD45.

4.3 - *In vivo* : reconstitution hématopoïétique à long terme

Différentes quantités de populations issues de souris CD45.2 sont injectées par voie intraveineuse dans le plexus veineux rétro-orbital de souris CD45.1 (voir §1.3 de l'introduction) préalablement irradiées létalement à 9 Gray (Gy). Pour la radioprotection à court terme des souris, 7.10⁵ cellules de rate CD45.1 sont injectées simultanément. Des souris témoins sont irradiées mais non injectées et doivent mourir dans un délai de dix à quinze jours. Six semaines plus tard, le sang des souris

Partie IV : Mise en évidence de la présence de cellules souches hématopoïétiques

survivantes est prélevé et les globules rouges sont lysés dans 5mL de solution de Gey précédemment décrite. Des marquages CD45.2-biot (biotinylé) et CD45.1-APC sont ensuite effectués. Après 30mn d'incubation, une étape de SA-PE est réalisée pour compléter le marquage CD45.2-biot. Après analyse par cytométrie en flux, il est possible de déterminer un pourcentage de reconstitution hématopoïétique selon la formule suivante : $\% \text{CD45.2} / (\% \text{CD45.1} + \% \text{CD45.2}) \times 100$. Une souris est considérée comme reconstituée si son pourcentage de reconstitution dépasse 5%. Seize à vingt semaines après la greffe primaire, la participation des cellules CD45.2 aux différents lignages hématopoïétiques des cellules du sang périphérique, de la rate, du thymus et de la MO est déterminée. Par ailleurs, $5 \cdot 10^5$ cellules de la moelle totale sont réinjectées dans de nouvelles souris CD45.1 létalement irradiées dans le but de tester le potentiel d'autorenouvellement des CSHs issues de la population CD45.2 injectée au départ.

Résultats

RÉSULTATS

PARTIE I - CARACTÉRISATION DES POPULATIONS ENRICHIES EN CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES DANS LES ANNEXES EMBRYONNAIRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA SOURIS

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, différents sites et organes hématopoïétiques embryonnaires participent à la mise en place des CSHs définitives. Chacun possède un rôle particulier puisque l'AGM est un site d'émergence de progéniteurs hématopoïétiques/CSHs, le SV est un site d'émergence/amplification, le PI est un organe d'amplification et enfin le FF constitue un organe d'amplification et de maturation hématopoïétique. Différentes combinaisons de marqueurs de surface ont été utilisées pour isoler des populations cellulaires enrichies en CSHs dans les différents sites et organes hématopoïétiques au cours du développement. Pour autant, aucune comparaison entre les potentiels hématopoïétiques de ces différentes populations n'a été réalisée. Pour pallier ce manque, l'équipe de M. Souyri s'est attachée à réaliser cette comparaison pour trois populations principales à savoir $CD34^{+}ckit^{hi}$, $CD144^{+}CD45^{+}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$. Pour mémoire, la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ a été décrite comme étant enrichie en CSHs dans l'AGM E11.5 (Sanchez et al., 1996), le SV E9.5 (Yoder et al., 1997a) et le PI E12.5 (Gekas et al., 2005) ; la population $CD144^{+}CD45^{+}$ a principalement été décrite au niveau de la région AGM E11.5, du SV E12.5 et du FF E13.5 (Taoudi et al., 2005) ; enfin, la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ est la population de CSHs de référence du FF E14.5 (Jordan et al., 1995). Cette étude comparative vise à définir si les populations les plus enrichies en CSHs dans l'AGM, le SV, le PI et le FF expriment ou non les mêmes marqueurs de surface.

Ma contribution dans ce projet a concerné les annexes extra-embryonnaires que sont le SV et le PI. Dans le but d'approfondir la connaissance du potentiel hématopoïétique des trois populations précédemment décrites dans ces deux organes, plusieurs volets d'étude sont abordés dans cette Partie I. Dans un premier temps, j'ai réalisé une étude de la cinétique d'apparition et d'évolution de ces populations au cours du développement de ces annexes par cytométrie en flux, pour ensuite analyser les niveaux d'imbrications des différentes populations entre elles. Enfin, j'ai étudié et comparé *in vitro* leurs potentiels hématopoïétiques. Pour cette dernière partie, j'ai reporté les résultats obtenus en parallèle par L. Petit dans l'équipe pour l'AGM et le FF.

1.1 - Étude cinétique d'apparition des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans le SV et le PI par cytométrie en flux

Le sac vitellin

Au fur et à mesure de la croissance de l'embryon, la quantité de cellules présentes au sein du SV augmente rapidement. Sans compter les globules rouges, le SV possède 270.000 cellules à E10.5 (Figure 33). Entre E10.5 et E12.5, ce nombre double pratiquement chaque 24h et à E12.5, le SV comporte environ 850.000 cellules. Durant ce laps de temps, les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ sont plus ou moins présentes au sein du SV et j'ai étudié par cytométrie en flux leur cinétique d'apparition (Figures 34 et 35). Aussi bien en pourcentage qu'en nombre de cellules par SV, la population CD34⁺ckit^{hi} à E10.5 est 8 fois plus représentée que la population CD144⁺CD45⁺. A E11.5, stade au cours duquel l'activité hématopoïétique est importante au niveau du SV, la tendance s'inverse et le pourcentage de la population CD144⁺CD45⁺ est 2,2 fois plus élevé que celui de la population CD34⁺ckit^{hi} (respectivement 2,82% et 1,29%). Néanmoins, lorsque ces pourcentages sont rapportés à un nombre de cellules par SV, chacune de ces deux populations comporte environ 4.000 cellules. Au même stade, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ est pratiquement inexistante puisqu'elle ne représente que 0,17% des cellules du SV, ce qui correspond seulement à 585 cellules. A E12.5, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ est toujours très faiblement présente (0,17%). Au même stade, le pourcentage de la population CD34⁺ckit^{hi} a diminué de 1,5 fois passant de 1,29% à 0,85% tandis que celui de la population CD144⁺CD45⁺ a augmenté, passant de 2,82% à 3,45%. Le nombre de cellules CD144⁺CD45⁺ augmente de 2,5 fois entre E11.5 et E12.5. Il est intéressant de noter que cette augmentation correspond à la deuxième vague d'hématopoïèse décrite au niveau du SV, qui contient une population de CSHs à partir d'E11.5.

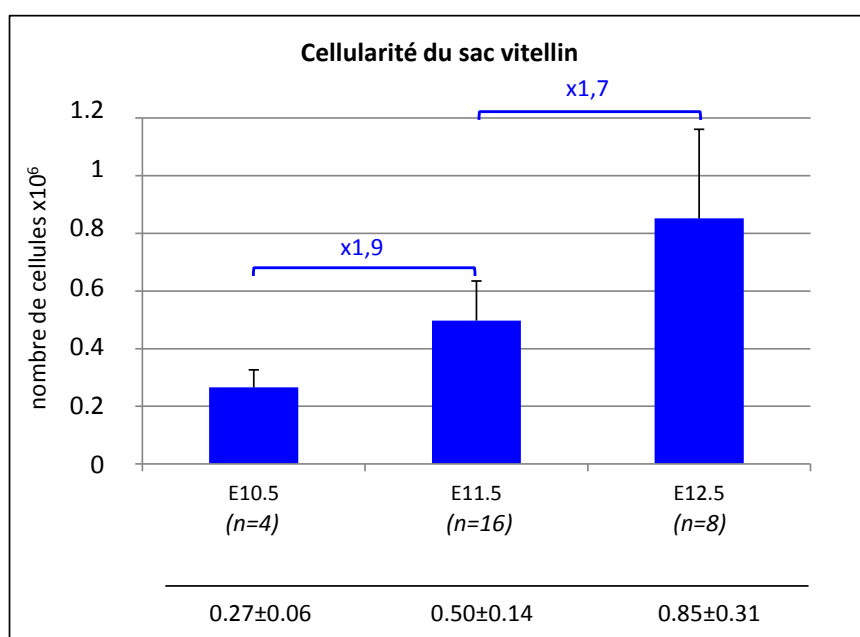


Figure 33 : Évolution de la cellularité du sac vitellin C57Bl6 entre E10.5 et E12.5

avec *n*, nombre d'expériences réalisées.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

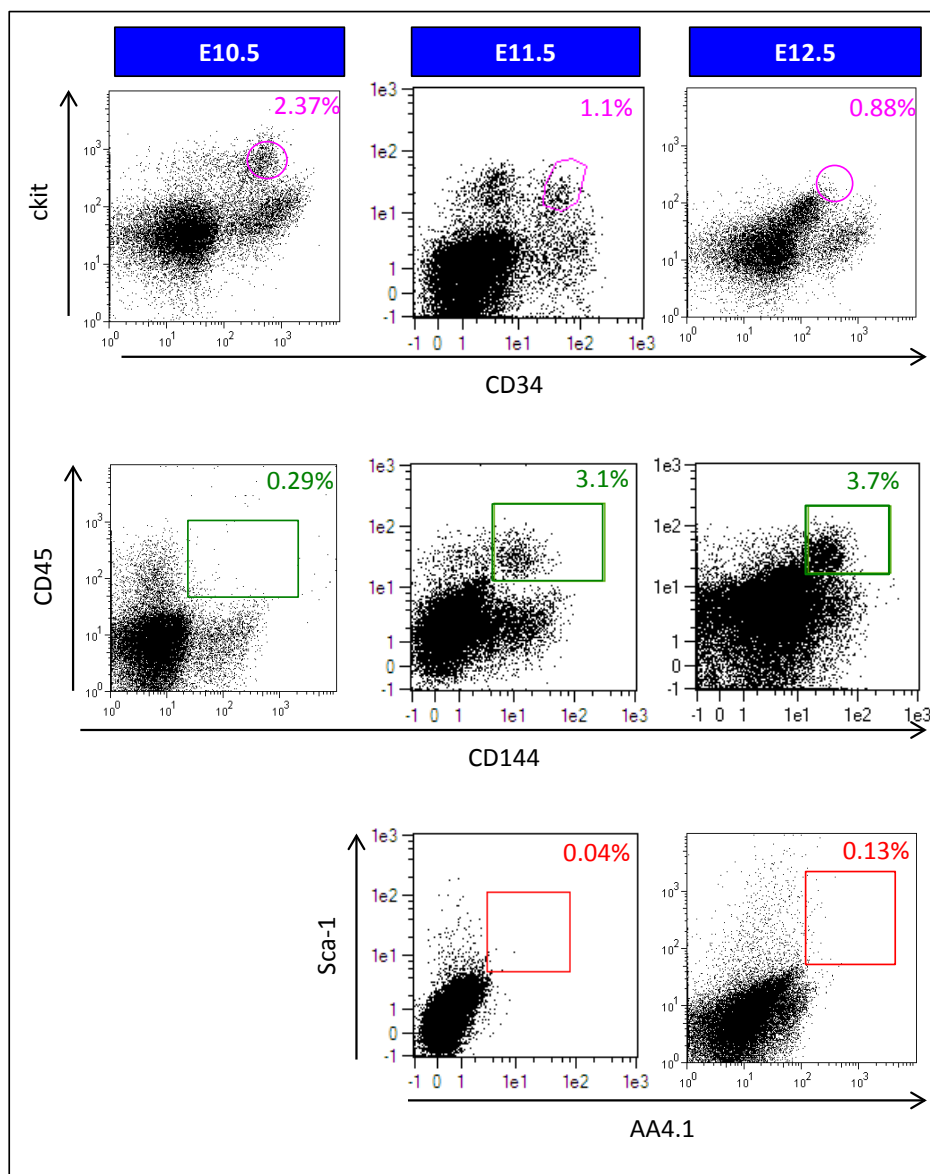


Figure 34 : Étude cinétique des populations $CD34^{+}ckit^{hi}$, $CD144^{+}CD45^{+}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ au cours du développement du sac vitellin de souris C57Bl6 (E10.5 à E12.5)

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

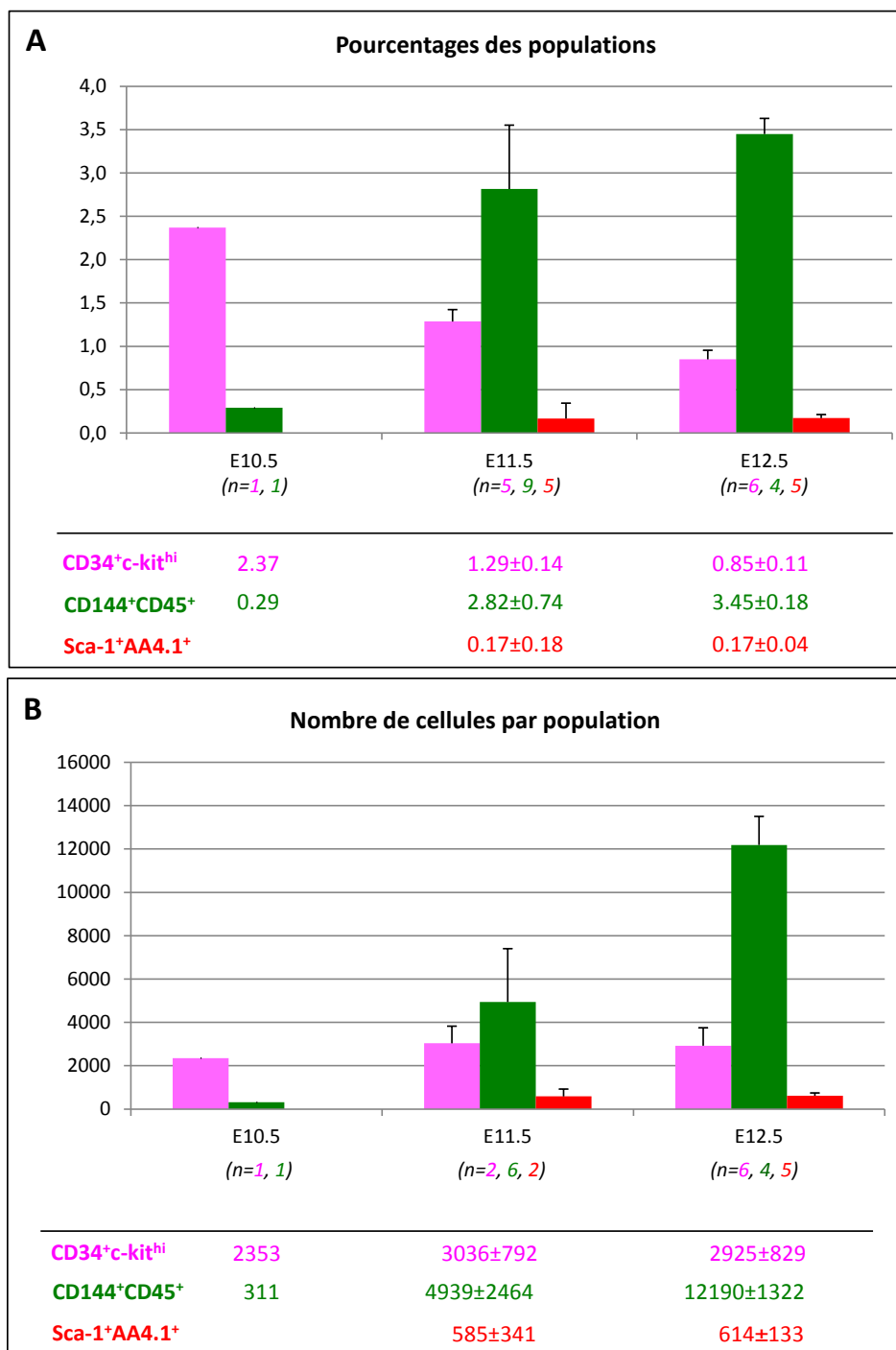


Figure 35 : Étude cinétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ au cours du développement du sac vitellin de souris C57Bl6 (E10.5 à E12.5)

(A) en pourcentages. (B) en nombre de cellules pour une population donnée par SV.

Le placenta

Entre E10.5 et E12.5, le PI évolue de façon similaire au SV et leurs cellularités respectives sont quasiment identiques (*Figure 36*). A E10.5, soit 24h après sa formation, le PI possède déjà 280.000 cellules. Entre E10.5 et E14.5, ce nombre s'amplifie de plus de cinq fois, atteignant les 5.500.000 cellules. En ce qui concerne les trois populations d'intérêt à E11.5 et E12.5, stades durant lesquels l'activité hématopoïétique est maximale dans le PI, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ est la plus représentée et représente respectivement 6,66% et 10,42% des cellules du PI, soit 6.980 et 22.013 cellules (*Figures 37 et 38*). A E12.5, elle est 4,5 fois plus présente que la population CD34⁺ckit^{hi} et 5 fois plus présente que la population CD144⁺CD45⁺. Entre E10.5 et E12.5, les populations CD34⁺ckit^{hi} et CD144⁺CD45⁺ sont représentées de façon égale au sein du PI. La population CD34⁺ckit^{hi} atteint un maximum à E12.5 (2,30% soit 5.679 cellules par PI) puis tend à disparaître puisqu'à E14.5, elle ne représente plus que 0,18% des cellules du PI soit seulement 397 cellules. En revanche la population CD144⁺CD45⁺ reste présente dans le PI tout au long des stades étudiés. Alors qu'elle s'amplifie de 1,9 fois entre E10.5 et E11.5, elle reste stable entre E11.5 et E13.5 aux alentours de 2%. Entre E13.5 et E14.5, au moment où le PI perd son activité hématopoïétique, elle s'amplifie à nouveau de 2,1 fois. Lorsque les pourcentages sont rapportés en nombre de cellules par PI, cette population CD144⁺CD45⁺ s'amplifie d'environ 22 fois entre E10.5 et E14.5, passant de 859 à 18.560 cellules.

Au vu de ces résultats, plusieurs questions peuvent être soulevées. L'amplification de cellules CD144⁺CD45⁺ entre E10.5 et E14.5 dans le PI est-elle due à un afflux de cellules arrivant par la circulation sanguine ou a-t-elle lieu au sein même du PI ? Dans ce dernier cas, est-elle liée à l'activité résiduelle visualisée au niveau des gros vaisseaux de la plaque chorionique ?

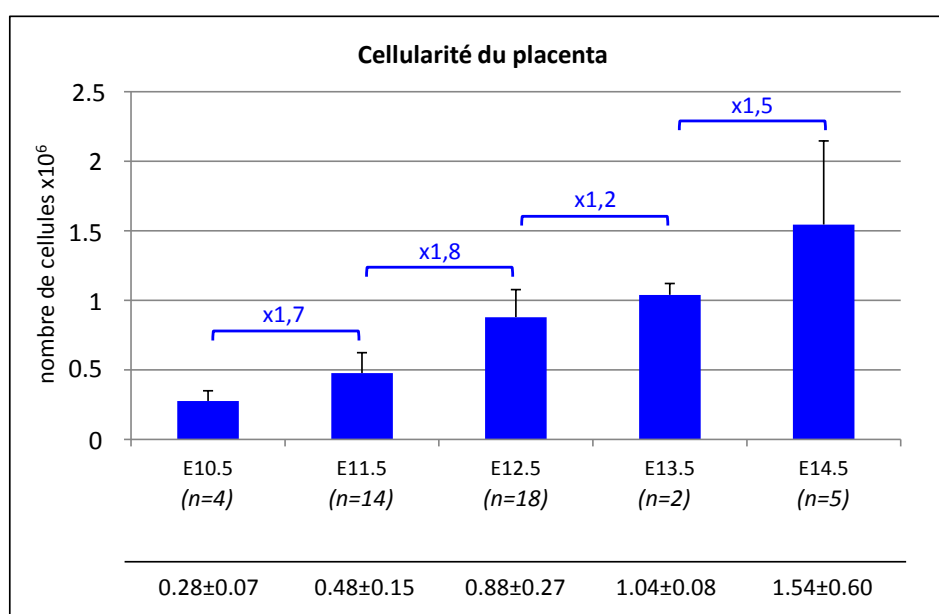


Figure 36 : Évolution de la cellularité du placenta C57Bl6 entre E10.5 et E14.5

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

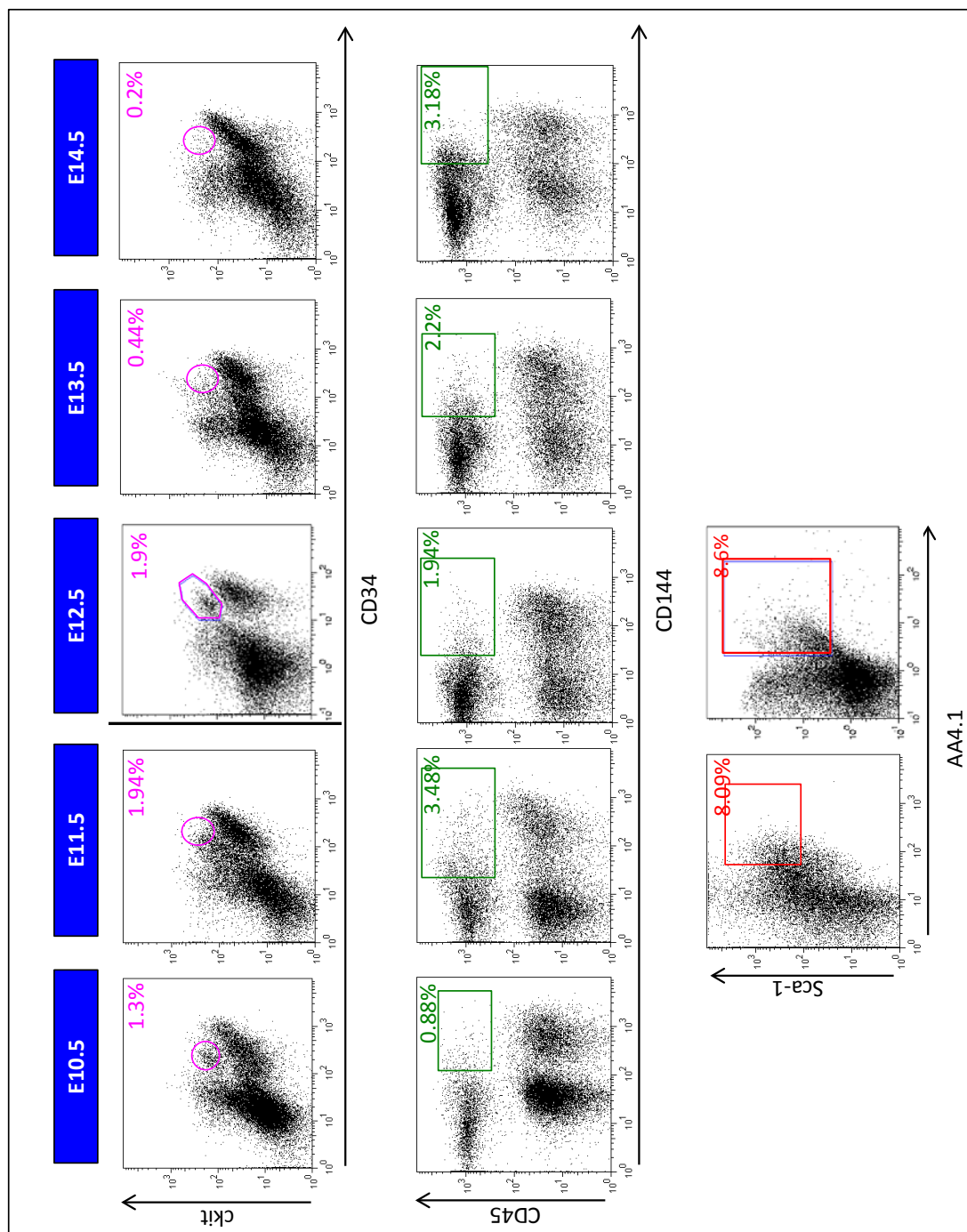


Figure 37 : Étude cinétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ au cours du développement du placenta de souris C57Bl6 (E10.5 à E14.5)

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

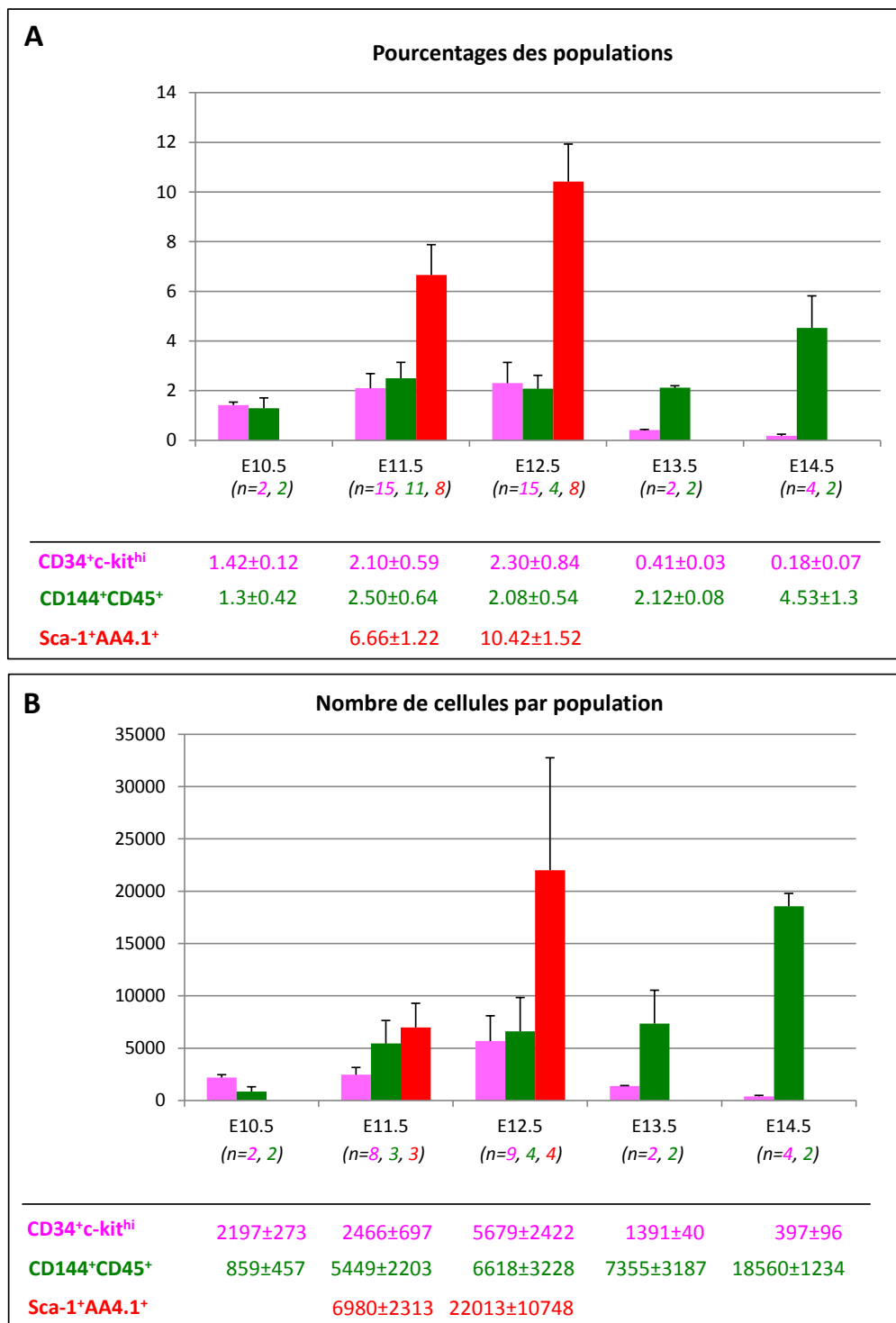


Figure 38 : Étude cinétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI (E10.5 à E14.5)

(A) en pourcentages. (B) en nombre de cellules pour une population donnée par placenta.

1.2 - Relations des populations les unes par rapport aux autres au cours du développement du SV et du PI

Dans l'optique d'affiner l'étude des populations $CD34^{+}ckit^{hi}$, $CD144^{+}CD45^{+}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$, j'ai également analysé comment elles s'imbriquaient les unes par rapport aux autres dans le SV et le PI à E11.5 et E12.5.

Le sac vitellin

Comme nous l'avons vu plus haut, la population $CD144^{+}CD45^{+}$ du SV E11.5 est majoritairement représentée par rapport aux deux autres populations à E11.5, la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ étant extrêmement minoritaire (*Figure 39*). Ces proportions sont conservées à E12.5. De façon générale, les trois populations d'étude se recoupent très peu à E11.5 et ont même tendance à s'exclure encore un peu plus à E12.5. Il est intéressant de noter qu'à E11.5 et E12.5, la grande majorité des cellules $CD45^{+}$ du SV exprime le marqueur endothélial $CD144$ (voir profil cytométrique $CD144/CD45$, *Figure 34*) alors que dans le PI à E11.5 et E12.5, seulement une minorité des cellules $CD45^{+}$ sont $CD144^{+}$ (voir profil cytométrique $CD144/CD45$, *Figure 37*).

Le placenta

A E11.5 comme à E12.5, la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ est de loin la plus représentée des trois (*Figure 40*). A E11.5, environ un tiers des populations $CD34^{+}ckit^{hi}$ et $CD144^{+}CD45^{+}$ exprime également le phénotype $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ (respectivement 25,93% et 30,82%). A E12.5, plus de la moitié de la population $CD144^{+}CD45^{+}$ (52,3%) est $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$. Une légère augmentation d'imbrication est également observée pour la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ qui est à 32,19% $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$.

L'étude de la fraction hématopoïétique contenue dans les populations $CD34^{+}ckit^{hi}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ à E11.5 et E12.5 a permis de mettre en évidence certaines différences (*Figure 41*). Alors que la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ possède une forte composante hématopoïétique, de l'ordre de 90 à 95% à E12.5, seulement 10% environ de la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ exprime le marqueur hématopoïétique $CD45$. La population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ possède en fait une composante endothéliale très importante, à E11.5 comme à E12.5 (80% environ des cellules $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ sont $CD144^{+}CD45^{+}$).

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

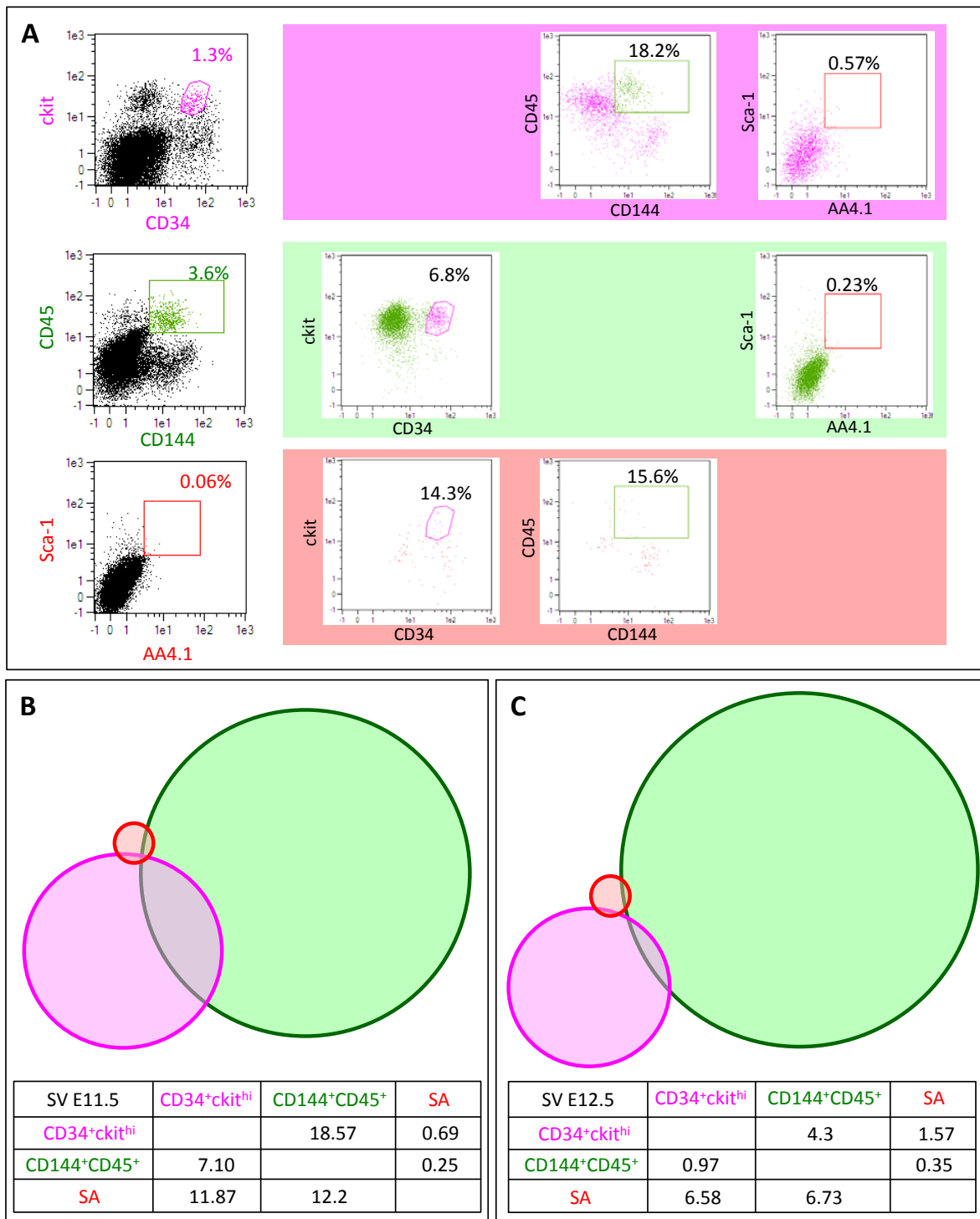


Figure 39 : Pourcentages d'imbrications des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ (SA) dans le SV C57Bl6

(A) Profils cytométriques illustrant l'analyse à E11.5. (B) Imbrications à E11.5, n=3. (C) E12.5, n=4.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

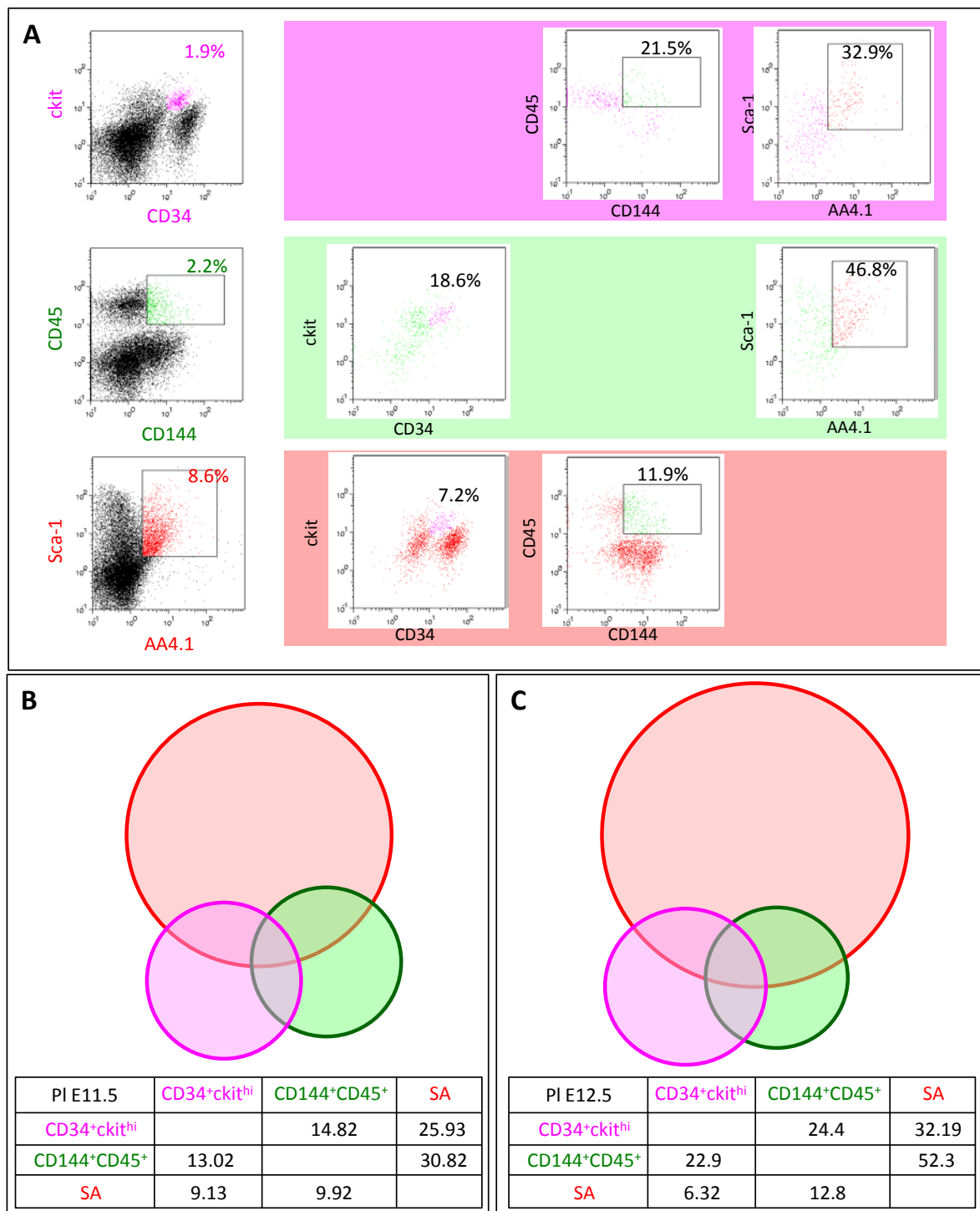


Figure 40 : (A) Pourcentages d'imbrications des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ (SA) dans le PI C57Bl6

(A) Profils cytométriques illustrant l'analyse à E11.5. (B) Imbrications à E11.5, n=3. (C) E12.5. Pour les populations CD34⁺ckit^{hi} et SA, n=6 ; pour la population CD144⁺CD45⁺, n=2.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

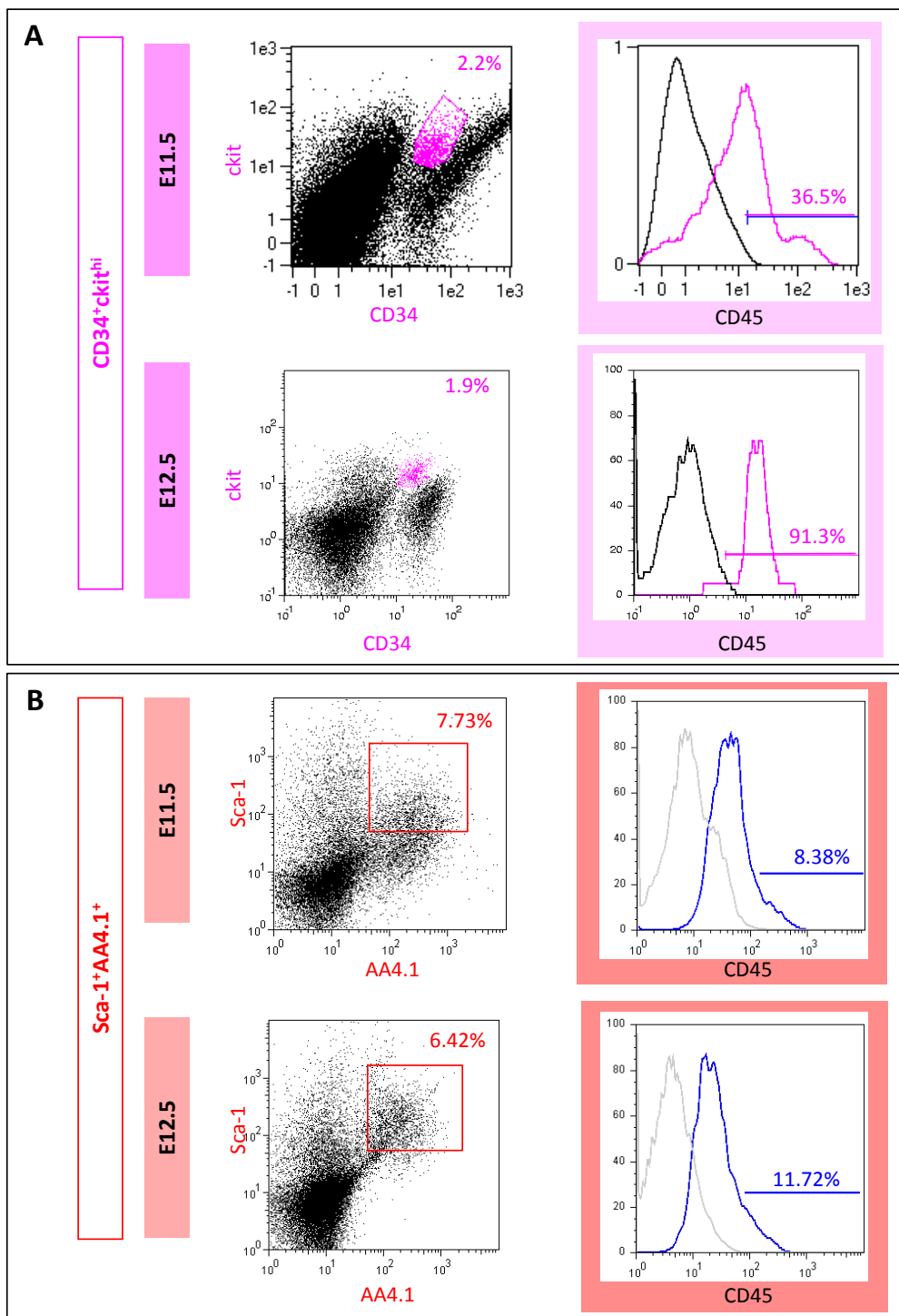


Figure 41 : Étude de la fraction hématopoïétique des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺

Pourcentages de la fraction CD45⁺ des populations CD34⁺ckit^{hi} (A) et Sca-1⁺AA4.1⁺ (B) à E11.5 et à E12.5. Les contrôles négatifs apparaissent en gris.

1.3 - Étude du potentiel hématopoïétique *in vitro* des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans le SV et le PI au cours du développement embryonnaire

Afin de comparer le potentiel hématopoïétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans chacune des deux annexes embryonnaires, j'ai trié ces populations à différents stades du développement (entre E10.5 et E14.5) et j'ai réalisé des tests LTC-IC. Au bout de 35 jours de culture, une fréquence et un nombre de LTC-IC ont été déterminés pour chacune des populations. Ainsi que je l'ai signalé dans l'introduction de ce chapitre, ce travail s'inscrit dans un projet plus global au sein de l'équipe, et une étude similaire a été réalisée par L. Petit au niveau de l'AGM et du FF. Je rapporterai donc ici l'ensemble des résultats, ce qui permettra d'avoir une vision d'ensemble des populations les plus enrichies en LTC-IC dans les sites et organes hématopoïétiques embryonnaires, et de conclure.

La région AGM

Dans l'AGM, un pic d'activité hématopoïétique est observé à E11.5 (*Figure 42*). Entre E10.5 et E12.5, la population CD144⁺CD45⁺ possède la meilleure fréquence de LTC-IC, laquelle semble rester stable au fil du temps puisqu'à E10.5, 1 cellule sur 227 correspond à une LTC-IC, 1 sur 253 à E11.5 et 1 sur 320 à E12.5. Toutefois à E11.5, la population CD34⁺ckit^{hi} présente un potentiel hématopoïétique similaire à celui de la population CD144⁺CD45⁺, et ce aussi bien en fréquence de LTC-IC qu'en nombre de LTC-IC par population. A ce stade, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ a un très faible potentiel hématopoïétique (fréquence de 1/2.286). A E12.5, malgré le fait que la population CD144⁺CD45⁺ présente une fréquence de LTC-IC 37 fois supérieure à celle de la population CD34⁺ckit^{hi}, le nombre de LTC-IC contenue dans chacune de ces deux populations est identique (environ 0,4).

Nous noterons qu'avec nos analyses *in vitro* à E11.5, nous avons pu mettre en évidence le même nombre de LTC-IC par AGM que le nombre de CSHs par AGM déterminé par Kumaravelu et al. (2002) et Gekas et al. (2005) *in vivo* par des reconstitutions hématopoïétiques dans des souris létalement irradiées, ce qui valide notre approche. En effet, alors que nos résultats indiquent que les populations CD144⁺CD45⁺ et CD34⁺ckit^{hi} contiennent chacune environ 1 LTC-IC à E11.5, Kumaravelu et al. et de Gekas et al. montrent que l'AGM E11.5 contient entre 1 et 2 CSHs.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

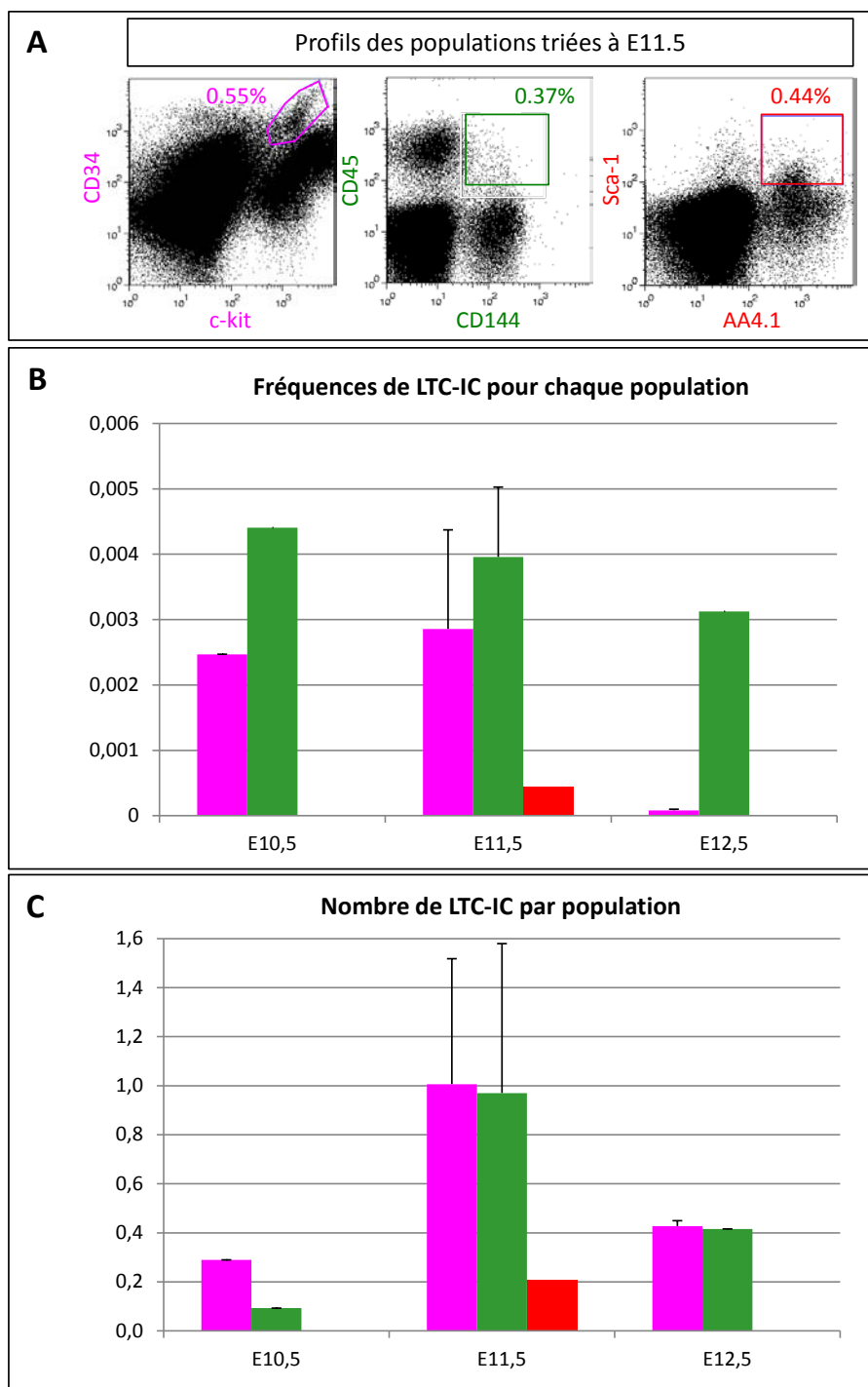


Figure 42 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34⁺c-kit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ de la région AGM entre E10.5 et E12.5

(A) Profils cytométriques illustrant le tri à E11.5. Résultats obtenus au bout de 35 jours de coculture sur cellules MS5 en fréquence **(B)** et en nombre **(C)** de LTC-IC par population.

Le sac vitellin

Dans le SV, seules les populations CD34⁺ckit^{hi} et CD144⁺CD45⁺ ont été étudiées car la population Sca-1⁺AA4.1⁺ est pratiquement inexistante (Figures 34 et 35). Le pic d'activité hématopoïétique est également observé à E11.5 et la population CD144⁺CD45⁺ présente alors la meilleure fréquence en LTC-IC (Figure 43). En effet, 1 cellule CD144⁺CD45⁺ sur 1.138 correspond à une LTC-IC à E11.5. Cette fréquence est six fois plus élevée que celle obtenue pour la population CD34⁺ckit^{hi} au même stade (1/7.193). Ainsi, la population CD144⁺CD45⁺ contient 11 fois plus de LTC-IC que la population CD34⁺ckit^{hi} (4,5 LTC-IC vs 0.4 - p<0.1%). Là encore, nos résultats sont en accord avec les données *in vivo* de Kumaravelu et al. et de Gekas et al. qui indiquent que le SV E11.5 contient entre 1 et 2 CSHs à E11.5. Alors qu'un jour plus tôt (E10.5), les populations CD144⁺CD45⁺ et CD34⁺ckit^{hi} possèdent déjà une légère activité hématopoïétique détectable avec une fréquence de l'ordre de 1/4.000, elles n'en possèdent pratiquement plus à E12.5.

Le placenta

Le PI présente un pic d'activité hématopoïétique à E12.5 (Figure 44). A ce stade, la population CD34⁺ckit^{hi} possède la meilleure fréquence en LTC-IC (1/237). Entre E10.5 et E12.5, cette fréquence augmente de 5,7 fois. A E13.5, seule 1 cellule CD34⁺ckit^{hi} sur 1.384 est une LTC-IC et passé ce stade, la fréquence de LTC-IC détectée est extrêmement faible. Bien que cinq fois moins enrichie en LTC-IC à E12.5 que ne l'est la population CD34⁺ckit^{hi}, la population CD144⁺CD45⁺ possède tout de même un potentiel hématopoïétique manifeste détectable avec une fréquence de l'ordre de 1/1.005. Entre E11.5 et E14.5, entre 2 et 7 LTC-IC sont détectées au sein de cette population. Il est intéressant de noter qu'à E11.5, début d'une forte activité hématopoïétique dans le PI, les populations CD144⁺CD45⁺ et CD34⁺ckit^{hi} possèdent une fréquence et un nombre de LTC-IC similaires. Les résultats de fréquence et nombre de LTC-IC pour la population CD144⁺CD45⁺ indiquent que tant que cette population est produite (voir §1.1), elle possède une activité hématopoïétique constante. Enfin, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ ne possède aucune activité hématopoïétique détectable *in vitro* à E11.5 et E12.5, pas même en termes de progéniteurs hématopoïétiques puisqu'aucune CA-FC n'a pu être observée après 7 jours de culture sur cellules MS5. Ceci peut s'expliquer par le fait que la population Sca-1⁺AA4.1⁺ est seulement à 10% hématopoïétique et possède une composante endothéliale d'environ 80% (voir §1.2).

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

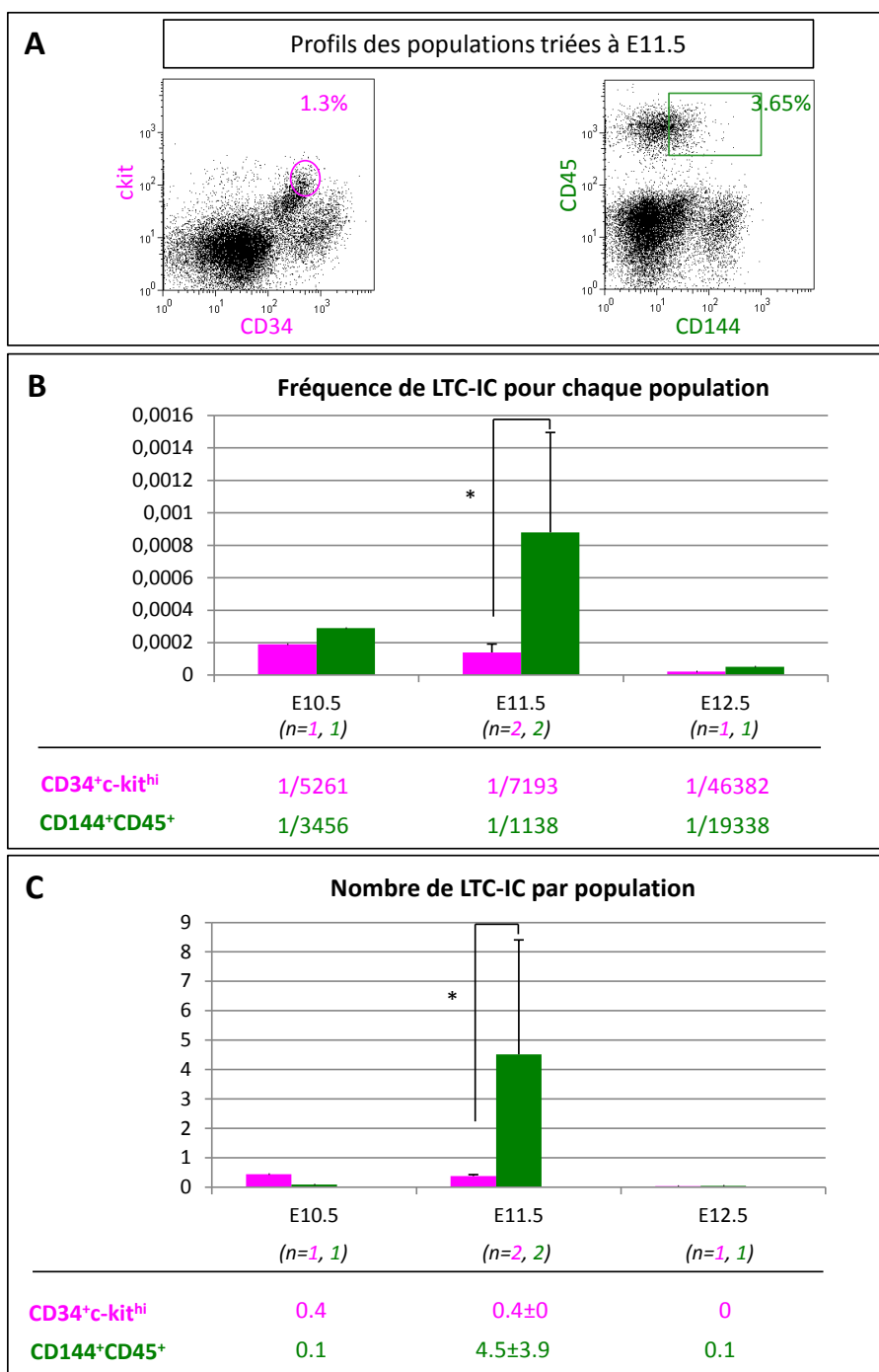


Figure 43 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ du SV entre E10.5 et E12.5

(A) Profils cytométriques illustrant le tri à E11.5. Résultats obtenus au bout de 35 jours de coculture sur cellules MS5 en fréquence **(B)** et en nombre **(C)** de LTC-IC par population. * : $p < 0.1\%$, test de Mann-Whitney.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

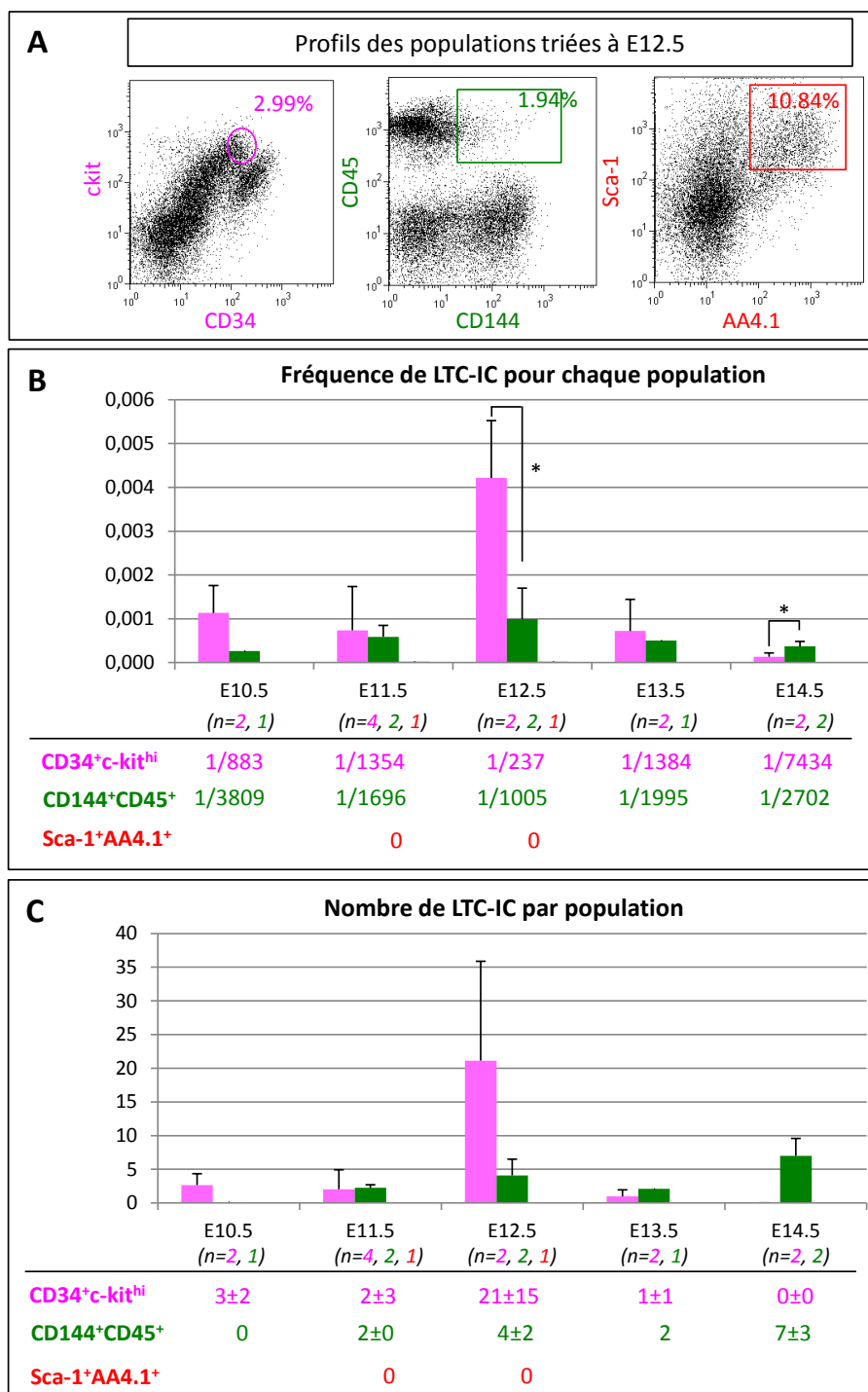


Figure 44 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI entre E10.5 et E14.5

(A) Profils cytométriques illustrant le tri à E12.5. Résultats obtenus au bout de 35 jours de coculture sur cellules MS5 en fréquence (B) et en nombre (C) de LTC-IC par population. * : $p < 0.1\%$, test de Mann Whitney.

Le foie fœtal

Le pic d'activité hématopoïétique du FF est observé à E14.5 (*Figure 45*). A ce stade, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ présente la meilleure fréquence de LTC-IC (1/33) et contient un nombre important de LTC-IC (150 environ). A E11.5, la population CD144⁺CD45⁺ présente une fréquence de LTC-IC de 1/1.250, fréquence plus importante que celles obtenues pour les populations Sca-1⁺AA4.1⁺ (1/2.000) et CD34⁺ckit^{hi} (1/5.000). Un jour plus tard à E12.5, les populations Sca-1⁺AA4.1⁺ et CD144⁺CD45⁺ présentent deux fréquences de LTC-IC similaires (1/687 environ). Toutefois, lorsque ces fréquences sont rapportées à un nombre de LTC-IC, les résultats indiquent que la population CD144⁺CD45⁺ E12.5 possède 7 LTC-IC alors que les populations Sca-1⁺AA4.1⁺ et CD34⁺ckit^{hi} n'en possèdent que 4 environ. A E14.5, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ semble prendre le relai de la population CD144⁺CD45⁺. A tous les stades, la population CD34⁺ckit^{hi} est celle qui présente la plus faible fréquence de LTC-IC, contrairement à ce qui a été observé dans le PI.

En résumé nos résultats indiquent qu'à E11.5, moment du pic d'émergence de CSHs, la population la plus enrichie en LTC-IC dans le SV possède le phénotype CD144⁺CD45⁺ (*Figure 46 et Tableau 4*). Elle est suivie de près par la population CD34⁺ckit^{hi} dans l'AGM et le PI. Au moment de l'amplification des CSHs, les combinaisons de marqueurs de surface exprimées par les populations les plus enrichies en LTC-IC sont différentes selon l'organe considéré : la population CD34⁺ckit^{hi} est la plus enrichie en LTC-IC dans le PI E12.5 alors que dans le FF E14.5, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ présente une activité hématopoïétique bien supérieure aux deux autres populations d'étude.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

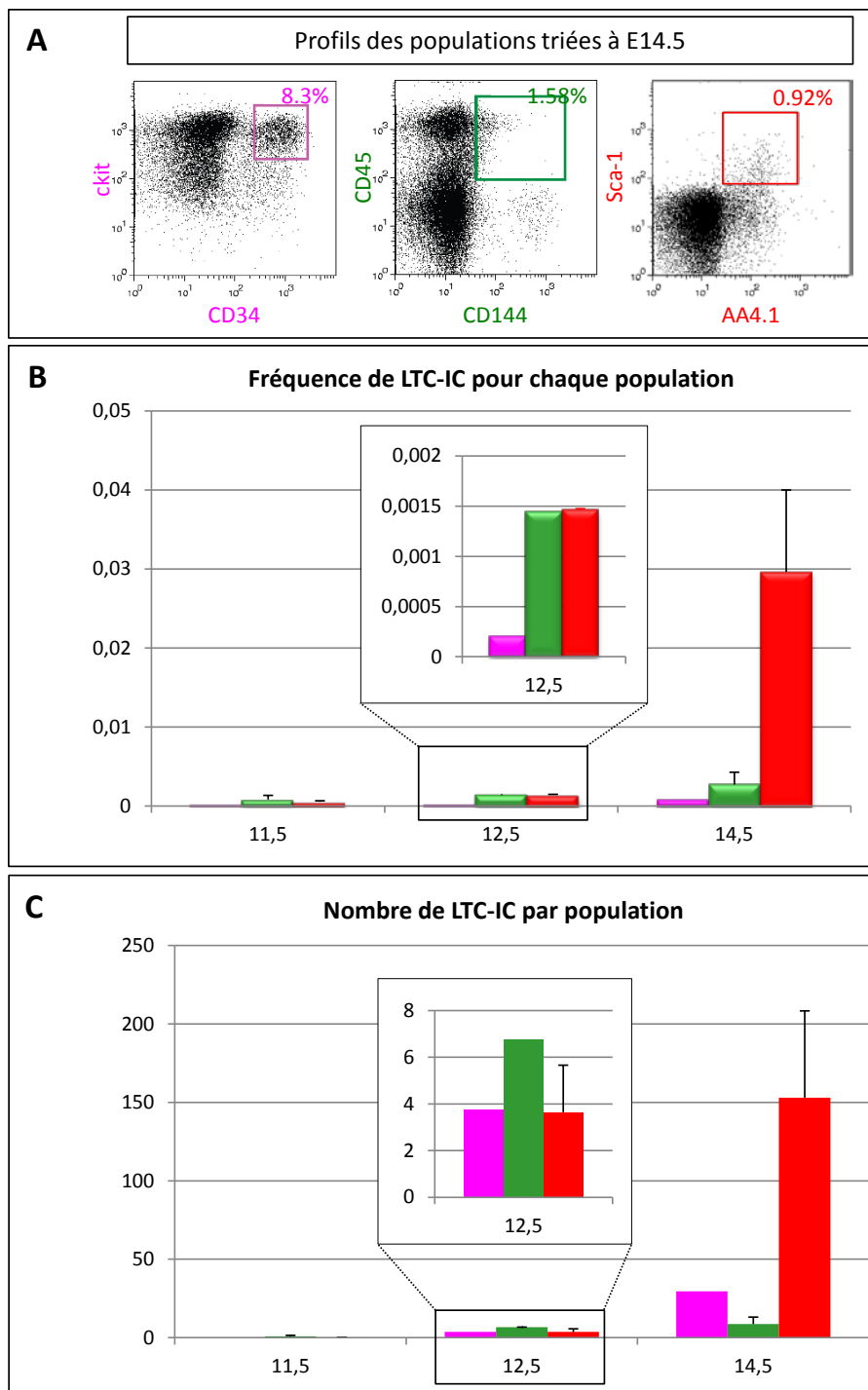


Figure 45 : Fréquences et nombres de LTC-IC présentes dans les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ du FF entre E10.5 et E14.5

(A) Profils cytométriques illustrant le tri à E14.5. Résultats obtenus au bout de 35 jours de coculture sur cellules MS5 en fréquence **(B)** et en nombre **(C)** de LTC-IC par population.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

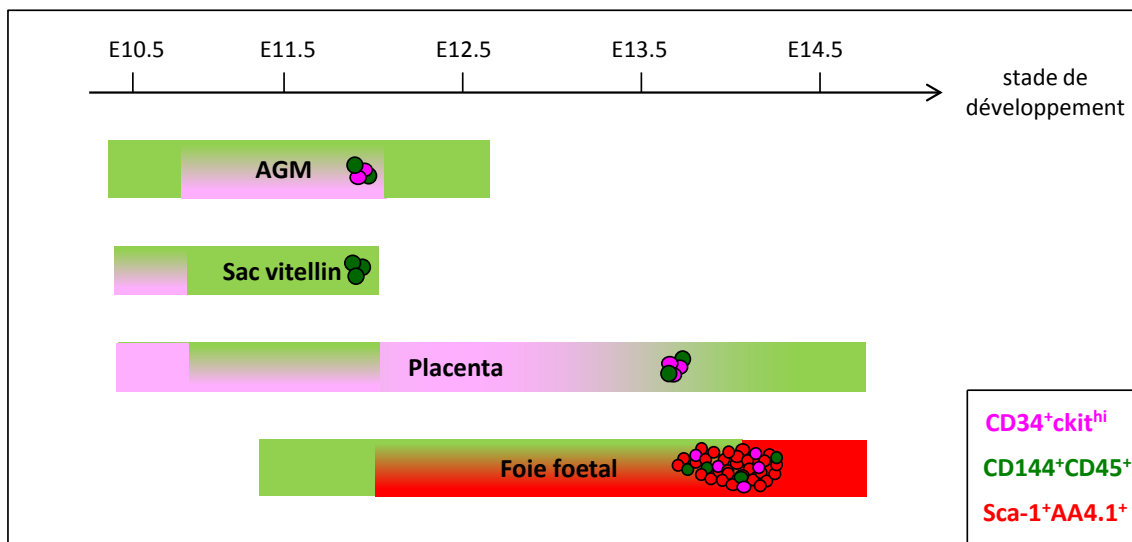


Figure 46 : Populations les plus enrichies en LTC-IC dans les différents sites et organes hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire de la souris

nombre de LTC-IC	AGM	sac vitellin	placenta	foie foetal
E11.5	1, 1, 0.2	0.4, 4.5	2, 2, 0	0.2, 0.9, 0.2
E12.5	0.4, 0.4	0, 0.1	21, 4, 0	3.7, 6.7, 3.7
E14.5			0, 7	30, 8.7, 153

Tableau 4 : Nombres de LTC-IC et de LT-CSHs par organe entre E11.5 et E14.5

Quantités de LTC-IC déterminées pour les populations CD34⁺ckit^{hi} (en rose), CD144⁺CD45⁺ (en vert) et Sca-1⁺AA4.1⁺ (en rouge) dans chaque site et organe hématopoïétique.

1.4 - Placenta et foie fœtal, deux organes d'amplification avec des rôles différents ?

Dans les deux organes principaux d'amplification/maturation des CSHs (PI et FF), il semblerait donc que les populations les plus enrichies en CSHs n'expriment pas les mêmes combinaisons de marqueurs de surface. Or, les pics d'activité hématopoïétique de ces deux organes n'ont pas lieu simultanément puisqu'à E12.5 dans le PI, cette activité est au plus haut alors que dans le FF au même stade, l'amplification des CHs/CSHs ne fait que débuter. Par ailleurs, Gekas et al. (2005) avaient montré que le PI diffère du FF d'un point de vue qualitatif. En effet, le microenvironnement du PI est capable d'amplifier et de maintenir un contingent de CSHs pluripotentes sans déclencher leur différenciation vers les lignages myéloïde et érythroïde, alors que les cellules de la niche du FF en revanche supportent activement la différenciation érythro-myéloïde durant la phase d'amplification hématopoïétique. Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que le PI pourrait représenter une niche pré-hépatique dans laquelle les progéniteurs hématopoïétiques/CSHs subissent une "pré-amplification" sans s'engager dans leur processus de différenciation.

Au vu de cette hypothèse, nous avons comparé les degrés d'imbrication des populations $CD34^{+}ckit^{hi}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ dans le PI et le FF à E12.5 (*Figure 47*). Dans le PI, la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ est 4,5 fois moins représentée que la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$, et seulement 30 à 40% des cellules $CD34^{+}ckit^{hi}$ expriment le phénotype $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$. En revanche dans le FF E12.5, c'est la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ qui est moins représentée que la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ (3,6 fois moins, 4% et 14,4% respectivement). Cependant, elle est pratiquement totalement incluse dans la population $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ (90 à 95% - *Figure 47*). Il est intéressant de noter qu'à ce stade, la population $CD144^{+}CD45^{+}$ ne représente que 0,4% des cellules du FF. Etant donné que les CSHs du PI vont coloniser le FF, ces différences soulèvent deux questions principales :

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

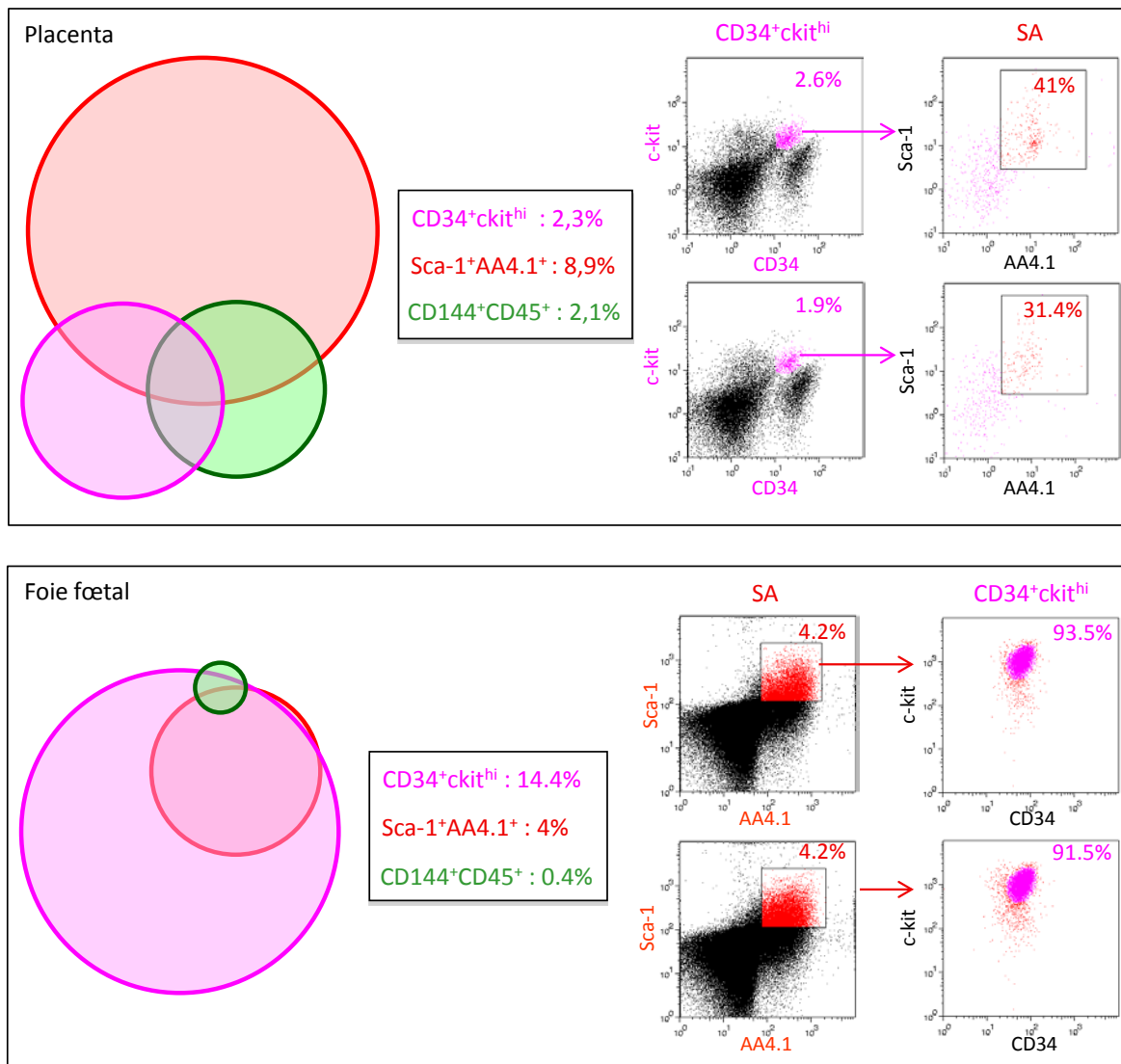


Figure 47 : Relations entre les populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ (SA) du PI et du FF à E12.5

Degrés d'imbrication des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et SA (à gauche). Pourcentages de la fraction SA de la population CD34⁺ckit^{hi} pour le PI et pourcentages de la fraction CD34⁺ckit^{hi} de la population SA pour le FF.

1. La fraction $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^+$ du PI E12.5 est-elle plus enrichie en LTC-IC que la population $CD34^+ckit^{hi}$?

Afin de répondre à cette question, nous avons trié les populations $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^+$, $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^-$ et $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^-$ du PI E12.5, et réalisé des tests LTC-IC. Cette dernière population se révèle être à 98% $AA4.1^+$. Les fréquences de LTC-IC obtenues correspondent respectivement à 1/2.857, 1/333 et 1/2.500. Ces résultats indiquent que l'ajout du phénotype $Sca-1^+AA4.1^+$ n'améliore pas le potentiel hématopoïétique de la population $CD34^+ckit^{hi}$. En effet, la fréquence obtenue pour la population $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^+$ est 12 fois plus faible que celle obtenue pour la population $CD34^+ckit^{hi}$ seule (1/237), ce qui laisse penser qu'elle correspondrait plutôt à une population enrichie en progéniteurs hématopoïétiques qu'en CSHs. Par ailleurs, le potentiel hématopoïétique de la population $CD34^+ckit^{hi}$ est principalement retrouvé dans la fraction $Sca-1^+AA4.1^-$ et n'est donc pas lié à l'expression du marqueur $AA4.1$. En revanche, il semble être lié à l'expression du marqueur $Sca-1$.

Des analyses par cytométrie en flux ont montré que l'expression du marqueur $Sca-1$ augmente dans la population $CD34^+ckit^{hi}$ entre E11.5 et E12.5 (*Figure 48*). Alors que la fraction $Sca-1^+$ de la population $CD34^+ckit^{hi}$ ne représente que 14,42% à E11.5, elle représente 59,04% à E12.5.

Nous avons donc affiné les tris et isolé les populations $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^{hi}AA4.1^+$, $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^{med}AA4.1^+$, $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^-$ et $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^-AA4.1^-$ du PI E12.5. Les résultats confirment ceux obtenus précédemment puisque le potentiel hématopoïétique le plus élevé est retrouvé dans la population $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^-$. De même que pour l'expérience précédente, la fréquence de LTC-IC obtenue est similaire à celle obtenue pour la population $CD34^+ckit^{hi}$ seule.

En résumé, l'expression du marqueur $Sca-1$ augmente dans la population $CD34^+ckit^{hi}$ du PI entre E11.5 et E12.5 mais l'ajout de ce marqueur ne permet pas d'améliorer la fréquence de LTC-IC obtenue à E12.5.

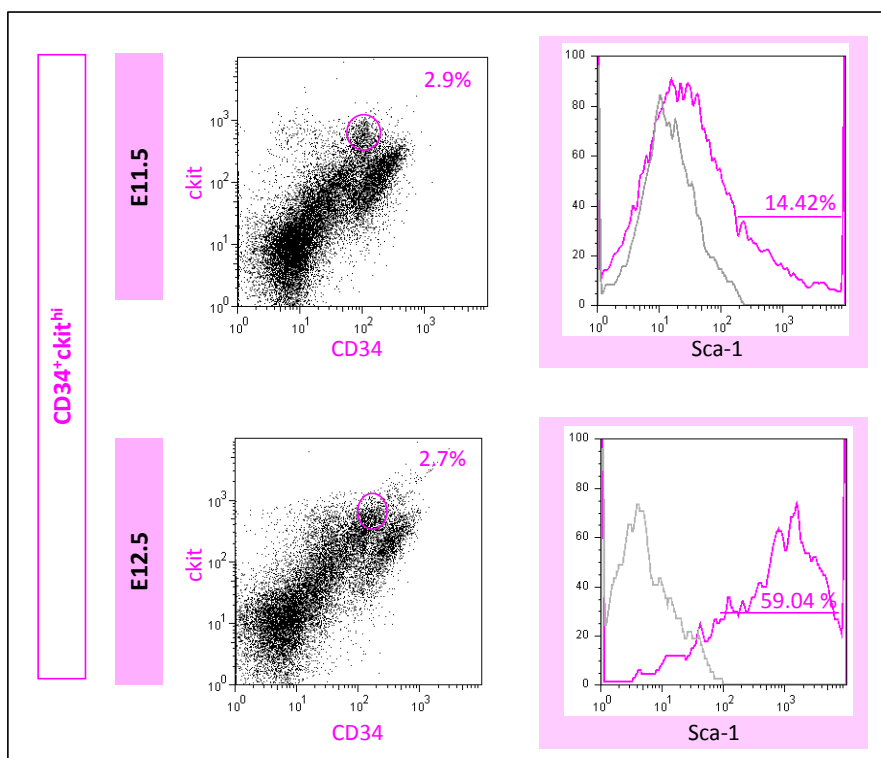


Figure 48 : Augmentation de l'expression du marqueur Sca.1 dans la population $CD34^+ ckit^{hi}$ du PI entre E11.5 et E12.5

E11.5, n=3. E12.5, n=6. Pourcentage de la fraction Sca-1⁺ de la population $CD34^+ ckit^{hi}$. Les contrôles négatifs apparaissent en gris.

2. La population $CD34^+ ckit^{hi}$ du PI E12.5 acquiert-elle le phénotype $Sca-1^+ AA4.1^+$ lors de son passage dans le FF ?

Dans le but d'étudier l'évolution phénotypique de la population $CD34^+ ckit^{hi}$ du PI E11.5 une fois au contact du microenvironnement du FF, nous avons cocultivé par deux fois cette population sur un stroma de cellules AFT024, lignée cellulaire supportrice de l'hématopoïèse générée à partir de cellules de FF E14.5 (Moore et al., 1997a). Dès 2 jours de culture (J2), le phénotype $CD34^+ ckit^{hi}$ et $Sca-1^+ AA4.1^+$ est perdu. Une population $Sca-1^+ AA4.1^+$ réapparaît à J4 et est capable de s'amplifier fortement en culture jusqu'à J9 (Figure 49). Par ailleurs, il apparaît clairement qu'au contact d'un stroma de cellules de FF, les cellulesensemencées sont capables de produire une grande quantité de CHs $CD45^+$. Ces CHs sont observables dès J2 et comme le montre la figure 49C, leur nombre augmente de 18 fois entre J2 et J4. Durant le même laps de temps, la population $Sca-1^+ AA4.1^+$ s'amplifie de 25 fois. Afin de confirmer le caractère immature de cette population $Sca-1^+ AA4.1^+$ issue de la culture, il sera nécessaire de l'isoler et de tester son potentiel en LTC-IC *in vitro* ainsi que son potentiel de reconstitution hématopoïétique.

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

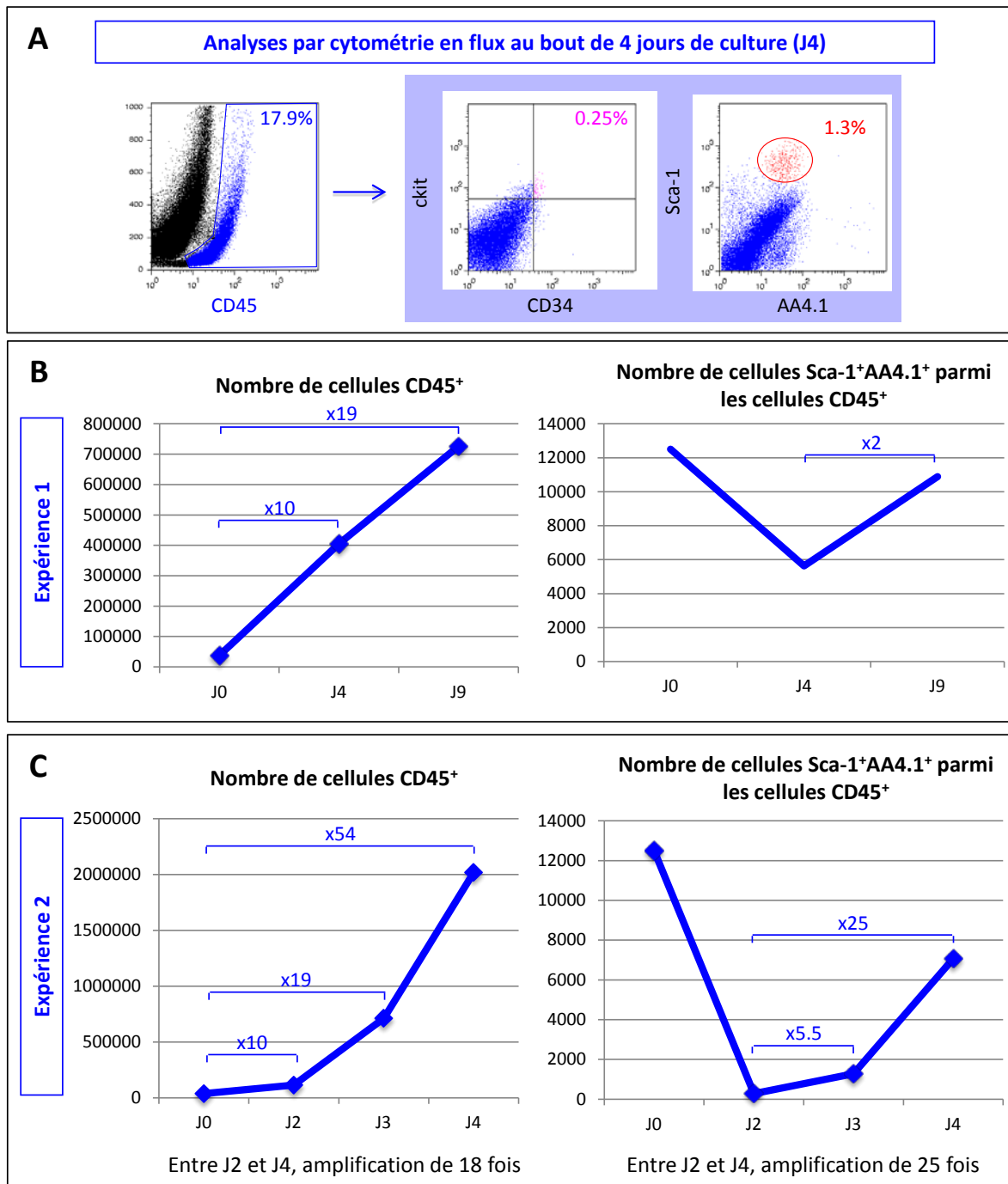


Figure 49 : Évolution de la population CD34⁺ckit^{hi} issue de PI E11.5 après ensemencement sur cellules AFT024

A différents temps de culture, la présence de cellules CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ a été étudiée parmi les CHs CD45⁺. Les analyses correspondantes sont illustrées à J4 en (A). L'évolution du nombre de CHs CD45⁺ produite a été déterminée (B et C, à gauche). Parmi les cellules CD45⁺, l'évolution du nombre de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ est également reportée (B et C, à droite).

1.5 - Conclusion et perspectives

Au niveau du SV, les résultats de notre étude indiquent que la population CD144⁺CD45⁺ possède un potentiel hématopoïétique dès E11.5, soit un jour plus tôt que précédemment annoncé par Taoudi et al. qui ont montré que cette population isolée à E12.5 est capable de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris létalement irradiée (Taoudi et al., 2005).

En accord avec les résultats de Gekas et al. (Gekas et al., 2005), les fréquences de LTC-IC que nous avons obtenues montrent que la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E12.5 est fortement enrichie en CHs immatures. La quantité de LTC-IC au sein de cette population s'amplifie de 10 fois entre E11.5 et E12.5. Selon les données de la littérature actuelle, cette amplification a lieu au sein même du PI mais il n'est pas exclu qu'elle puisse correspondre à un afflux de cellules venant de la circulation sanguine. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en cultivant sur un stroma de PI la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E11.5 afin d'étudier son évolution d'un point de vue fonctionnel et capacité d'amplification. Toutefois, entre E11.5 et E12.5, le nombre de LT-CSHs contenues dans la circulation sanguine passe de 0,6 à 2,3, soit une amplification de 3,8 fois (Kumaravelu et al., 2002 ; Gekas et al., 2005). L'amplification du nombre de LTC-IC CD34⁺ckit^{hi} du PI entre E11.5 et E12.5 ne peut donc pas être simplement due à un afflux de cellules circulantes.

Les résultats des cocultures réalisées sur cellules AFT024 suggèrent que les CSHs CD34⁺ckit^{hi} du PI entrent en différenciation lorsqu'elles entrent en contact avec un microenvironnement de FF et que les CHs ainsi formées s'amplifient massivement. Comme Ottersbach et al. l'avaient déjà suggéré (Ottersbach and Dzierzak, 2005), l'étude approfondie de la population CD34⁺ckit^{hi} indique qu'elle exprime fortement le marqueur Sca-1 à E12.5. L'acquisition de ce marqueur se fait entre E11.5 et E12.5 suggérant qu'en plus d'être un organe d'amplification, le PI pourrait permettre une certaine maturation des CSHs embryonnaires. Toutefois, il n'est pas exclu qu'une population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ enrichie en CSHs arrive dans le PI à 12.5 via la circulation sanguine. L'utilisation d'une lignée stromale issue de PI pourrait ici encore permettre de vérifier cette hypothèse en cultivant la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁻ de PI E11.5 sur un stroma de PI afin d'étudier son éventuelle évolution vers un phénotype CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺. Par ailleurs, si cette évolution existe, il serait également intéressant de cultiver cette même population sur un stroma de FF (cellules AFT024) pour vérifier que cette évolution est réellement liée au microenvironnement placentaire ou si elle a lieu indépendamment du type de microenvironnement rencontré. Nous noterons que l'ajout du marqueur Sca-1 à la population CD34⁺ckit^{hi} ne permet pas d'améliorer son enrichissement en LTC-IC puisque la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ possède un potentiel hématopoïétique similaire à celui obtenu pour la

Partie I : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans les annexes embryonnaires au cours du développement de la souris

population CD34⁺ckit^{hi} seule. Par ailleurs, nos résultats montrent que le marqueur AA4.1 n'est pas lié au potentiel hématopoïétique de cette population.

Dans le PI entre E10.5 et E14.5, la population CD144⁺CD45⁺ s'amplifie massivement et possède aussi un potentiel hématopoïétique manifeste au cours de cette période bien que moins important que celui de la CD34⁺ckit^{hi} à E12.5. Etant donné le degré d'imbrication de ces deux populations à ce stade, il pourrait être intéressant d'étudier le potentiel hématopoïétique de la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺CD144⁺CD45⁺ afin de vérifier si elle ne possède pas un enrichissement plus important en LTC-IC que la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺.

De façon plus générale, ce projet dans son ensemble a permis de montrer que la population la plus enrichie en LTC-IC dans les sites d'émergence hématopoïétique (AGM et SV) exprime le phénotype CD144⁺CD45⁺, soit une combinaison de marqueurs différente de celle exprimée par les populations les plus enrichies en LTC-IC des organes d'amplification (PI et FF). Au moment de l'émergence des CSHs (E11.5), la population CD144⁺CD45⁺ possède une activité hématopoïétique supérieure à celles des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ (Figure 46). La population CD34⁺ckit^{hi} possède également un potentiel hématopoïétique dans l'AGM E11.5, et elle semble amplifier son potentiel entre E11.5 et E12.5 dans le PI, de façon simultanée avec l'augmentation de l'expression du marqueur Sca-1. Finalement à E12.5, début de l'amplification hématopoïétique dans le FF, la population Sca-1⁺AA4.1⁺ prend le relai dans cet organe, et il est probable que la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ du PI acquiert le marqueur AA4.1 dans le FF. L'analyse transcriptomique de ces différentes populations présentant le meilleur potentiel hématopoïétique pour chacun des sites et organes étudiés est en cours. Elle devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux facteurs moléculaires régulant spécifiquement soit l'émergence soit l'amplification des CSHs.

PARTIE II - CARACTÉRISATION DES POPULATIONS ENRICHIES EN CSHs DANS LE PLACENTA AU COURS DU DÉVELOPPEMENT : UTILISATION DE MODÈLES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES

Pour compléter la caractérisation des populations placentaires $CD34^{+}ckit^{hi}$, $CD144^{+}CD45^{+}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ étudiées dans la partie I, nous avons utilisé deux modèles de souris transgéniques possédés par l'équipe.

1. Les souris VECR permettent d'étudier l'origine endothéliale ou non des CHs et de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du Pl.
2. Les souris $Mpl^{-/-}$ permettent d'étudier la cinétique d'évolution des populations placentaires $CD34^{+}ckit^{hi}$, $CD144^{+}CD45^{+}$ et $Sca-1^{+}AA4.1^{+}$ ainsi que le potentiel hématopoïétique de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du Pl dans un modèle qui présente un défaut d'émergence et d'amplification des CSHs lors de la mise en place de l'hématopoïèse définitive.

2.1 - Modèle de souris VECR : Étude de l'origine endothéliale ou non de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du placenta

2.1.1 - Introduction

La souris double transgénique VECR, basée sur le système Cre/loxP, a été conçue dans le but d'évaluer l'origine endothéliale des CSHs. Ces souris résultent du croisement de souris VEC possédant le gène de la recombinaison CRE sous le contrôle des éléments cis régulateurs de la VE-cadhérine, gène exprimé spécifiquement dans les cellules endothéliales (Breier et al., 1996), avec des souris Rosa26R rapportrices conditionnelles possédant le gène rapporteur lacZ sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Soriano, 1999). L'expression de la β -gal, protéine codée par le gène lacZ, est bloquée par une séquence STOP entourée de deux séquences lox ; cette souris est dite « floxée ». Les cellules endothéliales des souris double transgénique VECR ainsi obtenues expriment la recombinaison CRE qui va reconnaître spécifiquement les séquences lox, exciser la séquence STOP et permettre l'expression de la β -gal. Il s'agit d'une altération irréversible du génome se transmettant à toutes les cellules filles, endothéliales ou non. Ainsi, grâce aux souris VECR, il est possible de suivre la descendance des CE jusqu'à la vie adulte.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

Pour tracer la filiation hématopoïétique des premières CE dans l'embryon, plusieurs lignées de souris transgéniques VEC ont été générées. La grande majorité d'entre elles expriment la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de la VeCad uniquement (Alva et al., 2006; Kogata et al., 2006; Monvoisin et al., 2006; Zovein et al., 2008; Chen et al., 2009). Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe de M. Souyri a généré une lignée différente de souris VEC puisque ces souris possèdent le gène de la recombinaison CRE sous le contrôle à la fois du promoteur et de l'enhancer du gène de la VeCad (*Figure 50A*) (Oberlin et al., 2010a). L'équipe de Nishikawa a montré que l'addition des séquences enhancers permettait une expression plus spécifique du transgène par les cellules endothéliales (Hisatsune et al., 2005). Chez les souris double transgéniques VECR obtenues après croisement de ces souris VEC avec les souris Rosa26R-lacZ, il est possible de mettre en évidence les cellules endothéliales et leur descendance soit grâce à la coloration lacZ qui utilise le Xgal, substrat de la β gal, pour les colorations *in toto* ou sur coupes (*Figures 50B et 51*), soit par cytométrie en flux grâce au FDG, substrat fluorescent de la β gal, pour les analyses par cytométrie en flux ou pour les tris cellulaires. Ces souris VECR ont permis de montrer que la majorité au moins des CSHs adultes possède une origine endothéliale (Zovein et al., 2008; Chen et al., 2009; Oberlin et al., 2010a; Zovein et al., 2010).

2.1.2 - Étude topographique après coloration lacZ

Avant d'aborder l'étude de l'origine des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI, j'ai d'abord localisé *in situ* les cellules ayant une ascendance endothéliale au sein de l'architecture placentaire entre E11.5 et E14.5 (*Figure 51*). La coloration lacZ *in toto* (*Figure 51A*) montre que le Xgal marque essentiellement les gros vaisseaux de la plaque chorionique avec un pic de coloration bien visible à E11.5 et E12.5. A E12.5, une très nette coloration est également visible au niveau du labyrinthe comme le montre le PI coupé en deux. A partir d'E13.5, cette coloration diminue fortement mais les vaisseaux du cordon ombilical restent très marqués. Les marquages sur coupes (*Figure 51B*) indiquent la présence de cellules bleues éparses dans le labyrinthe, particulièrement à E12.5. D'après leurs formes arrondies, ces dernières pourraient correspondre à des CHs. De nombreuses cellules marquées dans la plaque chorionique et le cordon ombilical semblent « émerger » de la paroi des gros vaisseaux et forment de petits bourgeonnements. Ce phénomène est clairement visible à E12.5, stade au cours duquel certaines cellules arrondies semblent se détacher de la paroi vasculaire, et se poursuit jusqu'à E14.5. La présence de ces bourgeonnements de cellules lacZ⁺ à E14.5 pourrait expliquer le fait que la population CD144⁺CD45⁺ soit encore présente avec une activité LTC-IC dans le

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

PI à ce stade, alors que la population $CD34^+ckit^{hi}$ n'est pratiquement plus décelable (Figures 44 et 46). Comme nous l'avons vu précédemment, cette population est présente de façon constante dans le PI entre E11.5 et E14.5, tout comme le sont ces foyers de cellules $lacZ^+$ dans les gros vaisseaux.

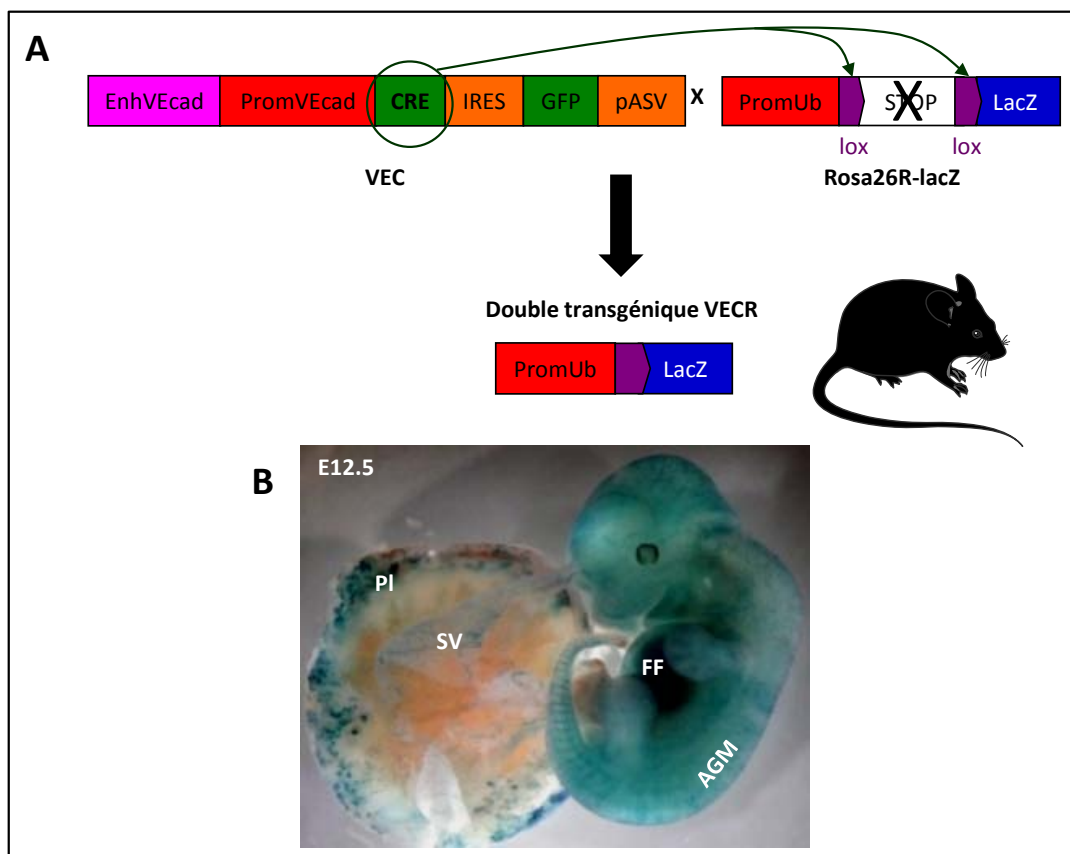


Figure 50 : La souris double transgénique VECR

(A) Schéma représentatif de l'obtention de la souris VECR à partir des souris VEC et Rosa26R-lacZ. **(B)** coloration lacZ des différents organes hématopoïétiques embryonnaires VECR.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

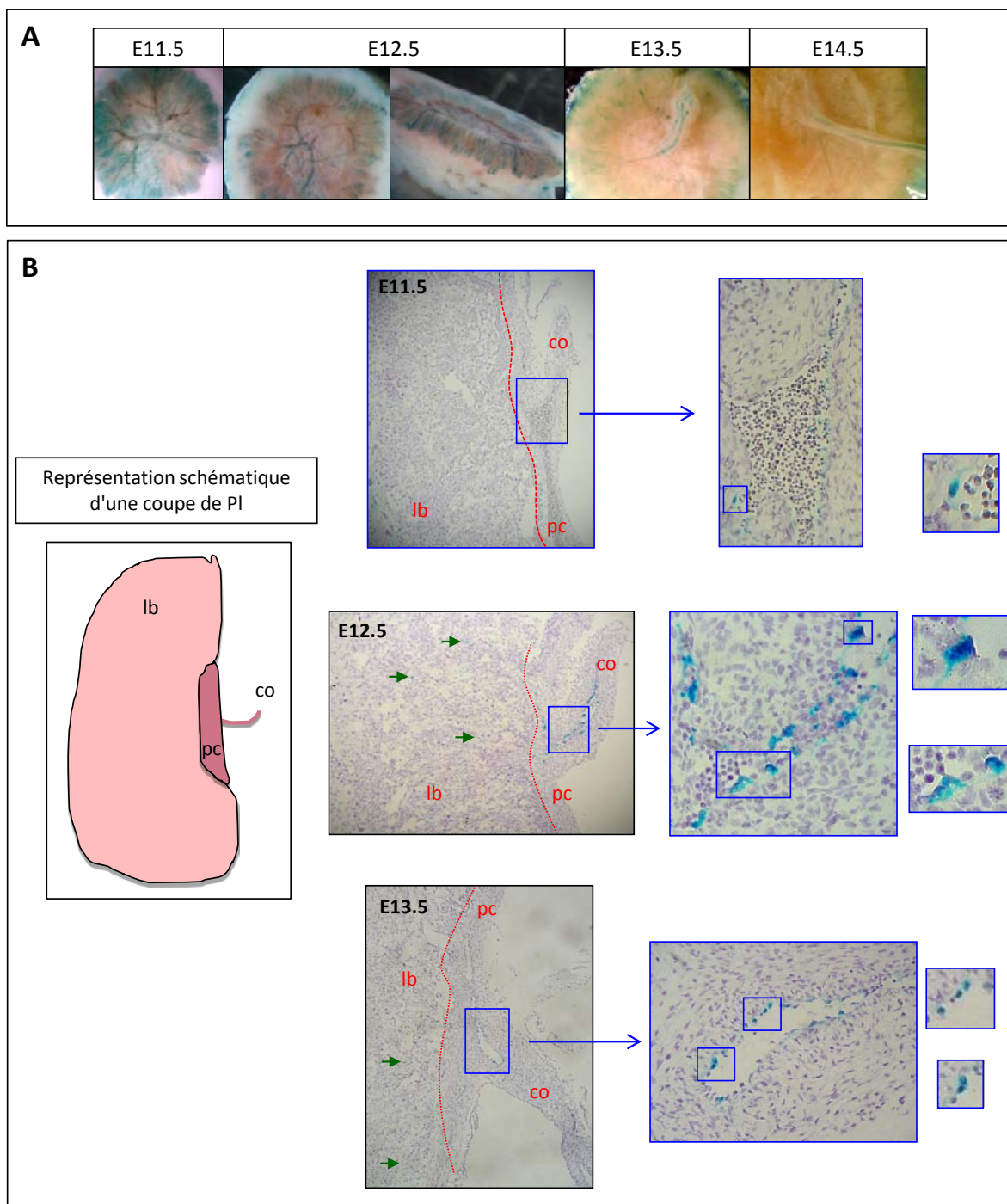


Figure 51 : Coloration lacZ à différents stades du développement

(A) *in toto*. **(B)** sur coupes, 10X (à gauche), grossissement des zones encadrées (à droite). Abréviations utilisées : pc plaque chorionique, lb labyrinthe, co cordon ombilical. Les flèches vertes pointent vers des cellules marquées.

2.1.3 - Origine des CHs (CD45⁺) et de la population CD34⁺ckit^{hi} du placenta

La coloration lacZ ne permet pas d'identifier les cellules lacZ⁺ autrement que par leur localisation et leur morphologie. Pour affiner cette étude topographique et caractériser les cellules lacZ⁺, nous avons donc associé des marqueurs spécifiques de CHs (CD45) et de cellules endothéliales (CE) (CD144) avec le marqueur FDG, substrat fluorescent de la β gal, pour des analyses par cytométrie en flux.

L'association du marqueur FDG avec le phénotype endothélial CD144⁺CD45⁻ nous a permis de montrer que les CE du PI sont bien marquées (*Figure 52A*). En effet, 57,1% des CE sont FDG⁺ à E11.5, et par la suite ce pourcentage atteint 74,1%. Ces résultats indiquent que le transgène VEC fonctionne bien, avec une activation correcte dans les CE.

Cellules hématopoïétiques CD45⁺

Contrairement à ce que nous venons de voir dans les CE, l'analyse de CHs montre que seule une partie d'entre elles est marquée par le FDG et est donc issue de l'endothélium. En effet, si la totalité des CHs possédaient un ancêtre endothélial, le pourcentage de cellules FDG⁺ devrait être au moins égal à celui des CE. Or ce n'est le cas pour aucun des stades étudiés (*Figure 52A*). En rapportant le pourcentage de CHs FDG⁺ au pourcentage de CE FDG⁺ pour chaque stade, les résultats indiquent que la moitié seulement des CHs du PI sont issues de l'endothélium (43% à E11.5, 39,18% à E12.5 et 61,54% à E14.5). Afin de vérifier la validité de ces résultats et d'écarter la possibilité qu'ils soient liés à un problème de marquage FDG lié à une interférence particulière avec le CD45, j'ai réalisé la même étude au niveau du SV. Les résultats indiquent que la grande majorité des CHs du SV sont originaires de l'endothélium (*Figure 52B*). Ainsi, il semblerait qu'une partie non négligeable des CHs du PI ne soit pas issues d'un ancêtre endothélial.

Population CD34⁺ckit^{hi}

J'ai étudié de la même façon l'origine des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ entre E11.5 et E14.5 (*Figure 52A*). Le pourcentage de cellules CD34⁺ckit^{hi}FDG⁺ évolue de manière similaire à celui des CE et passe de 42,2% à E11.5 à 85,4% à E14.5. La population CD34⁺ckit^{hi} du PI semble donc avoir une origine endothéliale. Néanmoins, les résultats obtenus à E11.5 indiquent qu'environ un quart de la population CD34⁺ckit^{hi} pourrait avoir une autre origine que l'endothélium hématogène.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

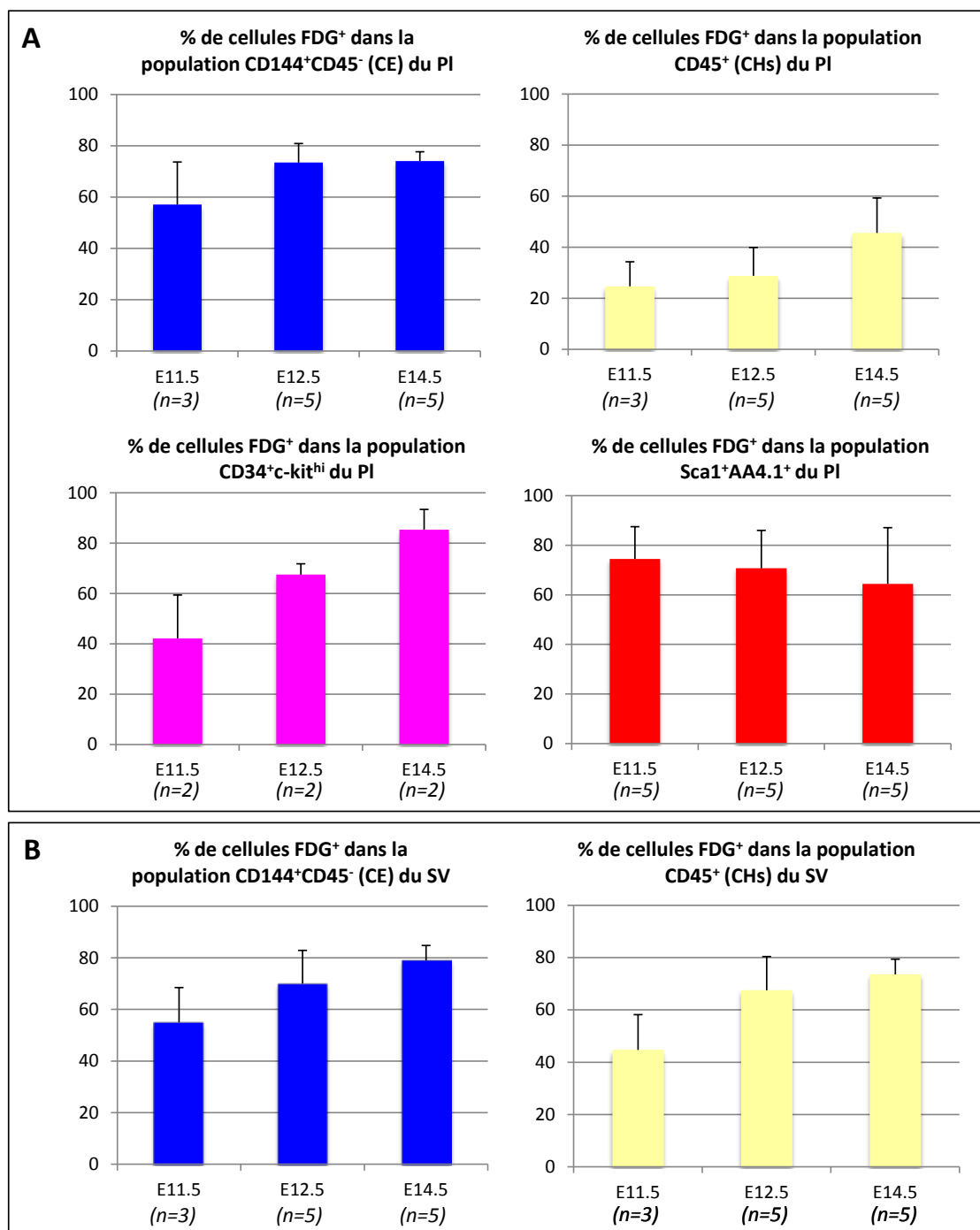


Figure 52 : Étude de l'origine des CHs et CSHs du PI entre E11.5 et E14.5

Analyses du pourcentage des fractions FDG⁺ dans les populations endothéliale (CD144⁺CD45⁻) et hématopoïétique (CD45⁺) du PI et du SV. Proportion de cellules FDG⁺ présentes au sein des populations CD34⁺ckit^{hi} et Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

Ici encore, les résultats obtenus ne sont pas liés à un problème de marquage CD34 et/ou ckit puisqu'au sein de la population Sca-1⁺AA4.1⁺ à E11.5, 74,5% des cellules sont marquées par le FDG. Cette population Sca-1⁺AA4.1⁺ garde un pourcentage élevé de cellules FDG⁺ entre E11.5 et E14.5, aux alentours de 80%. Ce pourcentage est cohérent avec ce que nous avons vu dans la partie I puisque la majorité des cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ sont des CE (CD144⁺CD45⁻).

2.1.4 - Comparaison des propriétés fonctionnelles des fractions FDG⁺ et FDG⁻ de la population CD34⁺ckit^{hi} du placenta

A la lumière des résultats obtenus par cytométrie en flux et de l'hypothèse selon laquelle les cellules CD34⁺ckit^{hi} du PI ne proviennent pas toutes de l'endothélium à E11.5, nous avons voulu tester séparément le potentiel hématopoïétique des fractions FDG⁺ et FDG⁻ de cette population dans l'optique de mettre en évidence des différences. Ce type d'expérience avait été réalisé par l'équipe pour la MO adulte des souris VECR (*Figure 53A*) (Oberlin et al., 2010a). Or au niveau du PI, la séparation des fractions FDG⁺ et FDG⁻ de la population CD34⁺ckit^{hi} ne s'est pas avérée aussi évidente qu'initialement pensé (*Figure 53B*). Les fractions FDG⁻, FDG^{-/low} et FDG⁺ ont malgré tout été triées et leurs potentiels hématopoïétiques respectifs ont été étudiés par des tests LTC-IC (*Figure 53C*). Les résultats préliminaires indiquent que le potentiel hématopoïétique de la population CD34⁺ckit^{hi} est contenu dans la fraction FDG^{-/low}, à savoir des cellules faiblement marquées par le FDG et dont une fraction pourrait ne pas être issue de l'endothélium hématogène.

2.1.5 - Conclusion et perspectives

Le modèle de souris double transgénique VECR m'a permis de montrer qu'entre E11.5 et E14.5, plus de la moitié des CHs CD45⁺ du PI ne sont pas originaires de l'endothélium. Par ailleurs, à E11.5 seuls les trois quarts de la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E11.5 seraient issus de l'endothélium hématogène (FDG⁺) et le faible potentiel hématopoïétique de cette population semble être contenu dans la fraction faiblement marquée par le FDG (FDG^{-/low}). A E12.5, les résultats nous montrent que la population CD34⁺ckit^{hi} fortement enrichie en LTC-IC (voir partie I) est entièrement FDG⁺. Il est possible que la fraction FDG^{-/low} du PI E11.5 ait migré dans la circulation en direction du FF tandis que la fraction FDG⁺ se soit amplifiée dans le microenvironnement placentaire et ait acquis un potentiel hématopoïétique. En cultivant cette fraction FDG⁺ sur un stroma de PI, il serait possible d'étudier son évolution en termes d'amplification et de potentiel hématopoïétique. Il est également envisageable que la fraction FDG^{-/low} ait une capacité de prolifération très faible comparée à la fraction FDG⁺. Pour

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer le pourcentage de cellules en cycle au sein de ces deux fractions. Nous pouvons également envisager qu'à partir d'E12.5, des CHs immatures CD34⁺ckit^{hi} en provenance des bourgeonnements cellulaires du cordon ombilical (voir §2.1.2) migrent dans le PI via la circulation sanguine pour s'amplifier avant de rejoindre le FF. Une dernière hypothèse serait que des CHs immatures CD34⁺ckit^{hi} originaires de l'endothélium de l'AGM E11.5 aient migré dans le PI. Toutefois, il n'est pas exclu que le PI puisse produire lui-même des cellules à potentiel LTC-IC à partir de l'endothélium des vaisseaux du labyrinthe.

A E14.5, la population CD34⁺ckit^{hi} est pratiquement absente du PI (0,18% des cellules totales), et de façon cohérente avec ce qui est observé à E12.5, les cellules CD34⁺ckit^{hi} résiduelles sont d'origine endothéliale.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

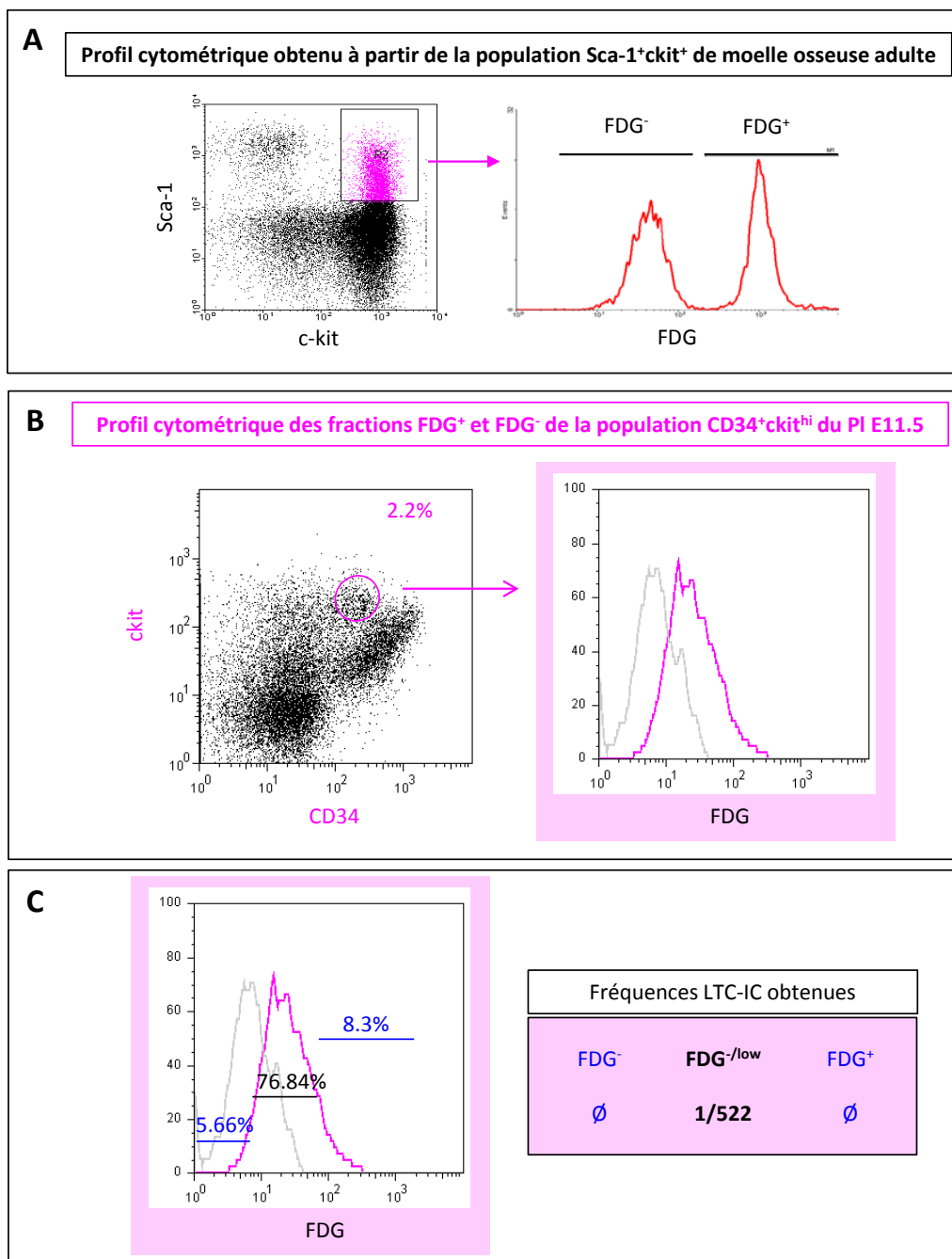


Figure 53 : Étude de l'origine des LTC-IC contenues dans la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E11.5

Profil cytométrique de séparation "type" des fractions FDG⁺ et FDG⁻ obtenu à partir de la population Sca-1⁺ckit⁺ issue de moelle osseuse adulte (A). Profil cytométrique de séparation obtenu à partir de la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E11.5 (B). Fréquences de LTC-IC des fractions FDG⁻, FDG^{-/low} et FDG⁺ de la population CD34⁺ckit^{hi} du PI E11.5 (C). Les contrôles négatifs apparaissent en gris.

2.2 - Propriétés de la population CD34⁺ckit^{hi} du placenta Mpl^{-/-}

2.2.1 - Introduction

Les souris Mpl^{-/-} présentent un défaut à la fois dans la génération et dans l'amplification des CSHs lors de la mise en place de l'hématopoïèse définitive. En effet, au moment de l'émergence des CSHs dans la région AGM à E10.5, bien que les CSHs CD34⁺ckit^{hi} soient plus nombreuses dans les souris Mpl^{-/-}, elles présentent un défaut d'amplification en culture organotypique, problème qui semblait lié à un défaut de survie de ces cellules (Fleury et al., 2010). A E11.5 et E12.5, les embryons Mpl^{-/-} ont une production retardée des CSHs dans la région AGM et ces CSHs présentent un défaut d'autorenouvellement. Un peu plus tard dans le développement, le FF E14.5 des souris Mpl^{-/-} présente un déficit en CSHs Lin⁻Sca-1⁺AA4.1⁺ qui sont moins nombreuses et qui présentent une activité de reconstitution hématopoïétique à long terme diminuée (Petit-Cocault et al., 2007). Les auteurs ont montré également que malgré un contingent plus élevé de progéniteurs hématopoïétiques, le PI Mpl^{-/-} E12.5 présentait lui aussi un défaut de contenu en CSHs comparé au PI C57Bl6. Il était donc intéressant d'analyser le contenu en CHs du PI des souris Mpl^{-/-} entre E11.5 et E12.5, en particulier les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺, et d'analyser le potentiel hématopoïétique de la population CD34⁺ckit^{hi} à E12.5 afin de voir si elle présentait également un défaut en CSHs.

2.2.2 - Étude cinétique d'apparition des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans le placenta de souris Mpl^{-/-} par cytométrie en flux

Entre E10.5 et E12.5, les cellularités des PI Mpl^{-/-} sont identiques à celles des PI C57Bl6 (*Figure 54*). Nous avons étudié les populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI Mpl^{-/-} à E11.5 et E12.5, stades au cours desquels l'activité hématopoïétique est maximale dans cet organe (*Figure 55*). Les pourcentages des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ du PI Mpl^{-/-} ne semblent pas être différents de ceux obtenus dans le PI C57Bl6 (*Figure 56*). Nous noterons toutefois une différence de pourcentages entre les populations CD34⁺ckit^{hi} des PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 à E11.5 (respectivement 2,5% et 3,02%). La proportion de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI Mpl^{-/-} à E12.5 est 1,6 fois plus faible que celle du PI C57Bl6 au même stade (respectivement 6,59% et 10,42%, p<0,1%). Alors que le pourcentage de cette population augmente d'1,6 fois entre E11.5 et E12.5 dans le PI C57Bl6, il reste identique dans le PI Mpl^{-/-}. Lorsque ces pourcentages sont rapportés en nombre de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ par PI, les

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

résultats montrent que le nombre de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ augmente en moyenne de 2,2 fois entre E11.5 et E12.5 dans le PI Mpl^{-/-} et de 2,9 fois dans le PI C57Bl6. Ces résultats restent à confirmer mais il semblerait que la population Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI Mpl^{-/-} présente un défaut d'amplification entre E11.5 et E12.5. A la suite de cette observation, j'ai voulu savoir si ce défaut d'amplification portait sur la fraction hématopoïétique (CD45⁺) et/ou sur la fraction endothéliale (CD144⁺CD45⁻) de la population Sca-1⁺AA4.1⁺. Cette analyse a montré qu'à E12.5, les populations Sca-1⁺AA4.1⁺ des PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 possédaient les mêmes pourcentages de CHs et CE (environ 10% de CHs CD45⁺ et 85% de CE CD144⁺CD45⁻).

Nous avons également comparé les pourcentages d'imbrications des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans le PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 à E12.5 (*Figure 57*). De façon générale, les profils d'imbrication sont très similaires, si ce n'est que les trois populations sont plus imbriquées les unes dans les autres dans le PI Mpl^{-/-} qu'elles ne le sont dans le PI C57Bl6. En effet, la population CD34⁺ckit^{hi} du PI Mpl^{-/-} contient à ce stade 1,3 fois plus de cellules CD144⁺CD45⁺ et 1,2 fois plus de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺, la population CD144⁺CD45⁺ contient 1,5 fois plus de cellules CD34⁺ckit^{hi} et un pourcentage identique de cellules Sca-1⁺AA4.1⁺ (environ 50%), et la population Sca-1⁺AA4.1⁺ contient 2,4 fois plus de cellules CD34⁺ckit^{hi} et 1.6 fois plus de cellules CD144⁺CD45⁺.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

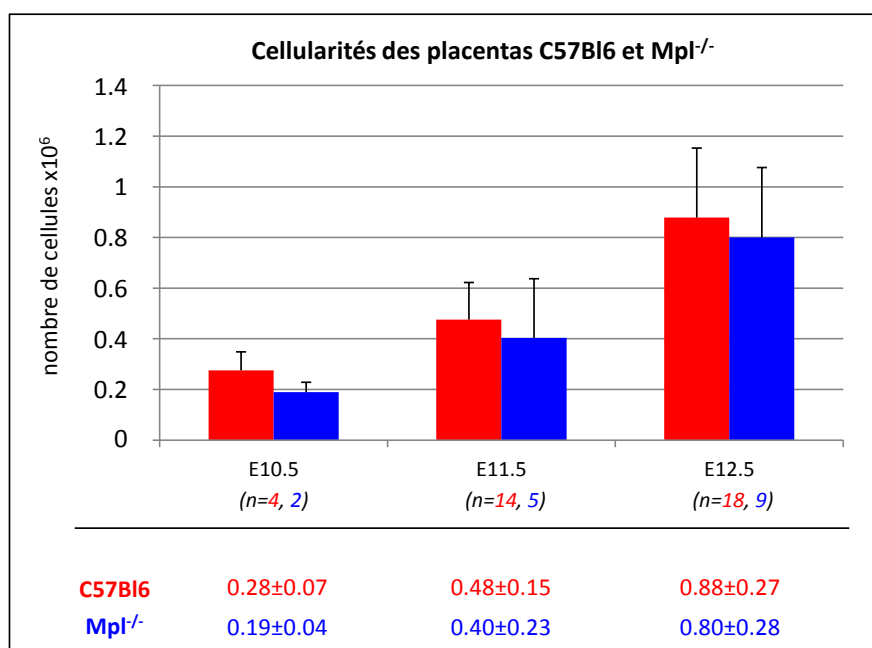


Figure 54 : Comparaison des cellularités des PI des souris C57Bl6 et Mpl^{-/-} entre E10.5 et E12.5

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

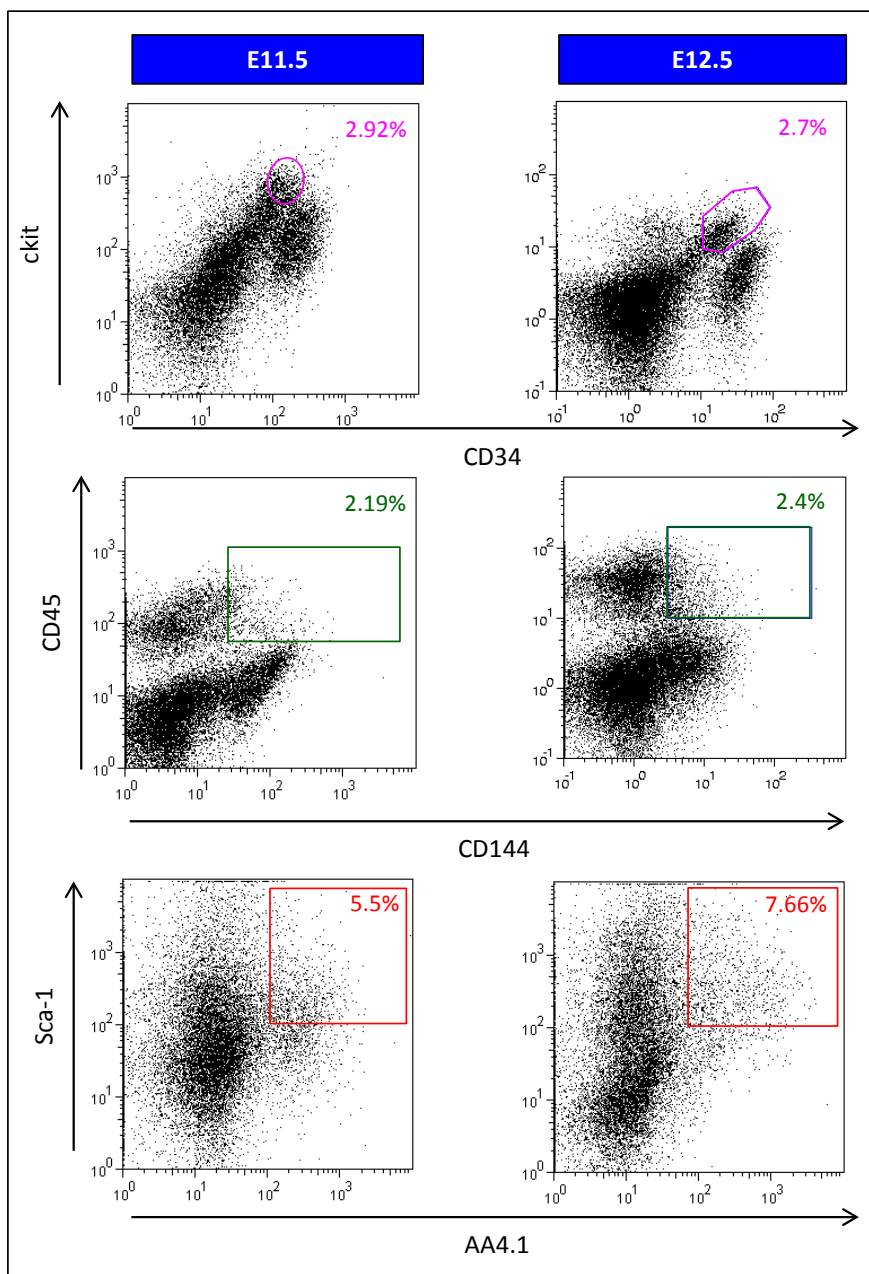


Figure 55 : Étude cinétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ au cours du développement du placenta de souris Mpl^{-/-} (E11.5 à E12.5)

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

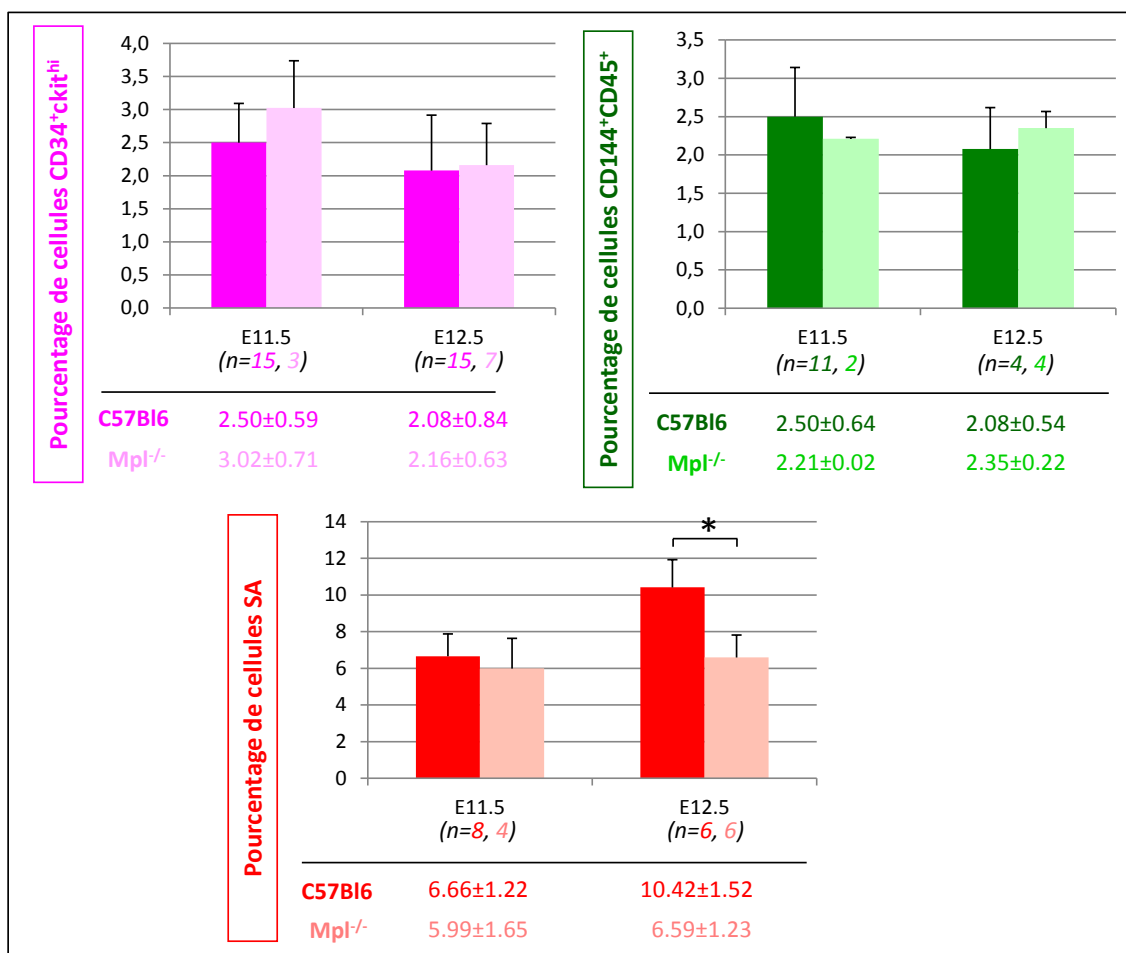


Figure 56 : Comparaison des pourcentages des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ (SA) dans les placentas C57Bl6 et Mpl^{-/-} à E11.5 et à E12.5

* : p<0.1%, test de Mann-Whitney

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

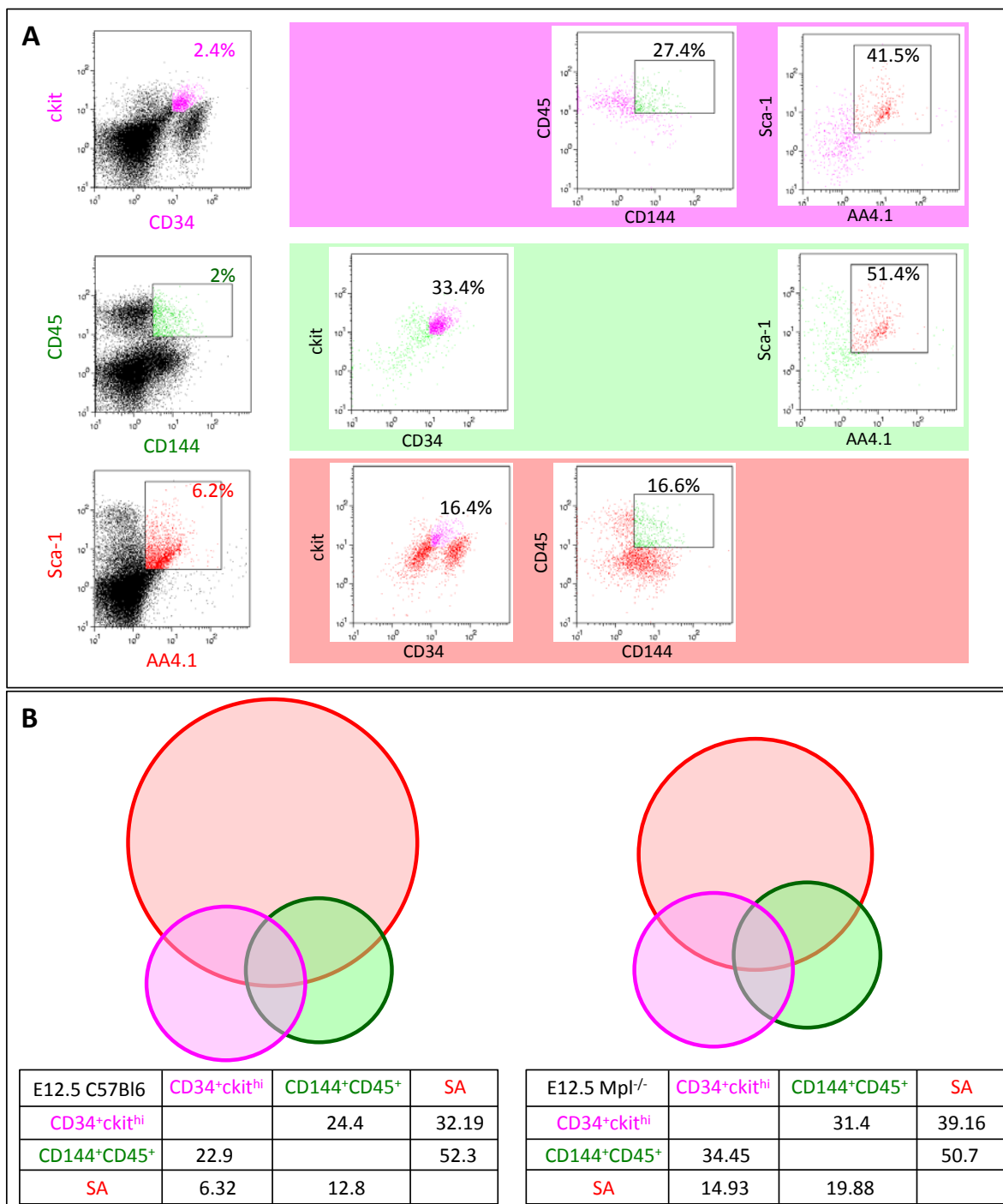


Figure 57 : Pourcentages d'imbrication des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ (SA) dans les PI C57Bl6 et Mpl^{-/-} à E12.5

(A) Profils cytométriques illustrant l'analyse Mpl^{-/-} à E12.5. (B) Imbrications à E12.5 dans le PI C57Bl6 (à gauche) et Mpl^{-/-} (à droite). Populations CD34⁺ckit^{hi} et SA, n=6 ; population CD144⁺CD45⁺, n=2 (à gauche) et n=4 (à droite).

2.2.3 - Comparaison du potentiel hématopoïétique des populations CD34⁺ckit^{hi} issues de placentas de souris Mpl^{-/-} et C57Bl6

J'ai ensuite comparé le potentiel hématopoïétique (fréquences CA-FC J7 et LTC-IC) de la population CD34⁺ckit^{hi} du PI Mpl^{-/-} avec celle de la population CD34⁺ckit^{hi} du PI C57Bl6 (Partie I). A E11.5 comme à E12.5, je n'ai pas observé de différences de fréquences de précurseurs hématopoïétiques dans les populations CD34⁺ckit^{hi} des PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 (Tableaux 5 et 6), ce qui va dans le même sens que ce qui a été décrit *in vivo* (Petit-Cocault et al., 2007). En revanche, la fréquence de LTC-IC CD34⁺ckit^{hi} du PI Mpl^{-/-} à E11.5 est 6 fois inférieure à celle obtenue dans le PI C57Bl6 au même stade (respectivement 1/8.230 et 1/1.354). Toutefois à E12.5, les résultats préliminaires indiquent que la fréquence de LTC-IC CD34⁺ckit^{hi} est similaire dans les PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 (respectivement 1/222 et 1/237).

Fréquence de précurseurs	C57Bl6	Mpl ^{-/-}	Fréquence de LTC-IC	C57Bl6	Mpl ^{-/-}
E11.5 (n=5,2)	1/54	1/44	E11.5 (n=4,2)	1/1354	1/8230
E12.5 (n=2,1)	1/24	1/19	E12.5 (n=2,1)	1/237	1/222

Tableaux 5 et 6 : Comparaison du potentiel hématopoïétique des populations CD34⁺ckit^{hi} issues de PI C57Bl6 et Mpl^{-/-} à E11.5 et E12.5

2.3 - Conclusion et perspectives

Dans le PI Mpl^{-/-} à E11.5, le pourcentage de cellules CD34⁺ckit^{hi} est légèrement augmenté par rapport à celui obtenu dans le PI C57Bl6. Toutefois, il semble que cette différence disparaisse à E12.5, suggérant un problème au niveau de l'amplification de ces cellules. Il serait maintenant intéressant d'étudier et de comparer les pourcentages de cellules CD34⁺ckit^{hi} issues des PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 à E10.5. Le potentiel défaut d'amplification de cellules CD34⁺ckit^{hi} observé à E11.5 pourrait être lié à un défaut de survie des cellules, comme cela avait déjà été montré pour les CHs issues de la région AGM E10.5 (Fleury et al., 2010). Une étude comparative de la quantité de cellules CD34⁺ckit^{hi} en apoptose (marquage à l'annexine V par cytométrie en flux) dans les PI Mpl^{-/-} et C57Bl6 serait donc à envisager à E11.5, mais aussi à E10.5. Il serait également intéressant d'étudier et de comparer d'une part les niveaux d'expression des marqueurs anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 exprimés au sein de cette population dans les PI Mpl^{-/-} et C57Bl6, et d'autre part les pourcentages de cellules CD34⁺ckit^{hi} en cycle dans les PI Mpl^{-/-} et C57Bl6. Étant donné le défaut d'amplification observé au niveau de la population Sca-1⁺AA4.1⁺ du PI Mpl^{-/-} à E12.5, les mêmes expériences pourraient être menées.

Partie II : Caractérisation des populations enrichies en CSHs dans le placenta au cours du développement : utilisation de modèles de souris transgéniques

De façon intéressante, la fréquence de LTC-IC de la population CD34⁺ckit^{hi} s'avère être plus faible à E11.5 dans le PI Mpl^{-/-} que dans le PI C57Bl6. Malgré le fait qu'il semblerait que ces fréquences soient identiques à E12.5, il n'est pas exclu que les propriétés souches hématopoïétiques des CSHs CD34⁺ckit^{hi} du PI Mpl^{-/-} soient différentes de celles du PI C57Bl6. Pour lever cette incertitude, la comparaison de l'activité LTRA des populations CD34⁺ckit^{hi} issues des PI C57Bl6 et Mpl^{-/-} à E12.5 est actuellement en cours.

Discussion

DISCUSSION

Réussir à isoler une population cellulaire composée uniquement de CSHs est essentielle pour l'étude des mécanismes moléculaires et fonctionnels qui régulent l'autorenouvellement et la différenciation de ces cellules. Quel que soit le tissu hématopoïétique considéré, les CSHs constituent une population très rare et difficile à purifier. Actuellement, aucune combinaison de marqueurs ne permet d'isoler une population pure de CSHs, et leur identification au sein d'une population est rétrospective et basée sur leur capacité à reconstituer le système hématopoïétique de souris létalement irradiées. Toutefois plusieurs tests *in vitro*, notamment le test LTC-IC, ont été mis au point pour tester le degré d'enrichissement de populations cellulaires en CHs immatures. Après la cellule ELTC-IC (voir Introduction Chapitre I), la cellule LTC-IC est aujourd'hui la CH la plus immature détectable *in vitro*.

A défaut de pouvoir les isoler à pureté, il est possible d'enrichir une population en CSHs grâce à certaines combinaisons de marqueurs de surface. Ainsi, de nombreux phénotypes ont été décrits et utilisés dans les divers sites et organes hématopoïétiques embryonnaires (SV, AGM, PI et FF) pour permettre un enrichissement conséquent en CSHs à différents moments du développement embryonnaire et parmi eux, les combinaisons CD34⁺ckit^{hi} (Sanchez et al., 1996; Yoder et al., 1997a; Gekas et al., 2005), CD144⁺CD45⁺ (Taoudi et al., 2005) et Sca-1⁺AA4.1⁺ (Jordan et al., 1995).

Aucune étude n'avait jusqu'à présent comparé en parallèle le potentiel hématopoïétique des populations CD34⁺ckit^{hi}, CD144⁺CD45⁺ et Sca-1⁺AA4.1⁺ dans les différents sites et organes hématopoïétiques embryonnaires à différents temps du développement. Le projet global de l'équipe visait d'une part à réaliser cette étude comparative, et d'autre part à mettre en évidence des facteurs spécifiques régulant soit l'émergence (AGM et SV) soit l'amplification (PI et FF) des CSHs dans l'embryon. Les transcriptomes des populations les plus enrichies en LTC-IC dans chaque site/organe hématopoïétique sont actuellement en cours d'établissement. Ma contribution dans cette étude a porté sur les annexes embryonnaires (SV et PI), et mon travail de thèse a permis de montrer que selon le stade de développement et le site/organe hématopoïétique étudié, les populations présentant le meilleur potentiel hématopoïétique n'expriment pas les mêmes combinaisons de marqueurs de surface.

1 - Dans les sites d'émergence (AGM) et d'émergence/amplification hématopoïétique (SV), la population CD144⁺CD45⁺ est enrichie en LTC-IC

De nombreuses études ont permis de montrer que l'AGM et le SV sont capables de supporter et d'amplifier un contingent de CSHs *in vitro* (Matsuoka et al., 2001; Oostendorp et al., 2002; Li et al., 2003; Kumaravelu et al., 2002; Krassowska et al., 2006). Contrairement au PI et au FF, aucune accumulation de CSHs n'est visible dans ces deux tissus, suggérant qu'ils fonctionnent comme sites d'émergence plutôt qu'organes d'amplification de CSHs. Toutefois, les données de la littérature montrent une accumulation de progéniteurs hématopoïétiques au niveau du SV au cours du développement, atteignant un pic à E10.5-E11.5, suggérant que cet organe peut avoir des propriétés d'amplification hématopoïétique.

Dans l'AGM. Conformément aux résultats de Sanchez et al. (1996) et Taoudi et al. (2005), nos résultats de tests LTC-IC indiquent que les populations CD34⁺ckit^{hi} et CD144⁺CD45⁺ sont enrichies en CHs immatures dans l'AGM. A E11.5, elles contiennent chacune 1 LTC-IC, en accord avec les données de la littérature qui indiquent qu'à ce stade, l'AGM contient 1 à 2 CSHs (*Figure 58*). Étant donné que la population CD144⁺CD45⁺ est moins représentée que la population CD34⁺ckit^{hi} à E11.5, la différence de fréquence de LTC-IC observée entre les populations CD34⁺ckit^{hi} et CD144⁺CD45⁺ (*Figure 42*) indique que le choix de la combinaison CD144⁺CD45⁺ serait plus discriminant que celui de la combinaison CD34⁺ckit^{hi} pour isoler une population enrichie en CSHs.

Les travaux réalisés par l'équipe d'Iruela-Arispe suggèrent que la grande majorité des CSHs adultes possèdent une origine endothéliale (Alva et al., 2006; Monvoisin et al., 2006; Zovein et al., 2008; Speck et al., 2009), résultats appuyés par l'équipe de M. Souyri (Oberlin et al., 2010a). De fait, dans l'AGM, la population enrichie en CHs immatures CD144⁺CD45⁺ exprime à la fois un marqueur endothélial (CD144) et un marqueur hématopoïétique (CD45) et est issue de l'endothélium de la paroi aortique. De plus, les cellules CD144⁺CD45⁺ expriment fortement d'autres marqueurs endothéliaux tels que Tie-2 (73%), Flk1 (86%), CD31 (98%) et CD34 (54%) (Taoudi et al., 2005). La plupart des CSHs perdent l'expression du marqueur CD144 à E13.5 lors de leur passage dans le FF (Kim et al., 2005) mais cette perte n'est pas liée au microenvironnement et correspond à une évolution naturelle intrinsèque aux CSHs (Taoudi et al., 2005). En effet, la population CD144⁻ de l'AGM E12.5 possède déjà une activité LTRA, preuve que certaines CSHs commencent à perdre le CD144 alors qu'elles n'ont pas encore quitté l'AGM, phénomène qui se produit également dans le PI (voir plus bas, et Taoudi et al., 2005).

Dans le sac vitellin. A E11.5, j'ai montré que la population CD144⁺CD45⁺ du SV possède un potentiel hématopoïétique avec environ 4,5 LTC-IC, soit environ autant que le nombre de LT-CSHs décrit dans le SV E13.5 (*Figure 58*). Nos résultats préliminaires *in vitro* (n=1) ne semblent pas révéler le potentiel hématopoïétique de cette population à E12.5, bien qu'elle contienne manifestement des LT-CSHs (Kumaravelu et al., 2002; Taoudi et al., 2005). De la même façon, les travaux de Petit-Cocault et al. (2007) n'ont pas permis la mise en évidence de l'activité LTRA du SV E12.5. Ces variations de résultats pourraient s'expliquer par les différences de protocoles de dissociation et de préparation des suspensions cellulaires utilisés, ou encore par les différences de stades étudiés (E12 vs E12.5). Il serait maintenant nécessaire d'étudier l'activité LTRA de cette population à E11.5, afin de déterminer si elle contient déjà des LT-CSHs à ce stade.

La population CD34⁺ckit^{hi} du SV contient un léger potentiel hématopoïétique à E10.5 et E11.5, reflétant probablement le potentiel hématopoïétique de cette population décrit au stade E9.5 par Yoder et al. (1997a). Pour appuyer cette hypothèse, il serait important de vérifier que la fréquence de LTC-IC de la population CD34⁺ckit^{hi} du SV à E9.5 est plus élevée que celle obtenue à E10.5.

Grâce à l'ensemble de ces données, nous pouvons supposer que dans le SV, les CSHs CD144⁺CD45⁺ prennent le relais des CSHs CD34⁺ckit^{hi} à partir d'E11.5.

2 - Le placenta, source potentielle de CSHs et organe transitoire d'amplification/maturation hématopoïétique

A l'heure actuelle, seule la région AGM a été clairement définie comme étant un site d'émergence de CSHs *in vivo*. Toutefois, les résultats des reconstitutions compétitives de Gekas et al. montrent que l'apparition de l'activité hématopoïétique dans le PI a lieu à E10.5, simultanément avec celle de la région AGM, suggérant que le PI et l'AGM pourraient constituer deux sites d'émergence hématopoïétique distincts. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux d'Ottersbach et Dzierzak (2005) qui ont montré à partir de reconstitutions hématopoïétiques non compétitives que ce n'est seulement qu'à partir d'E11.5 que le PI contient des CHs multipotentes possédant une activité LTRA. Contrairement à l'AGM qui ne contient au maximum que 3 CSHs, la quantité de CSHs dans le PI augmente de façon importante à partir d'E10.5 et atteint un pic à E12.5 avec 31 CSHs environ (Ottersbach et al., 2005; Gekas et al., 2005, *Figure 58*). A ce stade, le PI contient environ 10 fois plus de CSHs que l'AGM et 11 fois plus que le SV. L'augmentation massive du nombre de LT-CSHs entre E11.5 et E12.5 dans le PI (12 fois, passant de 2,5 à 31) et dans le FF (37 fois, passant de 2 à 73,2) reflète le potentiel d'amplification hématopoïétique de ces deux organes. De façon cohérente avec ces résultats issus d'expériences *in vivo*, j'ai montré que le nombre de LTC-IC CD34⁺ckit^{hi} augmente

d'environ 10 fois dans le PI entre E11.5 et E12.5, passant de 2 à 21. Étant donné que la signalisation Mpl/TPO joue un rôle important dans l'autorenouvellement et l'amplification hématopoïétique au cours du développement (Petit-Cocault et al., 2007; Fleury et al., 2010), l'étude moléculaire des populations CD34⁺ckit^{hi} du PI C57Bl6 à E11.5 et à E12.5 pourrait permettre de connaître le degré d'expression de Mpl dans ces cellules, récepteur qui, au vu de mes résultats, est possiblement impliqué dans l'augmentation du potentiel hématopoïétique des cellules CD34⁺ckit^{hi} entre E11.5 et E12.5. Par ailleurs, les travaux de Fleury et al. (2010) indiquent que les facteurs Runx1, HoxB4 et Meis1 ont une expression diminuée au niveau de l'AGM E10.5 des souris Mpl^{-/-}. Il serait donc intéressant d'étudier par qPCR la possibilité que certains facteurs jouant un rôle dans l'émergence (Runx1) et/ou dans l'amplification hématopoïétique (HoxB4, Meis1, GATA-2, c-Myb, Pu.1) présentent un défaut d'expression dans la population CD34⁺ckit^{hi} du PI Mpl^{-/-} par rapport au PI C57Bl6. Jusqu'à présent, à E12.5, seule l'activité LTRA de la population CD34⁺ckit^{hi} a été testée dans le PI C57Bl6 (Gekas et al., 2005). Pour confirmer son caractère souche, il serait maintenant nécessaire d'étudier son potentiel d'autorenouvellement *in vitro* (ELTC-IC) et *in vivo* (test de reconstitution hématopoïétique secondaire), ainsi que sa capacité à générer l'ensemble des types cellulaires hématopoïétiques. A E13.5, stade à partir duquel l'AGM ne produit plus des CHs/CSHs, le nombre de CSHs reste élevé dans le PI. Entre E13.5 et E14.5, l'activité LTRA des cellules du PI chute drastiquement pour disparaître totalement à E15.5, suggérant la perte des propriétés de maintien hématopoïétique de la niche placentaire. *In vitro*, j'observe également cette diminution du potentiel hématopoïétique mais un jour plus tôt, à partir d'E12.5, reflet probable de la différence entre les tests *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'absence de détection *in vitro* à E13.5 de l'activité hématopoïétique réelle du PI soit due au fait qu'une population différente des trois populations étudiées possède un potentiel hématopoïétique important à ce stade.

En 2005, Ottersbach et al. avaient suggéré la possibilité de l'existence d'un endothélium hématogène dans le PI suite à l'observation de cellules CD34⁺Sca-1⁺ accolées aux parois des vaisseaux sanguins du labyrinthe, rappelant les clusters aortiques émergeant dans la région AGM. De même, en 2010, des clusters hématopoïétiques de plus de 30 cellules ont été mis en évidence dans le labyrinthe placentaire par l'équipe de Sugiyama, ce qui constitue un nouvel argument en faveur d'une possible émergence hématopoïétique placentaire (Sasaki et al., 2010). Comme dans l'AGM, ces clusters sont visibles entre E10.5 et E12.5 et partagent l'expression de marqueurs à la fois hématopoïétiques et endothéliaux. A partir d'E11.5, certaines cellules de ces clusters expriment le phénotype CD31⁺CD34⁺ckit⁺Sca-1⁺CD45⁺CD41⁺. L'ensemble de ces données rejoint en partie nos résultats qui

indiquent que la population $CD34^{+}ckit^{hi}Sca-1^{+}$ du PI possède un fort potentiel hématopoïétique à E12.5 et exprime en grande majorité le CD45.

En plus d'améliorer considérablement leur potentiel hématopoïétique entre E11.5 et E12.5, l'expression du marqueur CD45 au sein de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ augmente (36,5% à E11.5 et 91,3% à E12.5). Les CSHs $CD34^{+}ckit^{hi}CD45^{+}$ du PI seraient donc présentes en minorité à E11.5 et en majorité à E12.5, conséquence probable de l'amplification hématopoïétique se produisant au sein même du PI entre ces deux stades. Toutefois, ce schéma rappelle ce qui se produit dans l'aorte au moment de l'émergence des CSHs puisque celles-ci sont majoritairement $CD45^{-}$ à E10.5 et que l'expression du CD45 par les CSHs n'augmente qu'à E11.5, moment du pic d'activité hématopoïétique dans l'aorte (North et al., 2002; Matsubara et al., 2005). Il n'est donc pas exclu qu'une partie de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ émerge au sein du PI à E11.5 et acquiert l'expression du marqueur CD45 entre E11.5 et E12.5. Par ailleurs, les travaux de Taoudi et al. montrent que l'expression du marqueur CD144 diminue au sein de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du PI entre E11.5 et E12.5 (60% à E11.5 et 24% à E12.5), phénomène se produisant également au cours de la maturation des CSHs ayant émergé de l'endothélium de la paroi de l'aorte à E12.5 (voir plus haut, et Taoudi et al., 2005).

La présence de clusters et l'évolution similaire des CSHs de l'AGM et du PI appuient un peu plus l'hypothèse selon laquelle ces deux tissus constitueraient deux sites d'émergence hématopoïétique distincts.

La perte d'expression du marqueur CD144 observée dans la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du PI indique que ces cellules possèdent une origine endothéliale et de fait, nos résultats sur le PI des souris double transgéniques VECR suggèrent que dès E11.5, la majorité de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ est issue de l'endothélium hémotogène. Il serait nécessaire de vérifier cet aspect en étudiant l'activité LTRA de la fraction FDG^{+} de la population $CD34^{+}ckit^{hi}$ du PI à E11.5, mais aussi à E12.5. Il est possible que les cellules $CD34^{+}ckit^{hi}$ issues de l'endothélium observées dans le PI à E11.5 s'amplifient massivement dans le PI, ce qui expliquerait que la grande majorité des cellules $CD34^{+}ckit^{hi}$ soient FDG^{+} à E12.5. Toutefois, il est également envisageable que des cellules $CD34^{+}ckit^{hi}$ issues de l'endothélium soient arrivées dans le PI via la circulation sanguine, en provenance de l'AGM et/ou des artères ombilicale et vitelline. Pour finir, il n'est pas exclu que des cellules endothéliales hémogéniques capables de générer des CHs/CSHs soient présentes au sein même du PI. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questionnements, il serait possible d'utiliser le modèle de souris transgénique VECR et de se placer suffisamment tôt dans le développement (avant E8.5) pour pouvoir s'affranchir des mouvements cellulaires dus à la circulation sanguine. Le chorions et l'allantoïde, futur placenta, seraient alors récupérés séparément et ensemencés sur tapis de cellules MS5 soit directement après

dissociation, soit après avoir été maintenus en culture organotypique pendant 24h à 48h. Au bout de 35 jours, ces cocultures nous permettraient de voir si l'un et/ou l'autre de ces deux organes sont capables de produire des CHs FDG⁺ issues de l'endothélium.

Par ailleurs, l'expression du Sca-1 dans les cellules CD34⁺ckit^{hi} est augmentée entre E11.5 et E12.5 (respectivement 14,42% et 59,04%). Étant destinées à migrer dans le FF, organe dans lequel la population la plus enrichie en CSHs exprime le marqueur Sca-1 (*Figure 46*), il est possible que l'acquisition du marqueur Sca-1 puisse être nécessaire aux CSHs CD34⁺ckit^{hi} du PI pour leur permettre de migrer dans le FF. Bien que l'ajout de ce marqueur n'améliore pas le potentiel hématopoïétique *in vitro* de la population CD34⁺ckit^{hi} dans le PI à E12.5, une différence d'activité LTRA ou d'autorenouveaulement ne peut pas être exclue et serait à vérifier. La mise en culture de la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁻ du PI E11.5 sur tapis des cultures primaires de cellules stromales de PI permettra de déterminer si l'acquisition du Sca-1 par les cellules CD34⁺ckit^{hi} ainsi que l'augmentation du potentiel hématopoïétique de cette population observée entre E11.5 et E12.5 a lieu au sein même du PI, ou si elle est due à un arrivage de cellules Sca-1⁺ via la circulation sanguine. Il est en effet envisageable qu'en plus de promouvoir l'amplification d'un contingent de CSHs, le microenvironnement du PI permette aux CSHs d'évoluer d'un point de vue phénotypique. Toutefois, il n'est pas exclu que l'acquisition de l'expression du Sca-1 soit une évolution naturelle de la population, indépendamment de tout microenvironnement. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des cultures d'explants de PI E11.5 selon la méthode décrite par Kumaravelu et al. (2002) afin d'étudier l'apparition de CSHs CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ et de comparer l'activité LTRA des fractions CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁻ et CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ issues de la culture.

3 - Les populations les plus enrichies en LTC-IC expriment des phénotypes différents dans le placenta et le foie fœtal, deux organes d'amplification hématopoïétique

Selon les résultats de notre étude, les populations les plus enrichies en CSHs dans le PI et le FF possèderaient des phénotypes légèrement différents. En effet, en accord avec l'hypothèse soulevée par l'équipe de Dzierzak (Ottersbach et al., 2005), la population la plus enrichie en LTC-IC dans le PI E12.5 exprime le phénotype CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺, tandis que dans le FF au même stade, elle exprime le phénotype CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺AA4.1⁺, rejoignant les résultats des travaux de l'équipe de Matthews (Zeigler et al., 1994). L'expression du marqueur de surface AA4.1 ne semblant pas être liée au potentiel hématopoïétique de la population CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ dans le PI E12.5, il est donc probable que les CSHs contenues dans cette population acquièrent le marqueur AA4.1 après avoir quitté le PI.

Rejoignant l'hypothèse de Petrenko et al. (1999), il est possible que le marqueur AA4.1 joue le rôle de récepteur de « homing » permettant aux CSHs de se nicher dans le FF.

Cette acquisition tardive du marqueur AA4.1 suggère une différence entre les microenvironnements du PI et du FF, hypothèse soulevée pour la première fois par les travaux d'Alvarez-Silva (2003). Bien que ces deux organes possèdent des propriétés d'amplification hématopoïétique, le type de colonies hématopoïétiques observées *in vitro* en méthylcellulose à partir de cellules de PI est très différent de celui observé à partir de cellules de FF : alors que le PI contient un grand nombre de progéniteurs hématopoïétiques multipotents (HPP-CFCs), le FF est très enrichi en précurseurs hématopoïétiques unipotents. Deux ans plus tard, Gekas et al. émettent l'hypothèse selon laquelle les progéniteurs hématopoïétiques/CSHs du PI subissent une pré-amplification au sein de la niche placentaire avant de coloniser le FF (Gekas et al., 2005). Les auteurs ont montré que, bien que le microenvironnement placentaire soit capable de maintenir les propriétés d'autorenouvellement et de multipotence des CSHs, il ne peut pas supporter la différenciation myélo-érythroïde, contrairement au microenvironnement du FF. Ces données indiquent que les populations de progéniteurs hématopoïétiques/CSHs retrouvées dans le PI et le FF sont différentes du fait que les microenvironnements respectifs de ces deux organes ne possèdent pas les mêmes propriétés de soutien hématopoïétique. Il est possible que l'expression du marqueur AA4.1 par les CSHs du FF joue un rôle dans l'activation de la différenciation hématopoïétique de ces cellules. En effet, il existe probablement des signaux dans la niche du PI qui inhibent la différenciation myélo-érythroïde, et les précurseurs hématopoïétiques du PI ne se différencient qu'une fois au contact du microenvironnement de FF. Pour vérifier cette hypothèse et pour aller plus loin dans l'étude des différences des microenvironnements de PI et de FF, l'étude des transcriptomes des CSHs CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺ du PI et CD34⁺ckit^{hi}Sca-1⁺AA4.1⁺ du FF qui est en cours va permettre de mettre en évidence l'expression d'éventuels régulateurs de l'amplification hématopoïétique spécifiques soit du PI soit du FF. Par ailleurs, il sera également important d'étudier d'un point de vue moléculaire les microenvironnements de PI et de FF, ce qui permettra éventuellement de mettre en avant des facteurs régulateurs inhibiteurs (dans le cas du PI) ou activateurs (dans le cas du FF) de la différenciation myélo-érythroïde des CSHs. Ces transcriptomes pourront notamment être établis à partir des cellules endothéliales, des cellules trophoblastiques du labyrinthe pour le PI et des hépatoblastes pour le FF, puisque ces cellules jouent un rôle particulièrement important au niveau du microenvironnement de la niche de ces deux organes (voir Introduction Chapitre V).

4 - Synthèse : phénotypes et trajet possible des CSHs entre E10.5 et E14.5

De façon générale, la quantité totale de CSHs (embryon et annexes embryonnaires confondus) augmente progressivement entre E11.5 et E13.5, période au cours de laquelle leur nombre s'amplifie de 57 fois (*Figure 58A*). Lorsque les nombres de LTC-IC contenues dans les populations $CD34^+ckit^{hi}$, $CD144^+CD45^+$ et $Sca-1^+AA4.1^+$ sont comparés entre E11.5 et E14.5 (*Figure 58B*), une certaine évolution est observée : à E11.5, la population $CD144^+CD45^+$ est la plus enrichie en LTC-IC dans tous les sites/organes hématopoïétiques étudiés, et plus particulièrement dans le SV ; la population $CD34^+ckit^{hi}$ prend ensuite le relais avec 25,1 LTC-IC, contenues en grande majorité par le PI (21) ; enfin à E14.5, la population $Sca-1^+AA4.1^+$ est nettement plus enrichie en LTC-IC que les deux autres populations avec 153 LTC-IC, entièrement contenues par le FF. Nous noterons cependant qu'étant donné le degré d'imbrication des populations $CD34^+ckit^{hi}$, $CD144^+CD45^+$ et $Sca-1^+AA4.1^+$ (*Figure 40*), certains nombres indiqués dans la figure 58B doivent se recouper.

A la lumière de l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit, il est possible de proposer un schéma récapitulatif des phénotypes et du sens de migration des CSHs dans les annexes embryonnaires et l'embryon lui-même, entre E10.5 et E14.5 (*Figure 59*). Avant de rejoindre le FF, une ou plusieurs CSHs $CD34^+ckit^{hi}$ et $CD144^+CD45^+$ de l'AGM migrent dans le PI. Les CSHs $CD144^+CD45^+$ issues du cordon ombilical colonisent le FF et le PI et participent au maintien de l'activité hématopoïétique du PI jusqu'à E14.5. Le PI, dans lequel il n'est pas exclu que des CSHs $CD34^+ckit^{hi}$ puissent émerger, commence à perdre son activité hématopoïétique à partir d'E13.5 et relargue ses populations enrichies en CSHs dans la circulation sanguine pour qu'elles puissent continuer leur migration et coloniser le FF. Le SV et l'artère vitelline (Zovein et al., 2010) participent également à la colonisation du FF avec la population $CD144^+CD45^+$. A partir d'E12.5, l'expression du CD144 est perdue dans le FF et la population $CD34^+ckit^{hi}Sca-1^+AA4.1^+$ prend le relais et s'amplifie massivement. Il est probable que ce soit cette population qui colonise la MO par la suite, ce qui serait cohérent avec les données de la littérature montrant que les CSHs de la MO expriment le phénotype $Sca-1^+ckit^+$ (Okada et al., 1992).

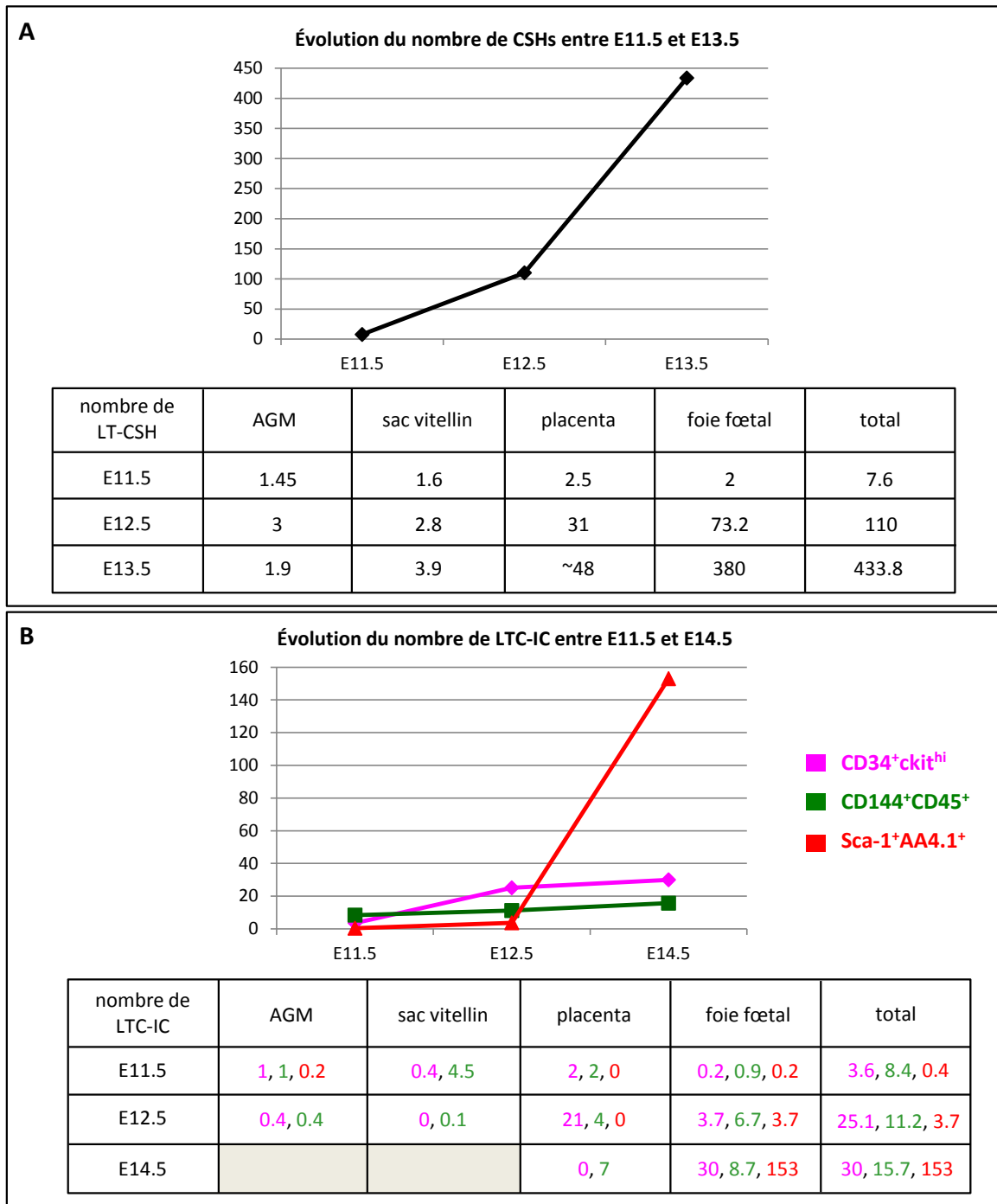


Figure 58 : Nombres de LTC-IC et de LT-CSHs entre E11.5 et E14.5

Comparaison des quantités de LT-CSHs déterminées après reconstitution hématopoïétique dans des souris létalement irradiées (résultats tirés des articles Kumaravelu et al., 2002, Taoudi et al., 2005 et Gekas et al., 2005) (A) avec les quantités de LTC-IC déterminées pour les populations $CD34^+ckit^{hi}$ (en rose), $CD144^+CD45^+$ (en vert) et $Sca-1^+AA4.1^+$ (en rouge) (B).

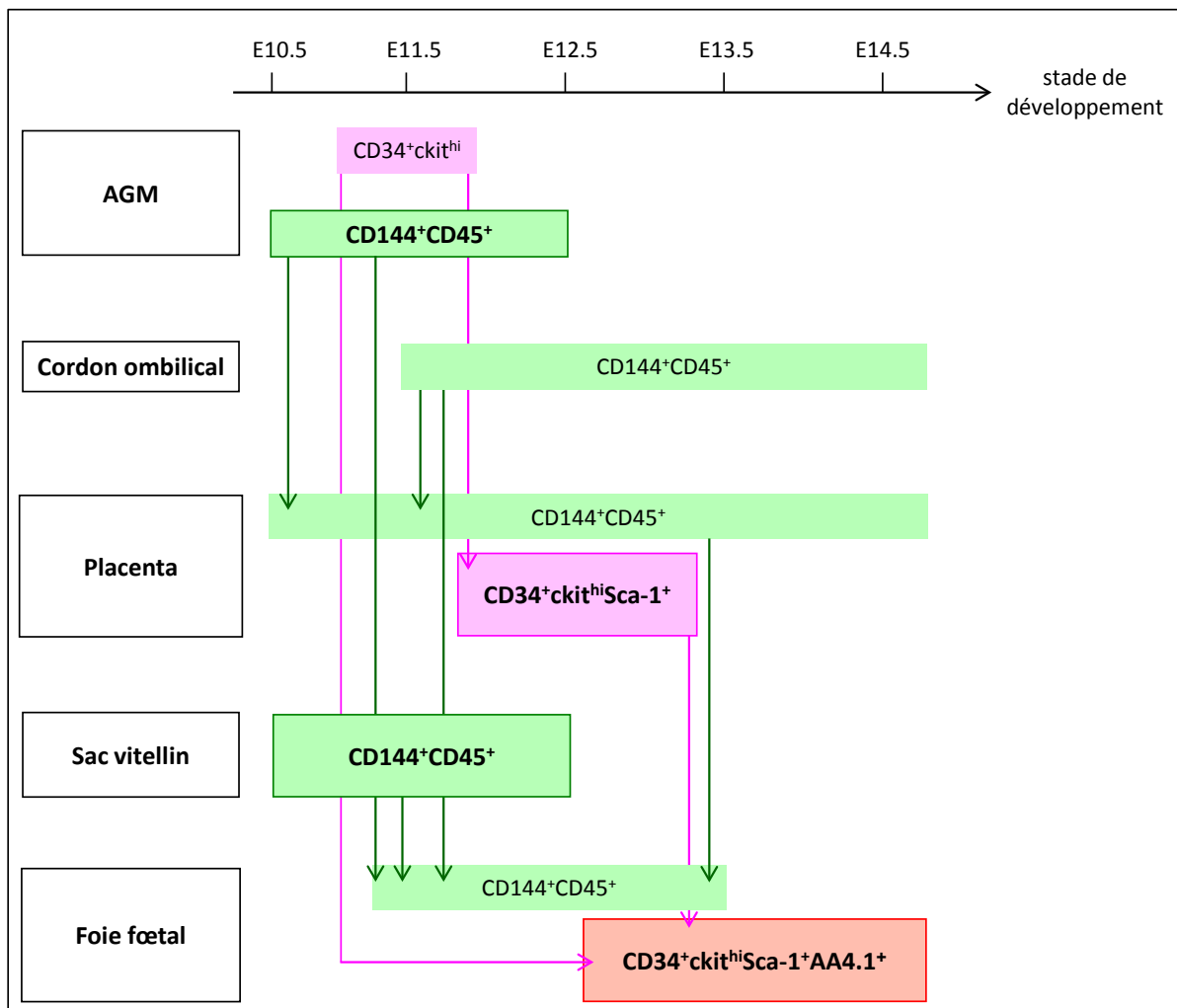


Figure 59 : Schéma proposé des phénotypes et sens de migration des CSHs entre E10.5 et E14.5

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Abkowitz, J. L., Catlin, S. N., McCallie, M. T. and Gutter, P.** (2002) 'Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals', *Blood* 100(7): 2665-7.
- Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P. L., McKinney-Freeman, S., Mack, P. J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dicey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M. W., Yoder, M. C. et al.** (2009) 'Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis', *Nature* 459(7250): 1131-5.
- Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I. and Busslinger, M.** (1992) 'Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis', *Genes Dev* 6(9): 1589-607.
- Adams, G. B., Chabner, K. T., Alley, I. R., Olson, D. P., Szczepiorkowski, Z. M., Poznansky, M. C., Kos, C. H., Pollak, M. R., Brown, E. M. and Scadden, D. T.** (2006) 'Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor', *Nature* 439(7076): 599-603.
- Adamson, S. L., Lu, Y., Whiteley, K. J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C. and Cross, J. C.** (2002) 'Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta', *Dev Biol* 250(2): 358-73.
- Adelman, D. M., Maltepe, E. and Simon, M. C.** (1999) 'Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity', *Genes Dev* 13(19): 2478-83.
- Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y. and Jacobsen, S. E.** (2001) 'Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity', *Immunity* 15(4): 659-69.
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N.** (2003) 'Signaling role of hemocytes in Drosophila JAK/STAT-dependent response to septic injury', *Dev Cell* 5(3): 441-50.
- 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(6774): 193-7.
- Albelda, S. M., Oliver, P. D., Romer, L. H. and Buck, C. A.** (1990) 'EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule', *J Cell Biol* 110(4): 1227-37.
- Alexander, W. S., Roberts, A. W., Nicola, N. A., Li, R. and Metcalf, D.** (1996) 'Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl', *Blood* 87(6): 2162-70.
- Alfonso, T. B. and Jones, B. W.** (2002) 'gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in Drosophila', *Dev Biol* 248(2): 369-83.
- Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P. and Iruela-Arispe, M. L.** (2006) 'VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells', *Dev Dyn* 235(3): 759-67.

- Alvarez-Silva, M., Belo-Diabangouaya, P., Salaun, J. and Dieterlen-Lievre, F.** (2003) 'Mouse placenta is a major hematopoietic organ', *Development* 130(22): 5437-44.
- Amatruda, J. F. and Zon, L. I.** (1999) 'Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish', *Dev Biol* 216(1): 1-15.
- Amsellem, S., Pflumio, F., Bardin, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P. H., Dubart-Kupferschmitt, A. and Fichelson, S.** (2003) 'Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein', *Nat Med* 9(11): 1423-7.
- Andrews, R. G., Singer, J. W. and Bernstein, I. D.** (1986) 'Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors', *Blood* 67(3): 842-5.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K.** (2001) 'HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation', *Exp Hematol* 29(9): 1125-34.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K.** (2002) 'HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo', *Cell* 109(1): 39-45.
- Aplan, P. D., Begley, C. G., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J. and Kirsch, I. R.** (1990) 'The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus', *Mol Cell Biol* 10(12): 6426-35.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K. and Nagasawa, T.** (2003) 'Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny', *Immunity* 19(2): 257-67.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y. and Suda, T.** (2004) 'Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche', *Cell* 118(2): 149-61.
- Arora, R. and Papaioannou, V. E.** (2012) 'The murine allantois: a model system for the study of blood vessel formation', *Blood*.
- Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A. et al.** (2000) 'Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development', *Dev Biol* 217(1): 42-53.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I. and Dearolf, C. R.** (2003) 'Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes', *Genetics* 163(1): 203-15.
- Askenasy, N., Stein, J., Yaniv, I. and Farkas, D. L.** (2003) 'The topologic and chronologic patterns of hematopoietic cell seeding in host femoral bone marrow after transplantation', *Biol Blood Marrow Transplant* 9(8): 496-504.
- Azcoitia, V., Aracil, M., Martinez, A. C. and Torres, M.** (2005) 'The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo', *Dev Biol* 280(2): 307-20.
- Bailey, A. S. and Fleming, W. H.** (2003) 'Converging roads: evidence for an adult hemangioblast', *Exp Hematol* 31(11): 987-93.

- Ballmaier, M., Germeshausen, M., Schulze, H., Cherkaoui, K., Lang, S., Gaudig, A., Krukemeier, S., Eilers, M., Strauss, G. and Welte, K.** (2001) 'c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia', *Blood* 97(1): 139-46.
- Barbara, N. P., Wrana, J. L. and Letarte, M.** (1999) 'Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily', *J Biol Chem* 274(2): 584-94.
- Barberis, A., Widenhorn, K., Vitelli, L. and Busslinger, M.** (1990) 'A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation', *Genes Dev* 4(5): 849-59.
- Barcena, A., Kapidzic, M., Muench, M. O., Gormley, M., Scott, M. A., Weier, J. F., Ferlatte, C. and Fisher, S. J.** (2009a) 'The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development', *Dev Biol* 327(1): 24-33.
- Barcena, A., Muench, M. O., Kapidzic, M. and Fisher, S. J.** (2009b) 'A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation', *Reprod Sci* 16(2): 178-87.
- Barker, J. E., Keenan, M. A. and Raphals, L.** (1969) 'Development of the mouse hematopoietic system. II. Estimation of spleen and liver "stem" cell number', *J Cell Physiol* 74(1): 51-6.
- Baron, M. H., Isern, J. and Fraser, S. T.** (2012) 'The embryonic origins of erythropoiesis in mammals', *Blood* 119(21): 4828-37.
- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A. and Lemaitre, B.** (2000) 'The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3376-81.
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M. and Peault, B.** (1992) 'Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population', *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 2804-8.
- 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(4): 1010-6.
- Baumheler, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S. D. and Lasky, L. A.** (1993) 'Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34', *Science* 262(5132): 436-8.
- Bechtold, T. E., Smith, P. B. and Turpen, J. B.** (1992) 'Differential stem cell contributions to thymocyte succession during development of *Xenopus laevis*', *J Immunol* 148(10): 2975-82.
- Beddington, R. S., Rashbass, P. and Wilson, V.** (1992) 'Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis', *Dev Suppl*: 157-65.
- Begley, C. G., Aplan, P. D., Davey, M. P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M. S., Haynes, B. F., Cohen, D. I., Waldmann, T. A. et al.** (1989a) 'Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6): 2031-5.
- Begley, C. G., Aplan, P. D., Denning, S. M., Haynes, B. F., Waldmann, T. A. and Kirsch, I. R.** (1989b) 'The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 10128-32.

- Bennett, C. M., Kanki, J. P., Rhodes, J., Liu, T. X., Paw, B. H., Kieran, M. W., Langenau, D. M., Delahaye-Brown, A., Zon, L. I., Fleming, M. D. et al.** (2001) 'Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*', *Blood* 98(3): 643-51.
- Benz, C., Copley, M. R., Kent, D. G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaeepour, N., Ma, E., Mader, H., Rowe, K., Day, C. et al.** (2012) 'Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs', *Cell Stem Cell* 10(3): 273-83.
- Berman, J. N., Kanki, J. P. and Look, A. T.** (2005) 'Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis', *Exp Hematol* 33(9): 997-1006.
- Bernardoni, R., Vivancos, V. and Giangrande, A.** (1997) 'glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage', *Dev Biol* 191(1): 118-30.
- Bertoncello, I., Hodgson, G. S. and Bradley, T. R.** (1988) 'Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells. II. Stem cells of long-term bone marrow-reconstituted recipients', *Exp Hematol* 16(4): 245-9.
- Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D. Y. and Traver, D.** (2010) 'Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development', *Nature*.
- Bertrand, J. Y., Desanti, G. E., Lo-Man, R., Leclerc, C., Cumano, A. and Golub, R.** (2006) 'Fetal spleen stroma drives macrophage commitment', *Development* 133(18): 3619-28.
- Bertrand, J. Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I. and Cumano, A.** (2005) 'Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1): 134-9.
- Bertrand, J. Y., Kim, A. D., Violette, E. P., Stachura, D. L., Cisson, J. L. and Traver, D.** (2007) 'Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo', *Development* 134(23): 4147-56.
- Bertwistle, D., Walmsley, M. E., Read, E. M., Pizzey, J. A. and Patient, R. K.** (1996) 'GATA factors and the origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*: responses to retinoic acid', *Mech Dev* 57(2): 199-214.
- Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. and Dushay, M. S.** (2005) 'Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae', *Dev Comp Immunol* 29(8): 669-79.
- Bjornsson, J. M., Larsson, N., Brun, A. C., Magnusson, M., Andersson, E., Lundstrom, P., Larsson, J., Repetowska, E., Ehinger, M., Humphries, R. K. et al.** (2003) 'Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in *Hoxb3* and *Hoxb4*', *Mol Cell Biol* 23(11): 3872-83.
- Boisset, J. C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E. and Robin, C.** (2010) 'In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium', *Nature*.
- Bollerot, K., Pouget, C. and Jaffredo, T.** (2005) 'The embryonic origins of hematopoietic stem cells: a tale of hemangioblast and hemogenic endothelium', *APMIS* 113(11-12): 790-803.
- Boncinelli, E., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Somma, R., Gaudino, G., Stornaiuolo, A., Cafiero, M., Faiella, A. and Simeone, A.** (1989) 'Organization of human class I homeobox genes', *Genome* 31(2): 745-56.

- Bourdeau, A., Dumont, D. J. and Letarte, M.** (1999) 'A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia', *J Clin Invest* 104(10): 1343-51.
- Bradley, T. R. and Hodgson, G. S.** (1979) 'Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow', *Blood* 54(6): 1446-50.
- Bradley, T. R. and Sumner, M. A.** (1968) 'Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium', *Aust J Exp Biol Med Sci* 46(5): 607-18.
- Braun, A., Lemaitre, B., Lanot, R., Zachary, D. and Meister, M.** (1997) 'Drosophila immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap', *Genetics* 147(2): 623-34.
- Brehelin, M.** (1982) 'Comparative study of structure and function of blood cells from two Drosophila species', *Cell Tissue Res* 221(3): 607-15.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W. and Dejana, E.** (1996) 'Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system', *Blood* 87(2): 630-41.
- Brotherton, T. W., Chui, D. H., Gauldie, J. and Patterson, M.** (1979) 'Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development', *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(6): 2853-7.
- Broudy, V. C.** (1997) 'Stem cell factor and hematopoiesis', *Blood* 90(4): 1345-64.
- Brown, J., Greaves, M. F. and Molgaard, H. V.** (1991) 'The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts', *Int Immunol* 3(2): 175-84.
- Brun, A. C., Bjornsson, J. M., Magnusson, M., Larsson, N., Leveen, P., Ehinger, M., Nilsson, E. and Karlsson, S.** (2004) 'Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells', *Blood* 103(11): 4126-33.
- Cai, Z., de Bruijn, M., Ma, X., Dortland, B., Luteijn, T., Downing, R. J. and Dzierzak, E.** (2000) 'Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo', *Immunity* 13(4): 423-31.
- 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(6960): 841-6.
- Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C. and Dieterlen-Lievre, F.** (1998) 'Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois', *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1641-6.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M. et al.** (1999) 'Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis', *Cell* 98(2): 147-57.
- Carver-Moore, K., Broxmeyer, H. E., Luoh, S. M., Cooper, S., Peng, J., Burstein, S. A., Moore, M. W. and de Sauvage, F. J.** (1996) 'Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice', *Blood* 88(3): 803-8.

- Challier, C., Cocault, L., Berthier, R., Binart, N., Dusanter-Fourt, I., Uzan, G. and Souyri, M.** (2002) 'The cytoplasmic domain of Mpl receptor transduces exclusive signals in embryonic and fetal hematopoietic cells', *Blood* 100(6): 2063-70.
- Charbord, P.** (1994) 'Hemopoietic stem cells: analysis of some parameters critical for engraftment', *Stem Cells* 12(6): 545-62.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L. and Peault, B.** (1996) 'Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment', *Blood* 87(10): 4109-19.
- Chasis, J. A.** (2006) 'Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis', *Curr Opin Hematol* 13(3): 137-41.
- Chen, A. T. and Zon, L. I.** (2009) 'Zebrafish blood stem cells', *J Cell Biochem* 108(1): 35-42.
- Chen, C. Z., Li, M., de Graaf, D., Monti, S., Gottgens, B., Sanchez, M. J., Lander, E. S., Golub, T. R., Green, A. R. and Lodish, H. F.** (2002) 'Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15468-73.
- Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E. and Speck, N. A.** (2009) 'Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter', *Nature* 457(7231): 887-91.
- Chen, X. D. and Turpen, J. B.** (1995) 'Intraembryonic origin of hepatic hematopoiesis in *Xenopus laevis*', *J Immunol* 154(6): 2557-67.
- Chen, Y., Haviernik, P., Bunting, K. D. and Yang, Y. C.** (2007) 'Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver', *Blood* 110(8): 2889-98.
- Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Hague, N., Moore, M. et al.** (1996) 'Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34', *Blood* 87(2): 479-90.
- Chhabra, A., Lechner, A. J., Ueno, M., Acharya, A., Van Handel, B., Wang, Y., Iruela-Arispe, M. L., Tallquist, M. D. and Mikkola, H. K.** (2012) 'Trophoblasts Regulate the Placental Hematopoietic Niche through PDGF-B Signaling', *Dev Cell* 22(3): 651-9.
- Cho, S. K., Bourdeau, A., Letarte, M. and Zuniga-Pflucker, J. C.** (2001) 'Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors', *Blood* 98(13): 3635-42.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C. and Keller, G.** (1998) 'A common precursor for hematopoietic and endothelial cells', *Development* 125(4): 725-32.
- Christensen, J. L., Wright, D. E., Wagers, A. J. and Weissman, I. L.** (2004) 'Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells', *PLoS Biol* 2(3): E75.
- Christianson, S. W., Greiner, D. L., Hesselton, R. A., Leif, J. H., Wagar, E. J., Schweitzer, I. B., Rajan, T. V., Gott, B., Roopenian, D. C. and Shultz, L. D.** (1997) 'Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice', *J Immunol* 158(8): 3578-86.
- Chung, Y. S., Zhang, W. J., Arentson, E., Kingsley, P. D., Palis, J. and Choi, K.** (2002) 'Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression', *Development* 129(23): 5511-20.

- Ciau-Uitz, A., Liu, F. and Patient, R.** (2010) 'Genetic control of hematopoietic development in *Xenopus* and zebrafish', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1139-49.
- Ciau-Uitz, A., Pinheiro, P., Gupta, R., Enver, T. and Patient, R.** (2010) 'Tel1/ETV6 specifies blood stem cells through the agency of VEGF signaling', *Dev Cell* 18(4): 569-78.
- Ciau-Uitz, A., Walmsley, M. and Patient, R.** (2000) 'Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*', *Cell* 102(6): 787-96.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. and Shaper, J. H.** (1984) 'Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells', *J Immunol* 133(1): 157-65.
- Cline, M. J. and Moore, M. A.** (1972) 'Embryonic origin of the mouse macrophage', *Blood* 39(6): 842-9.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. and Busslinger, M.** (2007) 'Pax5: the guardian of B cell identity and function', *Nat Immunol* 8(5): 463-70.
- Collins, L. S. and Dorshkind, K.** (1987) 'A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis', *J Immunol* 138(4): 1082-7.
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A. and Eaves, C.** (1997) 'Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18): 9836-41.
- Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C. et al.** (2002) 'Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth', *Nature* 417(6892): 945-8.
- Corbel, C. and Salaun, J.** (2002) 'Alpha11b integrin expression during development of the murine hemopoietic system', *Dev Biol* 243(2): 301-11.
- Corbel, C., Salaun, J., Belo-Diabangouaya, P. and Dieterlen-Lievre, F.** (2007) 'Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois', *Dev Biol* 301(2): 478-88.
- Corbel, C., Vaigot, P. and Salaun, J.** (2005) '(alpha)11b Integrin, a novel marker for hemopoietic progenitor cells', *Int J Dev Biol* 49(2-3): 279-84.
- Cormier, F. and Dieterlen-Lievre, F.** (1988) 'The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E', *Development* 102(2): 279-85.
- Costa, G., Kouskoff, V. and Lacaud, G.** (2012) 'Origin of blood cells and HSC production in the embryo', *Trends Immunol.*
- Coulombel, L., Huyhn, A. and Izac, B.** (1995) '[Characterization of hematopoietic progenitor cells during the human embryonic development]', *C R Seances Soc Biol Fil* 189(4): 611-5.
- Craig, R. W. and Bloch, A.** (1984) 'Early decline in c-myb oncogene expression in the differentiation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells induced with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate', *Cancer Res* 44(2): 442-6.

- Cray, C., Keane, R. W., Malek, T. R. and Levy, R. B.** (1990) 'Regulation and selective expression of Ly-6A/E, a lymphocyte activation molecule, in the central nervous system', *Brain Res Mol Brain Res* 8(1): 9-15.
- Crozatier, M. and Meister, M.** (2007) 'Drosophila haematopoiesis', *Cell Microbiol* 9(5): 1117-26.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M.** (2004) 'Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier', *PLoS Biol* 2(8): E196.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibensouda, S. and Vincent, A.** (1996) 'Collier, a novel regulator of Drosophila head development, is expressed in a single mitotic domain', *Curr Biol* 6(6): 707-18.
- Crozatier, M. and Vincent, A.** (2011) 'Drosophila: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias', *Dis Model Mech* 4(4): 439-45.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F. and Godin, I.** (1996) 'Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura', *Cell* 86(6): 907-16.
- Cumano, A., Furlonger, C. and Paige, C. J.** (1993) 'Differentiation and characterization of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10- to 12-somite stage', *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6429-33.
- Curtis, D. J., Hall, M. A., Van Stekelenburg, L. J., Robb, L., Jane, S. M. and Begley, C. G.** (2004) 'SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells', *Blood* 103(9): 3342-8.
- D'Souza, S. L., Elefanty, A. G. and Keller, G.** (2005) 'SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development', *Blood* 105(10): 3862-70.
- Dale, L. and Slack, J. M.** (1987) 'Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*', *Development* 100(2): 279-95.
- Dancis, J.** (1966) 'The placenta. A multicategorical, interdisciplinary phenomenon. (Borden Award address)', *Pediatrics* 38(2): 167-72.
- Dancis, J., Douglas, G. W. and Fierer, J.** (1966) 'Immunologic competence of mouse placental cells in irradiated hosts', *Am J Obstet Gynecol* 94(1): 50-6.
- Dancis, J., Jansen, V., Brown, G. F., Gorstein, F. and Balis, M. E.** (1977) 'Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants', *Blood* 50(4): 663-70.
- Dancis, J., Jansen, V., Gorstein, F. and Douglas, G. W.** (1968) 'Hematopoietic cells in mouse placenta', *Am J Obstet Gynecol* 100(8): 1110-21.
- Dancis, J., Samuels, B. D. and Douglas, G. W.** (1962) 'Immunological competence of placenta', *Science* 136: 382-3.
- Davidson, A. J., Ernst, P., Wang, Y., Dekens, M. P., Kingsley, P. D., Palis, J., Korsmeyer, S. J., Daley, G. Q. and Zon, L. I.** (2003) 'cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes', *Nature* 425(6955): 300-6.

- 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(5): 673-83.
- de Bruijn, M. F. and Speck, N. A.** (2004) 'Core-binding factors in hematopoiesis and immune function', *Oncogene* 23(24): 4238-48.
- 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(11): 2465-74.
- De Bruyn, P. P., Breen, P. C. and Thomas, T. B.** (1970) 'The microcirculation of the bone marrow', *Anat Rec* 168(1): 55-68.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. and Brey, P. T.** (2002) 'An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*', *Dev Cell* 3(4): 581-92.
- de Jong, J. L. and Zon, L. I.** (2005) 'Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis', *Annu Rev Genet* 39: 481-501.
- de Sauvage, F. J., Carver-Moore, K., Luoh, S. M., Ryan, A., Dowd, M., Eaton, D. L. and Moore, M. W.** (1996) 'Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin', *J Exp Med* 183(2): 651-6.
- de Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., Malloy, B. E., Gurney, A. L., Spencer, S. A., Darbonne, W. C., Henzel, W. J., Wong, S. C., Kuang, W. J. et al.** (1994) 'Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand', *Nature* 369(6481): 533-8.
- Dejana, E.** (2004) 'Endothelial cell-cell junctions: happy together', *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 261-70.
- Delassus, S. and Cumano, A.** (1996) 'Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo', *Immunity* 4(1): 97-106.
- Denning-Kendall, P., Singha, S., Bradley, B. and Hows, J.** (2003) 'Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells', *Stem Cells* 21(6): 694-701.
- Detrich, H. W., 3rd, Kieran, M. W., Chan, F. Y., Barone, L. M., Yee, K., Rundstadler, J. A., Pratt, S., Ransom, D. and Zon, L. I.** (1995) 'Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development', *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10713-7.
- Dexter, T. M., Allen, T. D. and Lajtha, L. G.** (1977) 'Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro', *J Cell Physiol* 91(3): 335-44.
- Dieterlen-Lievre, F.** (1975) 'On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach', *J Embryol Exp Morphol* 33(3): 607-19.
- Dieterlen-Lievre, F. and Martin, C.** (1981) 'Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development', *Dev Biol* 88(1): 180-91.
- Dimarcq, J. L., Imler, J. L., Lanot, R., Ezekowitz, R. A., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A. and Lagueux, M.** (1997) 'Treatment of I(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone

- ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression', *Insect Biochem Mol Biol* 27(10): 877-86.
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G. and Morrison, S. J.** (2012) 'Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells', *Nature* 481(7382): 457-62.
- Ditadi, A., de Coppi, P., Picone, O., Gautreau, L., Smati, R., Six, E., Bonhomme, D., Ezine, S., Frydman, R., Cavazzana-Calvo, M. et al.** (2009) 'Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity', *Blood* 113(17): 3953-60.
- Dommergues, M., Aubeny, E., Dumez, Y., Durandy, A. and Coulombel, L.** (1992) 'Hematopoiesis in the human yolk sac: quantitation of erythroid and granulopoietic progenitors between 3.5 and 8 weeks of development', *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1: 23-7.
- Down, J. D., Boudewijn, A., Dillingh, J. H., Fox, B. W. and Ploemacher, R. E.** (1994) 'Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs', *Br J Cancer* 70(4): 611-6.
- Down, J. D. and Ploemacher, R. E.** (1993) 'Transient and permanent engraftment potential of murine hematopoietic stem cell subsets: differential effects of host conditioning with gamma radiation and cytotoxic drugs', *Exp Hematol* 21(7): 913-21.
- Downs, K. M.** (2006) 'In vitro methods for studying vascularization of the murine allantois and allantoic union with the chorion', *Methods Mol Med* 121: 241-72.
- Downs, K. M. and Bertler, C.** (2000) 'Growth in the pre-fusion murine allantois', *Anat Embryol (Berl)* 202(4): 323-31.
- Downs, K. M. and Gardner, R. L.** (1995) 'An investigation into early placental ontogeny: allantoic attachment to the chorion is selective and developmentally regulated', *Development* 121(2): 407-16.
- Downs, K. M., Gifford, S., Blahnik, M. and Gardner, R. L.** (1998) 'Vascularization in the murine allantois occurs by vasculogenesis without accompanying erythropoiesis', *Development* 125(22): 4507-20.
- Downs, K. M. and Harmann, C.** (1997) 'Developmental potency of the murine allantois', *Development* 124(14): 2769-80.
- Downs, K. M., Temkin, R., Gifford, S. and McHugh, J.** (2001) 'Study of the murine allantois by allantoic explants', *Dev Biol* 233(2): 347-64.
- Drake, C. J. and Fleming, P. A.** (2000) 'Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo', *Blood* 95(5): 1671-9.
- Driever, W. and Fishman, M. C.** (1996) 'The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos', *J Clin Invest* 97(8): 1788-94.
- Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J. and Breitman, M. L.** (1992) 'tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors', *Oncogene* 7(8): 1471-80.

- Durand, C., Robin, C., Bollerot, K., Baron, M. H., Ottersbach, K. and Dzierzak, E.** (2007) 'Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52): 20838-43.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. and Royet, J.** (2002) 'Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis', *Curr Biol* 12(22): 1923-7.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R. and Baron, M. H.** (2001) 'Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo', *Development* 128(10): 1717-30.
- Ehninger, A. and Trumpp, A.** (2011) 'The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in', *J Exp Med* 208(3): 421-8.
- Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Breant, C. and Le Douarin, N. M.** (1997) 'Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5141-6.
- Eichmann, A., Marcelle, C., Breant, C. and Le Douarin, N. M.** (1993) 'Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development', *Mech Dev* 42(1-2): 33-48.
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. and Schroeder, T.** (2009) 'Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium', *Nature* 457(7231): 896-900.
- Elefanty, A. G., Begley, C. G., Hartley, L., Papaevangeliou, 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(11): 3754-63.
- Ellington, S. K.** (1985) 'A morphological study of the development of the allantois of rat embryos in vivo', *J Anat* 142: 1-11.
- Ema, H., Douagi, I., Cumano, A. and Kourilsky, P.** (1998) 'Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver', *Eur J Immunol* 28(5): 1563-9.
- Ema, H. and Nakauchi, H.** (2000) 'Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo', *Blood* 95(7): 2284-8.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W. J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W. L., Orkin, S., Choi, K. and Rossant, J.** (2003) 'Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse', *Genes Dev* 17(3): 380-93.
- Ema, M., Yokomizo, T., Wakamatsu, A., Terunuma, T., Yamamoto, M. and Takahashi, S.** (2006) 'Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo', *Blood* 108(13): 4018-24.
- Emambokus, N. R. and Frampton, J.** (2003) 'The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis', *Immunity* 19(1): 33-45.

- Emmel, V.E.** (1916) 'The cell clusters in the dorsal aorta of mammalian embryos', *Am. J. Anat.* 19: 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(24): 6700-8.
- Evans, T. and Felsenfeld, G.** (1989) 'The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein', *Cell* 58(5): 877-85.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S. and Choi, K.** (2000) 'Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development', *Development* 127(9): 1931-41.
- Fantoni, A., De la Chapelle, A. and Marks, P. A.** (1969) 'Synthesis of embryonic hemoglobins during erythroid cell development in fetal mice', *J Biol Chem* 244(4): 675-81.
- Fazekas de St, Groth** (1982) 'The evaluation of limiting dilution assays', *J Immunol Methods* 49(2): R11-23.
- 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(17): 4217-27.
- Ferjoux, G., Auge, B., Boyer, K., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2007) 'A GATA/RUNX cis-regulatory module couples Drosophila blood cell commitment and differentiation into crystal cells', *Dev Biol* 305(2): 726-34.
- 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(18): 4393-403.
- Fessler, J. H. and Fessler, L. I.** (1989) 'Drosophila extracellular matrix', *Annu Rev Cell Biol* 5: 309-39.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A. and Greaves, M. F.** (1990) 'Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells', *Blood* 75(12): 2417-26.
- Fleury, M., Petit-Cocault, L., Clay, D. and Souyri, M.** (2010) 'Mpl receptor defect leads to earlier appearance of hematopoietic cells/hematopoietic stem cells in the Aorta-Gonad-Mesonephros region, with increased apoptosis', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1067-74.
- Fogerty, F. J., Fessler, L. I., Bunch, T. A., Yaron, Y., Parker, C. G., Nelson, R. E., Brower, D. L., Gullberg, D. and Fessler, J. H.** (1994) 'Tiggrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins', *Development* 120(7): 1747-58.
- Fontaine-Perus, J. C., Calman, F. M., Kaplan, C. and Le Douarin, N. M.** (1981) 'Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro', *J Immunol* 126(6): 2310-6.
- 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(13): 7342-7.

- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. and Ezekowitz, R. A.** (1996) 'Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells', *Immunity* 4(5): 431-43.
- Fraser, S. T., Ogawa, M., Yokomizo, T., Ito, Y. and Nishikawa, S.** (2003) 'Putative intermediate precursor between hematogenic endothelial cells and blood cells in the developing embryo', *Dev Growth Differ* 45(1): 63-75.
- Fraser, S. T., Ogawa, M., Yu, R. T., Nishikawa, S. and Yoder, M. C.** (2002) 'Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin(+) population', *Exp Hematol* 30(9): 1070-8.
- 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(22): 12355-8.
- Galloway, J. L., Wingert, R. A., Thisse, C., Thisse, B. and Zon, L. I.** (2005) 'Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos', *Dev Cell* 8(1): 109-16.
- 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: 139-58.
- 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(5): 425-35.
- 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(3): 303-19.
- 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(3): 365-75.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W. and Fisher, S. J.** (1997) 'Regulation of human placental development by oxygen tension', *Science* 277(5332): 1669-72.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. and Sharpe, A.** (1994) 'The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages', *Cell* 79(1): 143-56.
- Georgopoulos, K., Moore, D. D. and Derfler, B.** (1992) 'Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment', *Science* 258(5083): 808-12.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R. et al.** (2010) 'Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages', *Science* 330(6005): 841-5.
- 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 U S A* 92(3): 773-7.
- Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F. and Marcos, M. A.** (1993) 'Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors', *Nature* 364(6432): 67-70.

- 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(1): 43-52.
- Gordon-Thomson, C. and Fabian, B. C.** (1994) 'Hypoblastic tissue and fibroblast growth factor induce blood tissue (haemoglobin) in the early chick embryo', *Development* 120(12): 3571-9.
- Gordon, M. Y., Lewis, J. L. and Marley, S. B.** (2002) 'Of mice and men...and elephants', *Blood* 100(13): 4679-80.
- Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M. and Huber, P.** (1999) 'Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis', *Development* 126(10): 2093-102.
- Gougos, A. and Letarte, M.** (1988) 'Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line', *J Immunol* 141(6): 1925-33.
- Goustin, A. S., Betsholtz, C., Pfeifer-Ohlsson, S., Persson, H., Rydnert, J., Bywater, M., Holmgren, G., Heldin, C. H., Westermark, B. and Ohlsson, R.** (1985) 'Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth', *Cell* 41(1): 301-12.
- Goyert, S. M., Ferrero, E. M., Seremetis, S. V., Winchester, R. J., Silver, J. and Mattison, A. C.** (1986) 'Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens', *J Immunol* 137(12): 3909-14.
- Green, A. R. and Begley, C. G.** (1992) 'SCL and related hemopoietic helix-loop-helix transcription factors', *Int J Cell Cloning* 10(5): 269-76.
- Gunji, Y., Sudo, T., Suda, J., Yamaguchi, Y., Nakauchi, H., Nishikawa, S., Yanai, N., Obinata, M., Yanagisawa, M., Miura, Y. et al.** (1991) 'Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7', *Blood* 77(12): 2612-7.
- Gunsilius, E.** (2003) 'Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells', *Adv Exp Med Biol* 522: 17-24.
- Gurney, A. L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F. J. and Moore, M. W.** (1994) 'Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice', *Science* 265(5177): 1445-7.
- Gurtner, G. C., Davis, V., Li, H., McCoy, M. J., Sharpe, A. and Cybulsky, M. I.** (1995) 'Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation', *Genes Dev* 9(1): 1-14.
- Haar, J. L. and Ackerman, G. A.** (1971) 'A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse', *Anat Rec* 170(2): 199-223.
- Hackney, J. A., Charbord, P., Brunk, B. P., Stoeckert, C. J., Lemischka, I. R. and Moore, K. A.** (2002) 'A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 13061-6.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P. et al.** (1996) 'The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*', *Development* 123: 1-36.

- Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C. W. and Grosschedl, R.** (1993) 'Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression', *Genes Dev* 7(5): 760-73.
- Hann, I. M., Bodger, M. P. and Hoffbrand, A. V.** (1983) 'Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus', *Blood* 62(1): 118-23.
- Hao, Q. L., Shah, A. J., Thiemann, F. T., Smogorzewska, E. M. and Crooks, G. M.** (1995) 'A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow', *Blood* 86(10): 3745-53.
- Hao, Q. L., Thiemann, F. T., Petersen, D., Smogorzewska, E. M. and Crooks, G. M.** (1996) 'Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population', *Blood* 88(9): 3306-13.
- Hao, Q. L., Zhu, J., Price, M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W. and Crooks, G. M.** (2001) 'Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood', *Blood* 97(12): 3683-90.
- Harrison, D. E.** (1980) 'Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity', *Blood* 55(1): 77-81.
- Harrison, D. E., Jordan, C. T., Zhong, R. K. and Astle, C. M.** (1993) 'Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations', *Exp Hematol* 21(2): 206-19.
- Harrison, D. E. and Zhong, R. K.** (1992) 'The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation', *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10134-8.
- Harrison, D. E., Zhong, R. K., Jordan, C. T., Lemischka, I. R. and Astle, C. M.** (1997) 'Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term', *Exp Hematol* 25(4): 293-7.
- Hartenstein, V.** (2006) 'Blood cells and blood cell development in the animal kingdom', *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 677-712.
- Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L. et al.** (2002) 'Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment', *Nat Med* 8(8): 841-9.
- Haynes, B. F., Martin, M. E., Kay, H. H. and Kurtzberg, J.** (1988) 'Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues', *J Exp Med* 168(3): 1061-80.
- He, W. Y., Lan, Y., Yao, H. Y., Li, Z., Wang, X. Y., Li, X. S., Zhang, J. Y., Zhang, Y., Liu, B. and Mao, N.** (2010) 'Interleukin-3 promotes hemangioblast development in mouse aorta-gonad-mesonephros region', *Haematologica* 95(6): 875-83.
- Herbomel, P., Thisse, B. and Thisse, C.** (1999) 'Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo', *Development* 126(17): 3735-45.

- Hirai, H., Samokhvalov, I. M., Fujimoto, T., Nishikawa, S. and Imanishi, J.** (2005) 'Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells', *Blood* 106(6): 1948-55.
- Hirashima, M., Bernstein, A., Stanford, W. L. and Rossant, J.** (2004) 'Gene-trap expression screening to identify endothelial-specific genes', *Blood* 104(3): 711-8.
- Hisa, T., Spence, S. E., Rachel, R. A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J. M., Devor-Henneman, D. E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L. et al.** (2004) 'Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals', *EMBO J* 23(2): 450-9.
- Hisatsune, H., Matsumura, K., Ogawa, M., Uemura, A., Kondo, N., Yamashita, J. K., Katsuta, H., Nishikawa, S. and Chiba, T.** (2005) 'High level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of the 5' flanking region and the 5' half of the first intron of the VE-cadherin gene', *Blood* 105(12): 4657-63.
- Hodgson, G. S. and Bradley, T. R.** (1979) 'Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell?', *Nature* 281(5730): 381-2.
- Hollands, P.** (1987) 'Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early postimplantation mouse embryos', *Development* 99(1): 69-76.
- Hollands, P.** (1988) 'Embryonic haemopoietic stem cell grafts in the treatment of murine genetic anaemia', *Br J Haematol* 70(2): 157-63.
- Holmgren, L., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H. and Ohlsson, R.** (1992) 'The expression of PDGF alpha- and beta-receptors in subpopulations of PDGF-producing cells implicates autocrine stimulatory loops in the control of proliferation in cytotrophoblasts that have invaded the maternal endometrium', *Growth Factors* 6(3): 219-31.
- Holmgren, L., Glaser, A., Pfeifer-Ohlsson, S. and Ohlsson, R.** (1991) 'Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression', *Development* 113(3): 749-54.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R.** (2003) 'The two origins of hemocytes in Drosophila', *Development* 130(20): 4955-62.
- Houssaint, E.** (1981) 'Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line', *Cell Differ* 10(5): 243-52.
- Howie, D., Okamoto, S., Rietdijk, S., Clarke, K., Wang, N., Gullo, C., Bruggeman, J. P., Manning, S., Coyle, A. J., Greenfield, E. et al.** (2002) 'The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production', *Blood* 100(8): 2899-907.
- Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P. and Besmer, P.** (1990) 'The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus', *Cell* 63(1): 225-33.
- Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H. J., Yokomizo, T. and Ito, Y.** (2001) 'Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation', *EMBO J* 20(4): 723-33.

- Huang, H. and Auerbach, R.** (1993) 'Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 10110-4.
- Huang, H., Zettergren, L. D. and Auerbach, R.** (1994) 'In vitro differentiation of B cells and myeloid cells from the early mouse embryo and its extraembryonic yolk sac', *Exp Hematol* 22(1): 19-25.
- Huang, S. and Terstappen, L. W.** (1994) 'Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells', *Blood* 83(6): 1515-26.
- 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(7017): 625-30.
- Huyhn, A., Dommergues, M., Izac, B., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W. and Coulombel, L.** (1995) 'Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos', *Blood* 86(12): 4474-85.
- Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M. et al.** (2004) 'AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis', *Nat Med* 10(3): 299-304.
- Imai, K., Kobayashi, M., Wang, J., Shinobu, N., Yoshida, H., Hamada, J., Shindo, M., Higashino, F., Tanaka, J., Asaka, M. et al.** (1999) 'Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow', *Br J Haematol* 106(4): 905-11.
- Inman, K. E. and Downs, K. M.** (2006) 'Brachyury is required for elongation and vasculogenesis in the murine allantois', *Development* 133(15): 2947-59.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C. and Meister, M.** (2005) 'New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis', *Cell Microbiol* 7(3): 335-50.
- Isern, J., He, Z., Fraser, S. T., Nowotschin, S., Ferrer-Vaquer, A., Moore, R., Hadjantonakis, A. K., Schulz, V., Tuck, D., Gallagher, P. G. et al.** (2011) 'Single-lineage transcriptome analysis reveals key regulatory pathways in primitive erythroid progenitors in the mouse embryo', *Blood* 117(18): 4924-34.
- Ismailoglu, I., Yeamans, G., Daley, G. Q., Perlingeiro, R. C. and Kyba, M.** (2008) 'Mesodermal patterning activity of SCL', *Exp Hematol* 36(12): 1593-603.
- Issaad, C., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W. and Coulombel, L.** (1993) 'A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays', *Blood* 81(11): 2916-24.
- Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J. D. and Yamamoto, M.** (1993) 'Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis', *Nature* 362(6419): 466-8.
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K. et al.** (2002) 'NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells', *Blood* 100(9): 3175-82.

- Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H. and Mori, K. J.** (1989) 'Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow', *Exp Hematol* 17(2): 145-53.
- Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R. A., Turner, M. L. and Medvinsky, A.** (2011) 'Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region', *J Exp Med*.
- Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K. and Eldredge, J. H.** (1951) 'Recovery from radiation injury', *Science* 113(2940): 510-11.
- Jaffredo, T., Bollerot, K., Sugiyama, D., Gautier, R. and Drevon, C.** (2005) 'Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells', *Int J Dev Biol* 49(2-3): 269-77.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. and Dieterlen-Lievre, F.** (1998) 'Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny', *Development* 125(22): 4575-83.
- Ji, R. P., Phoon, C. K., Aristizabal, O., McGrath, K. E., Palis, J. and Turnbull, D. H.** (2003) 'Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper', *Circ Res* 92(2): 133-5.
- Jin, H., Xu, J. and Wen, Z.** (2007) 'Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development', *Blood* 109(12): 5208-14.
- Johnson, G. R. and Metcalf, D.** (1977) 'Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin', *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9): 3879-82.
- Johnson, G. R. and Moore, M. A.** (1975) 'Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis', *Nature* 258(5537): 726-8.
- Jones, R. J., Celano, P., Sharkis, S. J. and Sensenbrenner, L. L.** (1989) 'Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice', *Blood* 73(2): 397-401.
- Jones, R. J., Wagner, J. E., Celano, P., Zicha, M. S. and Sharkis, S. J.** (1990) 'Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells', *Nature* 347(6289): 188-9.
- Jordan, C. T., Astle, C. M., Zawadzki, J., Mackaretschian, K., Lemischka, I. R. and Harrison, D. E.** (1995) 'Long-term repopulating abilities of enriched fetal liver stem cells measured by competitive repopulation', *Exp Hematol* 23(9): 1011-5.
- Jordan, C. T., McKearn, J. P. and Lemischka, I. R.** (1990) 'Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells', *Cell* 61(6): 953-63.
- Jordan, H. E.** (1917) 'Aortic Cell Clusters in Vertebrate Embryos', *Proc Natl Acad Sci U S A* 3(3): 149-56.
- Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U.** (2005) 'The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis', *Development* 132(11): 2521-33.

- Kallianpur, A. R., Jordan, J. E. and Brandt, S. J.** (1994) 'The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis', *Blood* 83(5): 1200-8.
- Kaminski, W. E., Lindahl, P., Lin, N. L., Broudy, V. C., Crosby, J. R., Hellstrom, M., Swolin, B., Bowen-Pope, D. F., Martin, P. J., Ross, R. et al.** (2001) 'Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF beta-receptor null mice', *Blood* 97(7): 1990-8.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T. et al.** (1999) 'Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer', *EMBO J* 18(8): 2127-36.
- Kataoka, S., Satoh, J., Fujiya, H., Toyota, T., Suzuki, R., Itoh, K. and Kumagai, K.** (1983) 'Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity', *Diabetes* 32(3): 247-53.
- Katz, F. E., Tindle, R., Sutherland, D. R. and Greaves, M. F.** (1985) 'Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells', *Leuk Res* 9(2): 191-8.
- Kau, C. L. and Turpen, J. B.** (1983) 'Dual contribution of embryonic ventral blood island and dorsal lateral plate mesoderm during ontogeny of hemopoietic cells in *Xenopus laevis*', *J Immunol* 131(5): 2262-6.
- Kaushansky, K.** (1995) 'Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production', *Thromb Haemost* 74(1): 521-5.
- Kawabata, K., Ujikawa, M., Egawa, T., Kawamoto, H., Tachibana, K., Iizasa, H., Katsura, Y., Kishimoto, T. and Nagasawa, T.** (1999) 'A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5663-7.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. and Wiles, M. V.** (1993) 'Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture', *Mol Cell Biol* 13(1): 473-86.
- Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S. and Keller, G.** (2007) 'Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures', *Blood* 109(7): 2679-87.
- 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(6624): 488-93.
- Kent, D., Copley, M., Benz, C., Dykstra, B., Bowie, M. and Eaves, C.** (2008) 'Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway', *Clin Cancer Res* 14(7): 1926-30.
- Kiel, M. J. and Morrison, S. J.** (2008) 'Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells', *Nat Rev Immunol* 8(4): 290-301.
- Kiel, M. J., Radice, G. L. and Morrison, S. J.** (2007) 'Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance', *Cell Stem Cell* 1(2): 204-17.

- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Terhorst, C. and Morrison, S. J.** (2005) 'SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells', *Cell* 121(7): 1109-21.
- Kim, H. G., de Guzman, C. G., Swindle, C. S., Cotta, C. V., Gartland, L., Scott, E. W. and Klug, C. A.** (2004) 'The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells', *Blood* 104(13): 3894-900.
- Kim, I., He, S., Yilmaz, O. H., Kiel, M. J. and Morrison, S. J.** (2006) 'Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors', *Blood* 108(2): 737-44.
- Kim, I., Yilmaz, O. H. and Morrison, S. J.** (2005) 'CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells', *Blood* 106(3): 903-5.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Dev Dyn* 203(3): 253-310.
- Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D. and Alexander, W. S.** (1998) 'Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin', *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1195-200.
- Kimura, Y., Ding, B., Imai, N., Nolan, D. J., Butler, J. M. and Rafii, S.** (2011) 'c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis', *PLoS One* 6(10): e26918.
- 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(21): 4691-701.
- Kingsley, P. D., Malik, J., Fantauzzo, K. A. and Palis, J.** (2004) 'Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis', *Blood* 104(1): 19-25.
- Kisanuki, Y. Y., Hammer, R. E., Miyazaki, J., Williams, S. C., Richardson, J. A. and Yanagisawa, M.** (2001) 'Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo', *Dev Biol* 230(2): 230-42.
- Kishihara, K., Penninger, J., Wallace, V. A., Kundig, T. M., Kawai, K., Wakeham, A., Timms, E., Pfeffer, K., Ohashi, P. S., Thomas, M. L. et al.** (1993) 'Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice', *Cell* 74(1): 143-56.
- Kissa, K. and Herbomel, P.** (2010) 'Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition', *Nature* 464(7285): 112-5.
- Kissa, K., Murayama, E., Zapata, A., Cortes, A., Perret, E., Machu, C. and Herbomel, P.** (2008) 'Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization', *Blood* 111(3): 1147-56.
- Klempnauer, K. H., Gonda, T. J. and Bishop, J. M.** (1982) 'Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene', *Cell* 31(2 Pt 1): 453-63.

- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C. and Maki, R. A.** (1990) 'The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene', *Cell* 61(1): 113-24.
- Knipp, G. T., Audus, K. L. and Soares, M. J.** (1999) 'Nutrient transport across the placenta', *Adv Drug Deliv Rev* 38(1): 41-58.
- 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(16): 7005-20.
- Kobayashi, M., Laver, J. H., Kato, T., Miyazaki, H. and Ogawa, M.** (1996) 'Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3', *Blood* 88(2): 429-36.
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M. et al.** (2005) 'Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila', *Cell* 123(2): 335-46.
- Kogata, N., Arai, Y., Pearson, J. T., Hashimoto, K., Hidaka, K., Koyama, T., Somekawa, S., Nakaoka, Y., Ogawa, M., Adams, R. H. et al.** (2006) 'Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization', *Circ Res* 98(7): 897-904.
- Koller, M. R., Manchel, I. and Smith, A. K.** (1998) 'Quantitative long-term culture-initiating cell assays require accessory cell depletion that can be achieved by CD34-enrichment or 5-fluorouracil exposure', *Blood* 91(11): 4056-64.
- Kollet, O., Dar, A., Shvitiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R. M., Goichberg, P., Spiegel, A. et al.** (2006) 'Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells', *Nat Med* 12(6): 657-64.
- Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K.** (1997) 'Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow', *Cell* 91(5): 661-72.
- 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: 349-56.
- Kramerova, I. A., Kramerov, A. A. and Fessler, J. H.** (2003) 'Alternative splicing of papilin and the diversity of Drosophila extracellular matrix during embryonic morphogenesis', *Dev Dyn* 226(4): 634-42.
- Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J. and May, W. S.** (1994) 'Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells', *Blood* 84(3): 691-701.
- Krzemien, J., Crozatier, M. and Vincent, A.** (2010) 'Ontogeny of the Drosophila larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1117-25.
- 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(5): 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(21): 4891-9.
- Kurata, H., Mancini, G. C., Alespeiti, G., Migliaccio, A. R. and Migliaccio, G.** (1998) 'Stem cell factor induces proliferation and differentiation of fetal progenitor cells in the mouse', *Br J Haematol* 101(4): 676-87.
- Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A. and Labow, M. A.** (1995) 'Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice', *Development* 121(2): 489-503.
- 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(1): 29-37.
- 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(10): 3624-35.
- Labbaye, C., Valtieri, M., Barberi, T., Meccia, E., Masella, B., Pelosi, E., Condorelli, G. L., Testa, U. and Peschle, C.** (1995) 'Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis', *J Clin Invest* 95(5): 2346-58.
- Lacaud, G., Gore, L., Kennedy, M., Kouskoff, V., Kingsley, P., Hogan, C., Carlsson, L., Speck, N., Palis, J. and Keller, G.** (2002) 'Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro', *Blood* 100(2): 458-66.
- Lacaud, G., Robertson, S., Palis, J., Kennedy, M. and Keller, G.** (2001) 'Regulation of hemangioblast development', *Ann N Y Acad Sci* 938: 96-107; discussion 108.
- Lam, E. Y., Hall, C. J., Crosier, P. S., Crosier, K. E. and Flores, M. V.** (2010) 'Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells', *Blood* 116(6): 909-14.
- Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V. and Lacaud, G.** (2009) 'The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage', *Nature* 457(7231): 892-5.
- Lane, M. C. and Smith, W. C.** (1999) 'The origins of primitive blood in Xenopus: implications for axial patterning', *Development* 126(3): 423-34.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M.** (2001) 'Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*', *Dev Biol* 230(2): 243-57.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I. et al.** (1996) 'Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy', *Nat Med* 2(12): 1329-37.
- Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Martin, C. and Dieterlen-Lievre, F.** (1978) 'The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimaeras', *Nature* 272(5651): 353-4.

- Lassila, O., Martin, C., Toivanen, P. and Dieterlen-Lievre, F.** (1982) 'Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells', *Blood* 59(2): 377-81.
- Laurenti, E., Varnum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P. F., MacDonald, H. R., Eisenman, R. N. et al.** (2008) 'Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity', *Cell Stem Cell* 3(6): 611-24.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2000) 'Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors', *Science* 288(5463): 146-9.
- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U.** (2003) 'A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis', *Genes Dev* 17(3): 348-53.
- Lemieux, M. E. and Eaves, C. J.** (1996) 'Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients', *Blood* 88(5): 1639-48.
- Lemieux, M. E., Rebel, V. I., Lansdorp, P. M. and Eaves, C. J.** (1995) 'Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures', *Blood* 86(4): 1339-47.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. and Betsholtz, C.** (1994) 'Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities', *Genes Dev* 8(16): 1875-87.
- Levin, J., Cocault, L., Demerens, C., Challier, C., Pauchard, M., Caen, J. and Souyri, M.** (2001) 'Thrombocytopenic c-mpl(-/-) mice can produce a normal level of platelets after administration of 5-fluorouracil: the effect of age on the response', *Blood* 98(4): 1019-27.
- Levine, M. and Hoey, T.** (1988) 'Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors', *Cell* 55(4): 537-40.
- Li, W., Ferkowicz, M. J., Johnson, S. A., Shelley, W. C. and Yoder, M. C.** (2005) 'Endothelial cells in the early murine yolk sac give rise to CD41-expressing hematopoietic cells', *Stem Cells Dev* 14(1): 44-54.
- Li, Z., Chen, M. J., Stacy, T. and Speck, N. A.** (2006) 'Runx1 function in hematopoiesis is required in cells that express Tek', *Blood* 107(1): 106-10.
- Liakhovitskaia, A., Gribi, R., Stamateris, E., Villain, G., Jaffredo, T., Wilkie, R., Gilchrist, D., Yang, J., Ure, J. and Medvinsky, A.** (2009) 'Restoration of Runx1 expression in the Tie2 cell compartment rescues definitive hematopoietic stem cells and extends life of Runx1 knockout animals until birth', *Stem Cells* 27(7): 1616-24.
- Lieschke, G. J., Oates, A. C., Paw, B. H., Thompson, M. A., Hall, N. E., Ward, A. C., Ho, R. K., Zon, L. I. and Layton, J. E.** (2002) 'Zebrafish SPI-1 (PU.1) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: implications for axial patterning', *Dev Biol* 246(2): 274-95.

- 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(7): 871-82.
- Linzer, D. I. and Fisher, S. J.** (1999) 'The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy', *Mol Endocrinol* 13(6): 837-40.
- Liu, C. P. and Auerbach, R.** (1991) 'In vitro development of murine T cells from prethymic and preliver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells', *Development* 113(4): 1315-23.
- Liu, P., Tarle, S. A., Hajra, A., Claxton, D. F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M. J. and Collins, F. S.** (1993) 'Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia', *Science* 261(5124): 1041-4.
- Lord, B. I., Testa, N. G. and Hendry, J. H.** (1975) 'The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur', *Blood* 46(1): 65-72.
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. and Shelton, E.** (1951) 'Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections', *J Natl Cancer Inst* 12(1): 197-201.
- Luckett, W. P.** (1978) 'Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos', *Am J Anat* 152(1): 59-97.
- Lugus, J. J., Park, C., Ma, Y. D. and Choi, K.** (2009) 'Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm', *Blood* 113(3): 563-6.
- Luo, H., Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1995) 'An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects', *EMBO J* 14(7): 1412-20.
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., D'Andrea, A. D. and Dearolf, C. R.** (1997) 'Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways', *Mol Cell Biol* 17(3): 1562-71.
- Lux, C. T., Yoshimoto, M., McGrath, K., Conway, S. J., Palis, J. and Yoder, M. C.** (2008) 'All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac', *Blood* 111(7): 3435-8.
- Ma, G. T., Roth, M. E., Groskopf, J. C., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Grosveld, F., Engel, J. D. and Linzer, D. I.** (1997) 'GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo', *Development* 124(4): 907-14.
- Ma, Q., Jones, D. and Springer, T. A.** (1999) 'The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment', *Immunity* 10(4): 463-71.
- 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(6): 514-21.
- Maeno, M., Tochikai, S. and Katagiri, C.** (1985) 'Differential participation of ventral and dorsolateral mesoderms in the hemopoiesis of *Xenopus*, as revealed in diploid-triploid or interspecific chimeras', *Dev Biol* 110(2): 503-8.

- Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J. M., Braun, A., Daburon, V., Krzemien, J., Bourbon, H. M., Zhou, R., Vincent, A. et al.** (2010) 'A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response', *PLoS Biol* 8(8): e1000441.
- 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(3): 643-53.
- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004) 'Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm', *Nat Genet* 36(9): 1019-23.
- Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K. and Weissman, I. L.** (2002) 'Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors', *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11872-7.
- Manz, M. G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. and Weissman, I. L.** (2001a) 'Dendritic cell development from common myeloid progenitors', *Ann N Y Acad Sci* 938: 167-73; discussion 173-4.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. and Akashi, K.** (2001b) 'Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors', *Blood* 97(11): 3333-41.
- Marcos, M. A., Morales-Alcelay, S., Godin, I. E., Dieterlen-Lievre, F., Copin, S. G. and Gaspar, M. L.** (1997) 'Antigenic phenotype and gene expression pattern of lymphohemopoietic progenitors during early mouse ontogeny', *J Immunol* 158(6): 2627-37.
- 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(4): 1591-3.
- 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(2): 139-47.
- Mascarenhas, M. I., Parker, A., Dzierzak, E. and Ottersbach, K.** (2009) 'Identification of novel regulators of hematopoietic stem cell development through refinement of stem cell localization and expression profiling', *Blood* 114(21): 4645-53.
- Mathieson, B. J. and Fowlkes, B. J.** (1984) 'Cell surface antigen expression on thymocytes: development and phenotypic differentiation of intrathymic subsets', *Immunol Rev* 82: 141-73.
- 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(11): 1483-92.
- Matsuoka, S., Tsuji, K., Hisakawa, H., Xu, Mj, Ebihara, Y., Ishii, T., Sugiyama, D., Manabe, A., Tanaka, R., Ikeda, Y. et al.** (2001) 'Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells', *Blood* 98(1): 6-12.
- Mazini, L., Wunder, E., Sovalat, H., Bourderont, D., Baerenzung, M., Bachorz, J. and Henon, P.** (1998) 'Mature accessory cells influence long-term growth of human hematopoietic progenitors on a murine stromal cell feeder layer', *Stem Cells* 16(6): 404-12.

- McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J. et al.** (1994) 'Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1', *Nat Genet* 8(4): 345-51.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. and Weissman, I. L.** (1988) 'The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function', *Science* 241(4873): 1632-9.
- McDermott, S. P., Eppert, K., Lechman, E. R., Doedens, M. and Dick, J. E.** (2010) 'Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains', *Blood* 116(2): 193-200.
- McGrath, K. E., Kingsley, P. D., Koniski, A. D., Porter, R. L., Bushnell, T. P. and Palis, J.** (2008) 'Eucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus', *Blood* 111(4): 2409-17.
- 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(5): 1669-76.
- McKearn, J. P., McCubrey, J. and Fagg, B.** (1985) 'Enrichment of hematopoietic precursor cells and cloning of multipotential B-lymphocyte precursors', *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(21): 7414-8.
- McKinney-Freeman, S. L., Naveiras, O., Yates, F., Loewer, S., Philitas, M., Curran, M., Park, P. J. and Daley, G. Q.** (2009) 'Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells', *Blood* 114(2): 268-78.
- McNiece, I. K., Bertoncello, I., Kriegler, A. B. and Quesenberry, P. J.** (1990) 'Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC)', *Int J Cell Cloning* 8(3): 146-60.
- McNiece, I. K., Stewart, F. M., Deacon, D. M., Temeles, D. S., Zsebo, K. M., Clark, S. C. and Quesenberry, P. J.** (1989) 'Detection of a human CFC with a high proliferative potential', *Blood* 74(2): 609-12.
- Medvinsky, A. and Dzierzak, E.** (1996) 'Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region', *Cell* 86(6): 897-906.
- 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(6432): 64-7.
- Medvinsky, A., Rybtsov, S. and Taoudi, S.** (2011) 'Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions', *Development* 138(6): 1017-31.
- Meister, M.** (2004) 'Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence', *Curr Opin Immunol* 16(1): 10-5.
- Melchers, F.** (1979) 'Murine embryonic B lymphocyte development in the placenta', *Nature* 277(5693): 219-21.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. and Frenette, P. S.** (2010) 'Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche', *Nature* 466(7308): 829-34.

- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, C. and Torres, M.** (1999) 'Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth', *Nature* 402(6760): 425-9.
- Metcalf, D.** (1970) 'Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor', *J Cell Physiol* 76(1): 89-99.
- Metcalf, D., Johnson, G. R. and Mandel, T. E.** (1979) 'Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells', *J Cell Physiol* 98(2): 401-20.
- Micklem, H. S., Ford, C. E., Evans, E. P., Ogden, D. A. and Papworth, D. S.** (1972) 'Competitive in vivo proliferation of foetal and adult haematopoietic cells in lethally irradiated mice', *J Cell Physiol* 79(2): 293-8.
- Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M. and Peschle, C.** (1986) 'Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition', *J Clin Invest* 78(1): 51-60.
- Mikkola, H. K., Fujiwara, Y., Schlaeger, T. M., Traver, D. and Orkin, S. H.** (2003a) 'Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo', *Blood* 101(2): 508-16.
- Mikkola, H. K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T. M., Fujiwara, Y. and Orkin, S. H.** (2003b) 'Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene', *Nature* 421(6922): 547-51.
- Miles, C., Sanchez, M. J., Sinclair, A. and Dzierzak, E.** (1997) 'Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo', *Development* 124(2): 537-47.
- Miller, J., Horner, A., Stacy, T., Lowrey, C., Lian, J. B., Stein, G., Nuckolls, G. H. and Speck, N. A.** (2002) 'The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation', *Nat Genet* 32(4): 645-9.
- Mills, K. R., Kruep, D. and Saha, M. S.** (1999) 'Elucidating the origins of the vascular system: a fate map of the vascular endothelial and red blood cell lineages in *Xenopus laevis*', *Dev Biol* 209(2): 352-68.
- 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(3): 896-905.
- Mitjavila-Garcia, M. T., Cailleret, M., Godin, I., Nogueira, M. M., Cohen-Solal, K., Schiavon, V., Lecluse, Y., Le Pesteur, F., Lagrue, A. H. and Vainchenker, W.** (2002) 'Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells', *Development* 129(8): 2003-13.
- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukouyama, Y. and Hara, T.** (2000) 'Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development', *Cytokine Growth Factor Rev* 11(3): 177-83.

- Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y. and Ohki, M.** (1991) 't(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1', *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10431-4.
- Mizuochi, C., Fraser, S. T., Biasch, K., Horio, Y., Kikushige, Y., Tani, K., Akashi, K., Tavian, M. and Sugiyama, D.** (2012) 'Intra-Aortic Clusters Undergo Endothelial to Hematopoietic Phenotypic Transition during Early Embryogenesis', *PLoS One* 7(4): e35763.
- Monvoisin, A., Alva, J. A., Hofmann, J. J., Zovein, A. C., Lane, T. F. and Iruela-Arispe, M. L.** (2006) 'VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium', *Dev Dyn* 235(12): 3413-22.
- Moore, K. A., Ema, H. and Lemischka, I. R.** (1997a) 'In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells', *Blood* 89(12): 4337-47.
- Moore, K. A., Pytowski, B., Witte, L., Hicklin, D. and Lemischka, I. R.** (1997b) 'Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 4011-6.
- Moore, M. A. 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(3): 279-96.
- Moore, M. A. and Owen, J. J.** (1965) 'Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo', *Nature* 208(5014): 956 passim.
- Moore, M. A. and Owen, J. J.** (1967) 'Experimental studies on the development of the thymus', *J Exp Med* 126(4): 715-26.
- Morishita, K., Parganas, E., Parham, D. M., Matsugi, T. and Ihle, J. N.** (1990) 'The Evi-1 zinc finger myeloid transforming gene is normally expressed in the kidney and in developing oocytes', *Oncogene* 5(9): 1419-23.
- Morishita, K., Parker, D. S., Mucenski, M. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Ihle, J. N.** (1988) 'Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines', *Cell* 54(6): 831-40.
- Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M. and Weissman, I. L.** (1995) 'The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10302-6.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E. and Weissman, I. L.** (1997) 'Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors', *Development* 124(10): 1929-39.
- Morrison, S. J. and Weissman, I. L.** (1994) 'The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype', *Immunity* 1(8): 661-73.
- Moskow, J. J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I. O. and Buchberg, A. M.** (1995) 'Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice', *Mol Cell Biol* 15(10): 5434-43.
- Mouthon, M. A., Bernard, O., Mitjavila, M. T., Romeo, P. H., Vainchenker, W. and Mathieu-Mahul, D.** (1993) 'Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis', *Blood* 81(3): 647-55.

- 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-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis', *Cell* 65(4): 677-89.
- Mucenski, M. L., Taylor, B. A., Ihle, J. N., Hartley, J. W., Morse, H. C., 3rd, Jenkins, N. A. and Copeland, N. G.** (1988) 'Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors', *Mol Cell Biol* 8(1): 301-8.
- Muench, M. O., Cupp, J., Polakoff, J. and Roncarolo, M. G.** (1994) 'Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential', *Blood* 83(11): 3170-81.
- 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(4): 291-301.
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H. F., Handin, R. I. and Herbomel, P.** (2006) 'Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development', *Immunity* 25(6): 963-75.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. and Kishimoto, T.** (1996) 'Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1', *Nature* 382(6592): 635-8.
- Naik, U. P. and Parise, L. V.** (1997) 'Structure and function of platelet alpha IIb beta 3', *Curr Opin Hematol* 4(5): 317-22.
- Nakahata, T. and Ogawa, M.** (1982) 'Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies', *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(12): 3843-7.
- Nakamura, T., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G.** (1996) 'Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes', *Oncogene* 13(10): 2235-42.
- Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T.** (1994) 'Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture', *Science* 265(5175): 1098-101.
- Nakorn, T. N., Miyamoto, T. and Weissman, I. L.** (2003) 'Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors', *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 205-10.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. and Fessler, J. H.** (1994) 'Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development', *EMBO J* 13(15): 3438-47.
- Newman, P. J.** (1994) 'The role of PECAM-1 in vascular cell biology', *Ann N Y Acad Sci* 714: 165-74.
- Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C. and Muller, W. A.** (1990) 'PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily', *Science* 247(4947): 1219-22.
- Ng, Y. K., George, K. M., Engel, J. D. and Linzer, D. I.** (1994) 'GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene', *Development* 120(11): 3257-66.

- Nicolini, F. E., Holyoake, T. L., Cashman, J. D., Chu, P. P., Lambie, K. and Eaves, C. J.** (1999) 'Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice', *Blood* 94(8): 2686-95.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M. and Coverdale, J. A.** (2001) 'Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches', *Blood* 97(8): 2293-9.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M., Whitty, G. A., Williams, B., Webb, R. J., Denhardt, D. T., Bertocello, I., Bendall, L. J., Simmons, P. J. and Haylock, D. N.** (2005) 'Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells', *Blood* 106(4): 1232-9.
- 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(9): 1747-57.
- 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(6): 761-9.
- Niu, W., Huang, H., Zhao, L., Li, Z., He, W., Liu, B., Li, L. and Xiong, J.** (2012) 'Characterization of hemangioblast in umbilical arteries of mid-gestation mouse embryos', *Int J Hematol*.
- Nocka, K., Buck, J., Levi, E. and Besmer, P.** (1990a) 'Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors', *EMBO J* 9(10): 3287-94.
- Nocka, K., Tan, J. C., Chiu, E., Chu, T. Y., Ray, P., Traktman, P. and Besmer, P.** (1990b) 'Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W', *EMBO J* 9(6): 1805-13.
- Nolta, J. A., Thiemann, F. T., Arakawa-Hoyt, J., Dao, M. A., Barsky, L. W., Moore, K. A., Lemischka, I. R. and Crooks, G. M.** (2002) 'The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors', *Leukemia* 16(3): 352-61.
- Norsworthy, P. J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Taylor, P. R., Bygrave, A. E., Thompson, R. D., Nourshargh, S., Walport, M. J. and Botto, M.** (2004) 'Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis', *J Immunol* 172(6): 3406-14.
- North, T. E., de Bruijn, M. F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dzierzak, E. and Speck, N. A.** (2002) 'Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo', *Immunity* 16(5): 661-72.
- North, T. E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., Lord, A. M., Weber, G. J., Harris, J., Cutting, C. C., Huang, P. et al.** (2009) 'Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow', *Cell* 137(4): 736-48.
- North, T., Gu, T. L., Stacy, T., Wang, Q., Howard, L., Binder, M., Marin-Padilla, M. and Speck, N. A.** (1999) 'Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters', *Development* 126(11): 2563-75.

- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. and Busslinger, M.** (1999) 'Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5', *Nature* 401(6753): 556-62.
- Oberlin, E., El Hafny, B., Petit-Cocault, L. and Souyri, M.** (2010a) 'Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1165-73.
- Oberlin, E., Fleury, M., Clay, D., Petit-Cocault, L., Candelier, J. J., Mennesson, B., Jaffredo, T. and Souyri, M.** (2010b) 'VE-cadherin expression allows identification of a new class of hematopoietic stem cells within human embryonic liver', *Blood*.
- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I. and Peault, B.** (2002) 'Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo', *Development* 129(17): 4147-57.
- Ogawa, M.** (1993) 'Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells', *Blood* 81(11): 2844-53.
- Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T. and Nakauchi, H.** (1991) 'Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells', *J Exp Med* 174(1): 63-71.
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Ikuta, K., Yamamura, F., Naito, M. and Takahashi, K.** (1988) 'B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac', *EMBO J* 7(5): 1337-43.
- Ohlsson, R., Falck, P., Hellstrom, M., Lindahl, P., Bostrom, H., Franklin, G., Ahrlund-Richter, L., Pollard, J., Soriano, P. and Betsholtz, C.** (1999) 'PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta', *Dev Biol* 212(1): 124-36.
- Ohneda, O., Fennie, C., Zheng, Z., Donahue, C., La, H., Villacorta, R., Cairns, B. and Lasky, L. A.** (1998) 'Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium', *Blood* 92(3): 908-19.
- Ohto, H., Maeda, H., Shibata, Y., Chen, R. F., Ozaki, Y., Higashihara, M., Takeuchi, A. and Tohyama, H.** (1985) 'A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts', *Blood* 66(4): 873-81.
- Okada, H., Watanabe, T., Niki, M., Takano, H., Chiba, N., Yanai, N., Tani, K., Hibino, H., Asano, S., Mucenski, M. L. et al.** (1998) 'AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene', *Oncogene* 17(18): 2287-93.
- Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y. and Suda, T.** (1992) 'In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells', *Blood* 80(12): 3044-50.
- 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(2): 321-30.
- Olsen, B. R., Reginato, A. M. and Wang, W.** (2000) 'Bone development', *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 191-220.

- Oostendorp, R. A., Harvey, K. N., Kusadasi, N., de Bruijn, M. F., Saris, C., Ploemacher, R. E., Medvinsky, A. L. and Dzierzak, E. A.** (2002a) 'Stromal cell lines from mouse aorta-gonadomesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity', *Blood* 99(4): 1183-9.
- Oostendorp, R. A., Medvinsky, A. J., Kusadasi, N., Nakayama, N., Harvey, K., Orelia, C., Ottersbach, K., Covey, T., Ploemacher, R. E., Saris, C. et al.** (2002b) 'Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis', *J Cell Sci* 115(Pt 10): 2099-108.
- Oosterwegel, M., Timmerman, J., Leiden, J. and Clevers, H.** (1992) 'Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis', *Dev Immunol* 3(1): 1-11.
- Orelia, C., Haak, E., Peeters, M. and Dzierzak, E.** (2008) 'Interleukin-1-mediated hematopoietic cell regulation in the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo', *Blood* 112(13): 4895-904.
- Orelia, C., Harvey, K. N., Miles, C., Oostendorp, R. A., van der Horn, K. and Dzierzak, E.** (2004) 'The role of apoptosis in the development of AGM hematopoietic stem cells revealed by Bcl-2 overexpression', *Blood* 103(11): 4084-92.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H.** (1996) 'Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell', *Science* 273(5272): 242-5.
- Ottersbach, K. and Dzierzak, E.** (2005) 'The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region', *Dev Cell* 8(3): 377-87.
- Owen, J. J. and Ritter, M. A.** (1969) 'Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes', *J Exp Med* 129(2): 431-42.
- Paige, C. J., Gisler, R. H., McKearn, J. P. and Iscove, N. N.** (1984) 'Differentiation of murine B cell precursors in agar culture. Frequency, surface marker analysis and requirements for growth of clonable pre-B cells', *Eur J Immunol* 14(11): 979-87.
- Palacios, R. and Imhof, B. A.** (1993) 'At day 8-8.5 of mouse development the yolk sac, not the embryo proper, has lymphoid precursor potential in vivo and in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6581-5.
- Palis, J.** (2004) 'Developmental biology: no red cell is an island', *Nature* 432(7020): 964-5.
- 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(8): 4528-33.
- Palis, J., Malik, J., McGrath, K. E. and Kingsley, P. D.** (2010) 'Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1011-8.
- 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(22): 5073-84.

- 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', *Nat Genet* 11(1): 40-4.
- Pardanaud, L. and Dieterlen-Lievre, F.** (1993) 'Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo', *Anat Embryol (Berl)* 187(2): 107-14.
- Paul, R., Schuetze, S., Kozak, S. L., Kozak, C. A. and Kabat, D.** (1991) 'The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1', *J Virol* 65(1): 464-7.
- Peault, B. and Tavian, M.** (2003) 'Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus', *Ann N Y Acad Sci* 996: 132-40.
- Peeters, M., Ottersbach, K., Bollerot, K., Orelia, C., de Bruijn, M., Wijgerde, M. and Dzierzak, E.** (2009) 'Ventral embryonic tissues and Hedgehog proteins induce early AGM hematopoietic stem cell development', *Development* 136(15): 2613-21.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T. and Alon, R.** (1999) 'The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow', *J Clin Invest* 104(9): 1199-211.
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M. M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R. et al.** (2000) 'The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice', *Blood* 95(11): 3289-96.
- Pelosi, E., Valtieri, M., Coppola, S., Botta, R., Gabbianelli, M., Lulli, V., Marziali, G., Masella, B., Muller, R., Sgadari, C. et al.** (2002) 'Identification of the hemangioblast in postnatal life', *Blood* 100(9): 3203-8.
- Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A. and Crozatier, M.** (2012) 'Size control of the Drosophila hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals', *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(9): 3389-94.
- Perkins, A. S., Mercer, J. A., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G.** (1991) 'Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development', *Development* 111(2): 479-87.
- Peschle, C., Mavilio, F., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Russo, G., Mastroberardino, G. and Marinucci, M.** (1985) 'Erythropoietic development and hemoglobin switching in human embryos: cellular and molecular aspects', *Prog Clin Biol Res* 191: 383-96.
- Peschle, C., Migliaccio, A. R., Migliaccio, G., Petrini, M., Calandrini, M., Russo, G., Mastroberardino, G., Presta, M., Gianni, A. M., Comi, P. et al.** (1984) 'Embryonic----Fetal Hb switch in humans: studies on erythroid bursts generated by embryonic progenitors from yolk sac and liver', *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8): 2416-20.
- Petit-Cocault, L., Volle-Challier, C., Fleury, M., Peault, B. and Souyri, M.** (2007) 'Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis', *Development* 134(16): 3031-40.

- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N. et al.** (2002) 'G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4', *Nat Immunol* 3(7): 687-94.
- Petrenko, O., Beavis, A., Klaine, M., Kittappa, R., Godin, I. and Lemischka, I. R.** (1999) 'The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4', *Immunity* 10(6): 691-700.
- 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(6306): 257-60.
- Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V. and Fitzgerald, L. A.** (1988) 'The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex', *Blood* 71(4): 831-43.
- Pierelli, L., Bonanno, G., Rutella, S., Marone, M., Scambia, G. and Leone, G.** (2001) 'CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells', *Leuk Lymphoma* 42(6): 1195-206.
- Pineault, N., Helgason, C. D., Lawrence, H. J. and Humphries, R. K.** (2002) 'Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny', *Exp Hematol* 30(1): 49-57.
- Plett, P. A., Frankovitz, S. M., Wolber, F. M., Abonour, R. and Orschell-Traycoff, C. M.** (2002) 'Treatment of circulating CD34(+) cells with SDF-1alpha or anti-CXCR4 antibody enhances migration and NOD/SCID repopulating potential', *Exp Hematol* 30(9): 1061-9.
- Ploemacher, R. E. and Brons, N. H.** (1988) 'Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: II. Evidence for an early precursor of day-12 CFU-S and cells associated with radioprotective ability', *Exp Hematol* 16(1): 27-32.
- Ploemacher, R. E., van der Loo, J. C., van Beurden, C. A. and Baert, M. R.** (1993) 'Wheat germ agglutinin affinity of murine hemopoietic stem cell subpopulations is an inverse function of their long-term repopulating ability in vitro and in vivo', *Leukemia* 7(1): 120-30.
- Ploemacher, R. E., van der Sluijs, J. P., van Beurden, C. A., Baert, M. R. and Chan, P. L.** (1991) 'Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse', *Blood* 78(10): 2527-33.
- Ploemacher, R. E., van der Sluijs, J. P., Voerman, J. S. and Brons, N. H.** (1989) 'An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse', *Blood* 74(8): 2755-63.
- Ploemacher, R. E., van Os, R., van Beurden, C. A. and Down, J. D.** (1992) 'Murine haemopoietic stem cells with long-term engraftment and marrow repopulating ability are more resistant to gamma-radiation than are spleen colony forming cells', *Int J Radiat Biol* 61(4): 489-99.
- Plum, J., De Smedt, M., Defresne, M. P., Leclercq, G. and Vandekerckhove, B.** (1994) 'Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate to T cells in a mouse thymic microenvironment', *Blood* 84(5): 1587-93.
- Plum, J., De Smedt, M., Verhasselt, B., Kerre, T., Vanhecke, D., Vandekerckhove, B. and Leclercq, G.** (2000) 'Human T lymphopoiesis. In vitro and in vivo study models', *Ann N Y Acad Sci* 917: 724-31.

- 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(1): 47-57.
- Punzel, M., Gupta, P. and Verfaillie, C. M.** (2002) 'The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation', *Cell Commun Adhes* 9(3): 149-59.
- Qiu, F. H., Ray, P., Brown, K., Barker, P. E., Jhanwar, S., Ruddle, F. H. and Besmer, P.** (1988) 'Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus', *EMBO J* 7(4): 1003-11.
- Quackenbush, E. J., Gougos, A., Baumal, R. and Letarte, M.** (1986) 'Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells', *J Immunol* 136(1): 118-24.
- Quackenbush, E. J. and Letarte, M.** (1985) 'Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies', *J Immunol* 134(2): 1276-85.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D. and Manfrulli, P.** (2002) 'JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*', *Dev Biol* 241(1): 145-56.
- Rampon, C. and Huber, P.** (2003) 'Multilineage hematopoietic progenitor activity generated autonomously in the mouse yolk sac: analysis using angiogenesis-defective embryos', *Int J Dev Biol* 47(4): 273-80.
- Ransom, D. G., Haffter, P., Odenthal, J., Brownlie, A., Vogelsang, E., Kelsh, R. N., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M. et al.** (1996) 'Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis', *Development* 123: 311-9.
- Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D. and Rottapel, R.** (1996) 'Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7', *Eur J Immunol* 26(7): 1504-10.
- Rebel, V. I., Miller, C. L., Eaves, C. J. and Lansdorp, P. M.** (1996a) 'The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts', *Blood* 87(8): 3500-7.
- Rebel, V. I., Miller, C. L., Thornbury, G. R., Dragowska, W. H., Eaves, C. J. and Lansdorp, P. M.** (1996b) 'A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse', *Exp Hematol* 24(5): 638-48.
- Reems, J. A. and Torok-Storb, B.** (1995) 'Cell cycle and functional differences between CD34+/CD38hi and CD34+/38lo human marrow cells after in vitro cytokine exposure', *Blood* 85(6): 1480-7.
- 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(12): 4023-31.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I. L.** (2003) 'A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells', *Nature* 423(6938): 409-14.

- Rezzoug, F., Tocci, A., Safsafi, K., Vivier, G. and Touraine, J. L.** (1997) 'Human fetal liver cells induce colonies in spleen of lethally irradiated mice', *J Clin Immunol* 17(3): 205-11.
- Rhodes, K. E., Gekas, C., Wang, Y., Lux, C. T., Francis, C. S., Chan, D. N., Conway, S., Orkin, S. H., Yoder, M. C. and Mikkola, H. K.** (2008) 'The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation', *Cell Stem Cell* 2(3): 252-63.
- Ritter, M. A.** (1978) 'Embryonic mouse thymus development: stem cell entry and differentiation', *Immunology* 34(1): 69-75.
- Rizki, M. T. and Rizki, R. M.** (1959) 'Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*', *J Biophys Biochem Cytol* 5(2): 235-40.
- Robb, L. and Begley, C. G.** (1996) 'The helix-loop-helix gene SCL: implicated in T-cell acute lymphoblastic leukaemia and in normal haematopoietic development', *Int J Biochem Cell Biol* 28(6): 609-18.
- 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', *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7075-9.
- Robin, C., Bennaceur-Griscelli, A., Louache, F., Vainchenker, W. and Coulombel, L.** (1999) 'Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34+ CD38^{low} and CD34+ CD38⁺ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures', *Br J Haematol* 104(4): 809-19.
- Robin, C., Bollerot, K., Mendes, S., Haak, E., Crisan, M., Cerisoli, F., Lauw, I., Kaimakis, P., Jorna, R., Vermeulen, M. et al.** (2009) 'Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development', *Cell Stem Cell* 5(4): 385-95.
- Robin, C., Ottersbach, K., Boisset, J. C., Oziemlak, A. and Dzierzak, E.** (2011) 'CD41 is developmentally regulated and differentially expressed on mouse hematopoietic stem cells', *Blood* 117(19): 5088-91.
- Robin, C., Ottersbach, K., Durand, C., Peeters, M., Vanes, L., Tybulewicz, V. and Dzierzak, E.** (2006) 'An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells', *Dev Cell* 11(2): 171-80.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F. and Busslinger, M.** (1999) 'Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors', *Nature* 401(6753): 603-6.
- 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(6265): 447-9.
- Roques, M., Durand, C., Gautier, R., Canto, P. Y., Petit-Cocault, L., Yvernogeu, L., Dunon, D., Souyri, M. and Jaffredo, T.** (2012) 'Endoglin expression level discriminates long-term hematopoietic from short-term clonogenic progenitor cells in the aorta', *Haematologica*.
- Rossant, J. and Cross, J. C.** (2001) 'Placental development: lessons from mouse mutants', *Nat Rev Genet* 2(7): 538-48.

- Roy, V., Miller, J. S. and Verfaillie, C. M.** (1997) 'Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver', *Exp Hematol* 25(5): 387-94.
- Rybtsov, S., Sobiesiak, M., Taoudi, S., Souilhol, C., Senserrich, J., Liakhovitskaia, A., Ivanovs, A., Frampton, J., Zhao, S. and Medvinsky, A.** (2011) 'Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region', *J Exp Med* 208(6): 1305-15.
- Sam, S., Leise, W. and Hoshizaki, D. K.** (1996) 'The serpent gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development', *Mech Dev* 60(2): 197-205.
- Samokhvalov, I. M., Samokhvalova, N. I. and Nishikawa, S.** (2007) 'Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis', *Nature* 446(7139): 1056-61.
- 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(6): 513-25.
- Sasaki, K. and Kendall, M. D.** (1985) 'The morphology of the haemopoietic cells of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes', *J Anat* 140 (Pt 2): 279-95.
- Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T. and Komori, T.** (1996) 'Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta', *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12359-63.
- Sasaki, T., Mizuochi, C., Horio, Y., Nakao, K., Akashi, K. and Sugiyama, D.** (2010) 'Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse', *Development*.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M. and Humphries, R. K.** (1995) 'Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo', *Genes Dev* 9(14): 1753-65.
- Schlaeger, T. M., Mikkola, H. K., Gekas, C., Helgadottir, H. B. and Orkin, S. H.** (2005) 'Tie2Cre-mediated gene ablation defines the stem-cell leukemia gene (SCL/tal1)-dependent window during hematopoietic stem-cell development', *Blood* 105(10): 3871-4.
- Schmitt, T. M., de Pooter, R. F., Gronski, M. A., Cho, S. K., Ohashi, P. S. and Zuniga-Pflucker, J. C.** (2004) 'Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro', *Nat Immunol* 5(4): 410-7.
- Schmitt, T. M. and Zuniga-Pflucker, J. C.** (2002) 'Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro', *Immunity* 17(6): 749-56.
- Schofield, R.** (1978) 'The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell', *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.
- Schuetze, S., Stenberg, P. E. and Kabat, D.** (1993) 'The Ets-related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts', *Mol Cell Biol* 13(9): 5670-8.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H.** (1994) 'Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages', *Science* 265(5178): 1573-7.

- 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(6): 981-90.
- 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(6535): 62-6.
- Sheiness, D. and Gardinier, M.** (1984) 'Expression of a proto-oncogene (proto-myb) in hemopoietic tissues of mice', *Mol Cell Biol* 4(7): 1206-12.
- Shi, S. and Gronthos, S.** (2003) 'Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp', *J Bone Miner Res* 18(4): 696-704.
- Shimizu, S., Nagasawa, T., Katoh, O., Komatsu, N., Yokota, J. and Morishita, K.** (2002) 'EVI1 is expressed in megakaryocyte cell lineage and enforced expression of EVI1 in UT-7/GM cells induces megakaryocyte differentiation', *Biochem Biophys Res Commun* 292(3): 609-16.
- 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(6513): 432-4.
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., Greiner, D. L. et al.** (1995) 'Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice', *J Immunol* 154(1): 180-91.
- Sinka, L., Biasch, K., Khazaal, I., Peault, B. and Tavian, M.** (2012) 'Angiotensin-converting enzyme (CD143) specifies emerging lympho-hematopoietic progenitors in the human embryo', *Blood* 119(16): 3712-23.
- Sintes, J., Romero, X., Marin, P., Terhorst, C. and Engel, P.** (2008) 'Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells', *Exp Hematol* 36(9): 1199-204.
- Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V., Fox, N., Broudy, V. C., Wolf, N. S. and Kaushansky, K.** (1996) 'The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells', *Blood* 87(12): 4998-5005.
- 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(2): 302-12.
- Smith, R. A. and Glomski, C. A.** (1977) 'Embryonic and fetal hemopoiesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)', *Anat Rec* 189(3): 499-517.
- Solar, G. P., Kerr, W. G., Zeigler, F. C., Hess, D., Donahue, C., de Sauvage, F. J. and Eaton, D. L.** (1998) 'Role of c-mpl in early hematopoiesis', *Blood* 92(1): 4-10.
- Soriano, P.** (1999) 'Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain', *Nat Genet* 21(1): 70-1.
- Spangrude, G. J., Aihara, Y., Weissman, I. L. and Klein, J.** (1988a) 'The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets', *J Immunol* 141(11): 3697-707.

- Spangrude, G. J., Brooks, D. M. and Tumas, D. B.** (1995) 'Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function', *Blood* 85(4): 1006-16.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L.** (1988b) 'Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells', *Science* 241(4861): 58-62.
- Speck, N. A. and Gilliland, D. G.** (2002) 'Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia', *Nat Rev Cancer* 2(7): 502-13.
- Speck, N. A. and Iruela-Arispe, M. L.** (2009) 'Conditional Cre/LoxP strategies for the study of hematopoietic stem cell formation', *Blood Cells Mol Dis* 43(1): 6-11.
- Speck, N. A. and Terry, S.** (1995) 'A new transcription factor family associated with human leukemias', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 5(3-4): 337-64.
- Spiegel, A., Kalinkovich, A., Shivtiel, S., Kollet, O. and Lapidot, T.** (2008) 'Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment', *Cell Stem Cell* 3(5): 484-92.
- Srouf, E. F., Brandt, J. E., Briddell, R. A., Grigsby, S., Leemhuis, T. and Hoffman, R.** (1993) 'Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro', *Blood* 81(3): 661-9.
- Srouf, E. F., Zanjani, E. D., Brandt, J. E., Leemhuis, T., Briddell, R. A., Heerema, N. A. and Hoffman, R.** (1992) 'Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells', *Blood* 79(6): 1404-12.
- Stanley, E. R. and Metcalf, D.** (1969) 'Partial purification and some properties of the factor in normal and leukaemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in vitro', *Aust J Exp Biol Med Sci* 47(4): 467-83.
- Steiner, R.** (1973) 'On the kinetics of erythroid cell differentiation in fetal mice. II. DNA and hemoglobin measurements of individual erythroblasts during gestation', *J Cell Physiol* 82(2): 219-30.
- Steiniger, B., Ulfing, N., Risse, M. and Barth, P. J.** (2007) 'Fetal and early post-natal development of the human spleen: from primordial arterial B cell lobules to a non-segmented organ', *Histochem Cell Biol* 128(3): 205-15.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grunewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L. M., Rittling, S. R. et al.** (2005) 'Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size', *J Exp Med* 201(11): 1781-91.
- Stricht, M.V.d** (1899) 'L'origine des premières cellules sanguines et des premiers vaisseaux sanguins dans l'aire vasculaire de chauves-souris', *Bull. Acad. R. Med. Belg.* 13: 336-351.
- Suda, T., Arai, F. and Hirao, A.** (2005) 'Hematopoietic stem cells and their niche', *Trends Immunol* 26(8): 426-33.
- Suda, T., Takubo, K. and Semenza, G. L.** (2011) 'Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche', *Cell Stem Cell* 9(4): 298-310.

- Sugiyama, D., Arai, K. and Tsuji, K.** (2005) 'Definitive hematopoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells in the mouse embryo', *Stem Cells Dev* 14(6): 687-96.
- Sugiyama, D., Kulkeaw, K., Mizuochi, C., Horio, Y. and Okayama, S.** (2011) 'Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production', *Biochem Biophys Res Commun* 410(2): 301-6.
- Sugiyama, D., Ogawa, M., Hirose, I., Jaffredo, T., Arai, K. and Tsuji, K.** (2003) 'Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the pre-liver stage', *Blood* 101(12): 4733-8.
- Sugiyama, D., Ogawa, M., Nakao, K., Osumi, N., Nishikawa, S., Arai, K., Nakahata, T. and Tsuji, K.** (2007) 'B cell potential can be obtained from pre-circulatory yolk sac, but with low frequency', *Dev Biol* 301(1): 53-61.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T.** (2006) 'Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches', *Immunity* 25(6): 977-88.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Eaves, A. C., Dragowska, W. and Lansdorp, P. M.** (1989) 'Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro', *Blood* 74(5): 1563-70.
- Suzuki, A., Andrew, D. P., Gonzalo, J. A., Fukumoto, M., Spellberg, J., Hashiyama, M., Takimoto, H., Gerwin, N., Webb, I., Molineux, G. et al.** (1996) 'CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein', *Blood* 87(9): 3550-62.
- Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C. and Eaves, C. J.** (1990) 'Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy', *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(22): 8736-40.
- Szilvassy, S. J., Lansdorp, P. M., Humphries, R. K., Eaves, A. C. and Eaves, C. J.** (1989) 'Isolation in a single step of a highly enriched murine hematopoietic stem cell population with competitive long-term repopulating ability', *Blood* 74(3): 930-9.
- 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(19): 12611-5.
- Takahashi, Y., Carpino, N., Cross, J. C., Torres, M., Parganas, E. and Ihle, J. N.** (2003) 'SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation', *EMBO J* 22(3): 372-84.
- Takakura, N., Watanabe, T., Suenobu, S., Yamada, Y., Noda, T., Ito, Y., Satake, M. and Suda, T.** (2000) 'A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis', *Cell* 102(2): 199-209.
- Takashina, T.** (1987) 'Haemopoiesis in the human yolk sac', *J Anat* 151: 125-35.
- Takeuchi, M., Sekiguchi, T., Hara, T., Kinoshita, T. and Miyajima, A.** (2002) 'Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow', *Blood* 99(4): 1190-6.

- Tam, P. P. and Beddington, R. S.** (1987) 'The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis', *Development* 99(1): 109-26.
- Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M. and Miyajima, A.** (2003) 'Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis', *Blood* 102(9): 3154-62.
- Tanaka, Y., Hayashi, M., Kubota, Y., Nagai, H., Sheng, G., Nishikawa, S. and Samokhvalov, I. M.** (2012) 'Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage', *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(12): 4515-20.
- Tang, Y., Harrington, A., Yang, X., Friesel, R. E. and Liaw, L.** (2010) 'The contribution of the Tie2+ lineage to primitive and definitive hematopoietic cells', *Genesis* 48(9): 563-7.
- Taniguchi, H., Toyoshima, T., Fukao, K. and Nakauchi, H.** (1996) 'Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver', *Nat Med* 2(2): 198-203.
- Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T. and Miyajima, A.** (2003) 'Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1', *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1775-86.
- Taoudi, S., Gonneau, C., Moore, K., Sheridan, J. M., Blackburn, C. C., Taylor, E. and Medvinsky, A.** (2008) 'Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs', *Cell Stem Cell* 3(1): 99-108.
- Taoudi, S. and Medvinsky, A.** (2007) 'Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9399-403.
- Taoudi, S., Morrison, A. M., Inoue, H., Gribi, R., Ure, J. and Medvinsky, A.** (2005) 'Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver', *Development* 132(18): 4179-91.
- Taswell, C.** (1981) 'Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis', *J Immunol* 126(4): 1614-9.
- 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(1): 67-72.
- Tavian, M., Hallais, M. F. and Peault, B.** (1999) 'Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo', *Development* 126(4): 793-803.
- Tavian, M. and Peault, B.** (2005a) 'The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero', *Exp Hematol* 33(9): 1062-9.
- Tavian, M. and Peault, B.** (2005b) 'Embryonic development of the human hematopoietic system', *Int J Dev Biol* 49(2-3): 243-50.
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L. and Peault, B.** (2001) 'The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm', *Immunity* 15(3): 487-95.
- Taylor, E., Taoudi, S. and Medvinsky, A.** (2010) 'Hematopoietic stem cell activity in the aorta-gonad-mesonephros region enhances after mid-day 11 of mouse development', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1055-60.

- 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(7): 1829-37.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. and Schmidt, O.** (2002) 'The coagulation of insect hemolymph', *Cell Mol Life Sci* 59(2): 363-72.
- Thomas, M. L.** (1989) 'The leukocyte common antigen family', *Annu Rev Immunol* 7: 339-69.
- Thompson, M. A., Ransom, D. G., Pratt, S. J., MacLennan, H., Kieran, M. W., Detrich, H. W., 3rd, Vail, B., Huber, T. L., Paw, B., Brownlie, A. J. et al.** (1998) 'The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis', *Dev Biol* 197(2): 248-69.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G. and Humphries, R. K.** (1999) 'Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size', *Blood* 94(8): 2605-12.
- Tiedemann, K.** (1977) 'On the yolk sac of the cat. II. Erythropoietic phases, ultrastructure of aging primitive erythroblasts, and blood vessels', *Cell Tissue Res* 183(1): 71-89.
- Till, J. E. and McCulloch, Ea** (1961) 'A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells', *Radiat Res* 14: 213-22.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P. and Leiden, J. M.** (1996) 'Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage', *Nature* 384(6608): 474-8.
- Tober, J., Koniski, A., McGrath, K. E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K. K., Waugh, R. and Palis, J.** (2007) 'The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis', *Blood* 109(4): 1433-41.
- 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(19): 7456-9.
- 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(8): 1371-80.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. and Weissman, I. L.** (2000) 'Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor', *Science* 290(5499): 2152-4.
- Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L.** (1994) 'CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development', *Annu Rev Immunol* 12: 85-116.
- 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* 371(6494): 221-6.
- 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(10): 3636-43.

- Tsai, S. F., Martin, D. I., Zon, L. I., D'Andrea, A. D., Wong, G. G. and Orkin, S. H.** (1989) 'Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells', *Nature* 339(6224): 446-51.
- Tsuchiyama, J., Mori, M. and Okada, S.** (1995) 'Murine spleen stromal cell line SPY3-2 maintains long-term hematopoiesis in vitro', *Blood* 85(11): 3107-16.
- 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(3): 325-34.
- Tyan, M. L. and Herzenberg, L. A.** (1968) 'Studies on the ontogeny of the mouse immune system. II. Immunoglobulin-producing cells', *J Immunol* 101(3): 446-50.
- Uchida, N., Aguila, H. L., Fleming, W. H., Jerabek, L. and Weissman, I. L.** (1994) 'Rapid and sustained hematopoietic recovery in lethally irradiated mice transplanted with purified Thy-1.1lo Lin-Sca-1+ hematopoietic stem cells', *Blood* 83(12): 3758-79.
- Uchida, N. and Weissman, I. L.** (1992) 'Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow', *J Exp Med* 175(1): 175-84.
- Ueno, H. and Weissman, I. L.** (2006) 'Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands', *Dev Cell* 11(4): 519-33.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. and Busslinger, M.** (1994) 'Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP', *Cell* 79(5): 901-12.
- van de Rijn, M., Heimfeld, S., Spangrude, G. J. and Weissman, I. L.** (1989) 'Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(12): 4634-8.
- van der Sluijs, J. P., de Jong, J. P., Brons, N. H. and Ploemacher, R. E.** (1990) 'Marrow repopulating cells, but not CFU-S, establish long-term in vitro hemopoiesis on a marrow-derived stromal layer', *Exp Hematol* 18(8): 893-6.
- van Os, R., Kamminga, L. M. and de Haan, G.** (2004) 'Stem cell assays: something old, something new, something borrowed', *Stem Cells* 22(7): 1181-90.
- Vass, E. and Nappi, A. J.** (2000) 'Developmental and immunological aspects of Drosophila-parasitoid relationships', *J Parasitol* 86(6): 1259-70.
- Vellguth, S., von Gaudecker, B. and Muller-Hermelink, H. K.** (1985) 'The development of the human spleen. Ultrastructural studies in fetuses from the 14th to 24th week of gestation', *Cell Tissue Res* 242(3): 579-92.
- Vestweber, D.** (2008) 'VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation', *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(2): 223-32.
- Vogeli, K. M., Jin, S. W., Martin, G. R. and Stainier, D. Y.** (2006) 'A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula', *Nature* 443(7109): 337-9.

- Walmsley, M., Ciau-Uitz, A. and Patient, R.** (2002) 'Adult and embryonic blood and endothelium derive from distinct precursor populations which are differentially programmed by BMP in *Xenopus*', *Development* 129(24): 5683-95.
- Waltzer, L., Gobert, V., Osman, D. and Haenlin, M.** (2010) 'Transcription factor interplay during *Drosophila* haematopoiesis', *Int J Dev Biol* 54(6-7): 1107-15.
- Wang, H., Zhang, P., Liu, L. and Zou, L.** (2012) 'Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche', *Crit Rev Oncol Hematol*.
- Wang, J. C., Doedens, M. and Dick, J. E.** (1997) 'Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay', *Blood* 89(11): 3919-24.
- Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., Gullo, C., Clarke, K., Sosa, M. R., Sharpe, A. H. et al.** (2004) 'The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions', *J Exp Med* 199(9): 1255-64.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. and Speck, N. A.** (1996a) '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(8): 3444-9.
- Wang, Q., Stacy, T., Miller, J. D., Lewis, A. F., Gu, T. L., Huang, X., Bushweller, J. H., Bories, J. C., Alt, F. W., Ryan, G. et al.** (1996b) 'The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo', *Cell* 87(4): 697-708.
- Wang, Y., Nathanson, L. and McNiece, I. K.** (2011) 'Differential hematopoietic supportive potential and gene expression of stroma cell lines from midgestation mouse placenta and adult bone marrow', *Cell Transplant* 20(5): 707-26.
- Watanabe, Y., Gytoku, J. and Katsura, Y.** (1989) 'Analysis of the development of T cells by transferring precursors into cultured fetal thymus with a microinjector', *Thymus* 13(1-2): 57-71.
- Watson, E. D. and Cross, J. C.** (2005) 'Development of structures and transport functions in the mouse placenta', *Physiology (Bethesda)* 20: 180-93.
- Weaver, A., Ryder, W. D. and Testa, N. G.** (1997) 'Measurement of long-term culture initiating cells (LTC-ICs) using limiting dilution: comparison of endpoints and stromal support', *Exp Hematol* 25(13): 1333-8.
- Weilbaecher, K., Weissman, I., Blume, K. and Heimfeld, S.** (1991) 'Culture of phenotypically defined hematopoietic stem cells and other progenitors at limiting dilution on Dexter monolayers', *Blood* 78(4): 945-52.
- Weinstein, B. M., Schier, A. F., Abdelilah, S., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Driever, W. and Fishman, M. C.** (1996) 'Hematopoietic mutations in the zebrafish', *Development* 123: 303-9.
- Weng, W., Sukowati, E. W. and Sheng, G.** (2007) 'On hemangioblasts in chicken', *PLoS One* 2(11): e1228.

- Westin, E. H., Gallo, R. C., Arya, S. K., Eva, A., Souza, L. M., Baluda, M. A., Aaronson, S. A. and Wong-Staal, F.** (1982) 'Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(7): 2194-8.
- White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C. E. et al.** (2008) 'Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis', *Cell Stem Cell* 2(2): 183-9.
- Whitlock, C. A., Tidmarsh, G. F., Muller-Sieburg, C. and Weissman, I. L.** (1987) 'Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule', *Cell* 48(6): 1009-21.
- Whitlock, C. A. and Witte, O. N.** (1982) 'Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow', *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(11): 3608-12.
- Wiles, M. V. and Keller, G.** (1991) 'Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture', *Development* 111(2): 259-67.
- Wilkinson, R., Lyons, A. B., Roberts, D., Wong, M. X., Bartley, P. A. and Jackson, D. E.** (2002) 'Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease', *Blood* 100(1): 184-93.
- Wilkinson, R. N., Pouget, C., Gering, M., Russell, A. J., Davies, S. G., Kimelman, D. and Patient, R.** (2009) 'Hedgehog and Bmp polarize hematopoietic stem cell emergence in the zebrafish dorsal aorta', *Dev Cell* 16(6): 909-16.
- Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S. et al.** (1990) 'Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene', *Cell* 63(1): 167-74.
- Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A. C., Knabenhans, C., Macdonald, H. R. and Trumpp, A.** (2004) 'c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation', *Genes Dev* 18(22): 2747-63.
- Wilson, A. and Trumpp, A.** (2006) 'Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches', *Nat Rev Immunol* 6(2): 93-106.
- Wolber, F. M., Leonard, E., Michael, S., Orschell-Traycoff, C. M., Yoder, M. C. and Srour, E. F.** (2002) 'Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system', *Exp Hematol* 30(9): 1010-9.
- Wong, P. M., Chung, S. W., Chui, D. H. and Eaves, C. J.** (1986) 'Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac', *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11): 3851-4.
- Wood, H. B., May, G., Healy, L., Enver, T. and Morriss-Kay, G. M.** (1997) 'CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis', *Blood* 90(6): 2300-11.
- Wood, W. and Jacinto, A.** (2007) 'Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking', *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 542-51.

- Wright, D. E., Bowman, E. P., Wagers, A. J., Butcher, E. C. and Weissman, I. L.** (2002) 'Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines', *J Exp Med* 195(9): 1145-54.
- Xu, M. J., Matsuoka, S., Yang, F. C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Eguchi, M., Asano, S., Nakahata, T. and Tsuji, K.** (2001) 'Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac', *Blood* 97(7): 2016-22.
- Xu, M. J., Tsuji, K., Ueda, T., Mukoyama, Y. S., Hara, T., Yang, F. C., Ebihara, Y., Matsuoka, S., Manabe, A., Kikuchi, A. et al.** (1998) 'Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines', *Blood* 92(6): 2032-40.
- Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L. and Rossant, J.** (1993) 'flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors', *Development* 118(2): 489-98.
- Yamane, T., Hosen, N., Yamazaki, H. and Weissman, I. L.** (2009) 'Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development', *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22): 8953-8.
- Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O.** (1995) 'Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development', *Development* 121(2): 549-60.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. and Dearolf, C. R.** (1997) 'viking: identification and characterization of a second type IV collagen in Drosophila', *Gene* 198(1-2): 17-25.
- Yilmaz, O. H., Kiel, M. J. and Morrison, S. J.** (2006) 'SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity', *Blood* 107(3): 924-30.
- Yoder, M. C., Cumming, J. G., Hiatt, K., Mukherjee, P. and Williams, D. A.** (1996) 'A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice', *Biol Blood Marrow Transplant* 2(2): 59-67.
- Yoder, M. C. and Hiatt, K.** (1997) 'Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients', *Blood* 89(6): 2176-83.
- Yoder, M. C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D. M. and Orlic, D.** (1997a) 'Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac', *Immunity* 7(3): 335-44.
- Yoder, M. C., Hiatt, K. and Mukherjee, P.** (1997b) 'In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6776-80.
- Yokomizo, T. and Dzierzak, E.** (2010) 'Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos', *Development*.
- Yokomizo, T., Hasegawa, K., Ishitobi, H., Osato, M., Ema, M., Ito, Y., Yamamoto, M. and Takahashi, S.** (2008) 'Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse', *Blood* 111(8): 4075-80.
- Yokomizo, T., Ogawa, M., Osato, M., Kanno, T., Yoshida, H., Fujimoto, T., Fraser, S., Nishikawa, S., Okada, H., Satake, M. et al.** (2001) 'Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells', *Genes Cells* 6(1): 13-23.

- Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J. D. and Yamamoto, M.** (1994) 'Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells', *Development* 120(7): 1759-66.
- Yoon, M. J., Koo, B. K., Song, R., Jeong, H. W., Shin, J., Kim, Y. W., Kong, Y. Y. and Suh, P. G.** (2008) 'Mind bomb-1 is essential for intraembryonic hematopoiesis in the aortic endothelium and the subaortic patches', *Mol Cell Biol* 28(15): 4794-804.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K. et al.** (2007) 'Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche', *Cell Stem Cell* 1(6): 685-97.
- Yoshimoto, M., Montecino-Rodriguez, E., Ferkowicz, M. J., Porayette, P., Shelley, W. C., Conway, S. J., Dorshkind, K. and Yoder, M. C.** (2011) 'Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential', *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Yoshimoto, M., Porayette, P., Glosson, N. L., Conway, S. J., Carlesso, N., Cardoso, A. A., Kaplan, M. H. and Yoder, M. C.** (2012) 'Autonomous murine T cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac prior to HSC emergence', *Blood*.
- Yuan, R., Astle, C. M., Chen, J. and Harrison, D. E.** (2005) 'Genetic regulation of hematopoietic stem cell exhaustion during development and growth', *Exp Hematol* 33(2): 243-50.
- Yuasa, H., Oike, Y., Iwama, A., Nishikata, I., Sugiyama, D., Perkins, A., Mucenski, M. L., Suda, T. and Morishita, K.** (2005) 'Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression', *EMBO J* 24(11): 1976-87.
- Zambidis, E. T., Sinka, L., Tavian, M., Jokubaitis, V., Park, T. S., Simmons, P. and Peault, B.** (2007) 'Emergence of human angiohematopoietic cells in normal development and from cultured embryonic stem cells', *Ann N Y Acad Sci* 1106: 223-32.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G. and Flake, A. W.** (1995) 'Retention and multilineage expression of human hematopoietic stem cells in human-sheep chimeras', *Stem Cells* 13(2): 101-11.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G. and Flake, A. W.** (1996) 'The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis', *Int J Hematol* 63(3): 179-92.
- Zeigler, B. M., Sugiyama, D., Chen, M., Guo, Y., Downs, K. M. and Speck, N. A.** (2006) 'The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential', *Development* 133(21): 4183-92.
- Zeigler, F. C., Bennett, B. D., Jordan, C. T., Spencer, S. D., Baumhueter, S., Carroll, K. J., Hooley, J., Bauer, K. and Matthews, W.** (1994) 'Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells', *Blood* 84(8): 2422-30.
- Zhan, Y. and Zhao, Y.** (2008) 'Hematopoietic stem cell transplant in mice by intra-femoral injection', *Methods Mol Biol* 430: 161-9.
- Zhang, C. C., Kaba, M., Ge, G., Xie, K., Tong, W., Hug, C. and Lodish, H. F.** (2006) 'Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells', *Nat Med* 12(2): 240-5.

- Zhang, C. C. and Lodish, H. F.** (2004) 'Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells', *Blood* 103(7): 2513-21.
- 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(6960): 836-41.
- Zhang, X., Friedman, A., Heaney, S., Purcell, P. and Maas, R. L.** (2002) 'Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis', *Genes Dev* 16(16): 2097-107.
- Zon, L. I.** (2008) 'Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal', *Nature* 453(7193): 306-13.
- Zon, L. I., Tsai, S. F., Burgess, S., Matsudaira, P., Bruns, G. A. and Orkin, S. H.** (1990) 'The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome', *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 668-72.
- 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(12): 3234-41.
- Zon, L. I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H. F. and Orkin, S. H.** (1991) 'Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1', *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10638-41.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R.** (1998) 'Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development', *Nature* 393(6685): 595-9.
- Zovein, A. C., Hofmann, J. J., Lynch, M., French, W. J., Turlo, K. A., Yang, Y., Becker, M. S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J. C. et al.** (2008) 'Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells', *Cell Stem Cell* 3(6): 625-36.
- Zovein, A. C., Turlo, K. A., Ponec, R. M., Lynch, M. R., Chen, K. C., Hofmann, J. J., Cox, T. C., Gasson, J. C. and Iruela-Arispe, M. L.** (2010) 'Vascular remodeling of the vitelline artery initiates extra-vascular emergence of hematopoietic clusters', *Blood*.
- Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C. et al.** (1990) 'Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor', *Cell* 63(1): 213-24.

RÉSUMÉ

Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) sont capables de générer l'ensemble des cellules sanguines tout en maintenant leur nombre initial, assurant ainsi l'homéostasie du système hématopoïétique tout au long de la vie adulte. Elles émergent au cours du développement embryonnaire dans la région Aorte-Gonades-Mesonephros (AGM), ainsi que dans les vaisseaux vitellins et ombilicaux. Elles vont ensuite migrer dans le foie fœtal (FF) pour s'amplifier massivement avant de rejoindre la moelle osseuse qui est leur lieu de résidence définitif. Pendant longtemps, on a pensé que les CSHs retrouvées dans le FF provenaient uniquement de l'AGM et des artères ombilicale et vitelline. Aujourd'hui, les données de la littérature indiquent que le sac vitellin (SV) est compétent pour la génération de CSHs, et que le placenta (PI) est capable d'amplifier un contingent de CSHs, ce qui suggère que ces deux organes participent également à la mise en place des CSHs dans l'embryon.

Au cours de ce voyage initiatique, les CSHs se retrouvent au contact de microenvironnements particuliers et de signaux moléculaires spécifiques selon le site ou l'organe hématopoïétiques dans lequel elles se situent. A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur les marqueurs de surface qui caractérisent les CSHs de ces différents tissus, et sur les interactions que ces cellules entretiennent avec le microenvironnement. Bien que plusieurs combinaisons de marqueurs permettant d'enrichir des populations en CSHs aient été décrites, aucune comparaison entre ces combinaisons n'a été réalisée dans les différents tissus. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur les populations $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$, $CD144^+CD45^+$ et $Sca-1^+AA4.1^+$, et nous avons cherché à déterminer si les populations présentant le meilleur potentiel hématopoïétique dans les différents sites et organes hématopoïétiques embryonnaires (AGM, SV, PI et FF) expriment ou non les mêmes combinaisons de marqueurs de surface. Durant ma thèse, j'ai étudié ces populations au niveau du PI et du SV et le projet dans son ensemble a permis de montrer que l'enrichissement en CSHs n'implique pas les mêmes marqueurs de surface selon le tissu considéré. Ainsi, dans les sites d'émergence (AGM) et d'émergence/amplification hématopoïétique (SV), la population la plus enrichie en CSHs a pour phénotype $CD144^+CD45^+$. Concernant le PI, organe d'amplification des CSHs, la population la plus enrichie en CSHs a pour phénotype $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}Sca-1^+$ alors que dans le FF, organe d'amplification/différenciation des CSHs, elle a pour phénotype $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}Sca-1^+AA4.1^+$. L'analyse moléculaire de ces populations est en cours d'établissement et va nous permettre de mettre en évidence des molécules régulatrices spécifiques de l'émergence, de l'amplification et de l'autorenouvellement des CSHs.

Pour aller plus loin dans l'étude des CSHs $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$ du PI, nous avons utilisé le modèle de souris double transgénique VECR pour étudier leur origine et il semblerait qu'à E11.5, toutes les cellules $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$ ne proviennent pas de l'endothélium hématogène. J'ai également débuté une étude de l'activité hématopoïétique des CSHs $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$ issues de PI de souris $Mpl^{-/-}$ qui présentent un défaut de contenu en CSHs dans le PI et le FF. Les résultats préliminaires indiquent qu'à E11.5, le potentiel hématopoïétique de la population $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$ du PI $Mpl^{-/-}$ est effectivement inférieur à celui observé pour la population $CD34^+c\text{-kit}^{\text{hi}}$ du PI C57Bl6. Cependant, cette différence n'est plus visible à E12.5.

Ainsi, le PI constituerait donc une niche transitoire d'amplification et de maturation des CSHs issues de l'AGM avant que celles-ci ne colonisent le FF. Toutefois, mon travail de thèse ainsi que les données de la littérature actuelle ne permettent pas d'écarter la possibilité que le PI puisse produire des CSHs *de novo*, laissant le débat ouvert.