



HAL
open science

Différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques via une population du type hémangioblastique

Alejandra Vargas Valderrama

► **To cite this version:**

Alejandra Vargas Valderrama. Différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques via une population du type hémangioblastique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT: 2020UPASQ021 . tel-03275322

HAL Id: tel-03275322

<https://theses.hal.science/tel-03275322>

Submitted on 1 Jul 2021

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.

Différenciation des cellules souches
pluripotentes humaines en cellules
endothéliales et cellules hématopoïétiques *via*
une population du type hémangioblastique

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Interactions Cellules souches-niches:
physiologie, tumeurs et réparation tissulaire, 94807, Villejuif, France.

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Villejuif,
le 8 décembre 2020, par**

Alejandra VARGAS VALDERRAMA

Composition du Jury

Bruno COLOMBO

Pr. Université d'Evry-Val d'Essonne

Président

Catherine BOISSON-VIDAL

DR Université de Paris

Rapporteur

Luc PARDANAUD

CR Sorbonne Paris Cité

Rapporteur

John DE VOS

Pr. Université de Montpellier

Examineur

Christine BALDESCHI

Pr. Université d'Evry-Val d'Essonne

Examinatrice

Alain CHAPEL

Chercheur IRSN. Université Paris-Saclay

Examineur

Maria Teresa MITJAVILA GARCIA

CR. Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

Hind GUENOU

MCF. Université d'Evry-Val d'Essonne

Co-directrice de thèse

A mi abuelo Miguel Antonio Valderrama Rojas

por creer en mí e inculcarme el amor a la naturaleza.

No te olvide.

Remerciements

Le moment que j'attendais avec impatience est enfin arrivé. La fin du premier chapitre de mon histoire professionnelle. Personne ne m'avait dit que ce serait facile. Aujourd'hui, je confirme que je n'aurais pas pu y arriver sans toutes les personnes qui m'ont entouré et aidé ces dernières années et que je souhaite remercier dans les pages qui suivent.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les rapporteurs et les examinateurs, d'avoir accepté de lire, de juger et de discuter le travail que j'ai accompli au cours de ces quatre années de thèse. Merci, en particulier au Dr Pardanaud et au Dr Boisson-Vidal pour leur rapport qui m'a insufflé de l'énergie dans cette dernière ligne droite

Merci à Georges Uzan d'avoir donné l'opportunité à mes directrices de thèse, Hind et Maite, d'accueillir une étudiante en M2, qui s'est avérée être moi. Je te remercie d'avoir écouté mes répétitions pour le concours de l'école doctorale et de tes conseils. Je te remercie pour le soutien et l'intérêt que tu as toujours témoigné pour mon projet et pour ma continuation dans le monde scientifique. Merci aussi à Marie Caroline pour ses conseils, toujours pertinents et précis, qui m'ont permis d'améliorer mes présentations.

Merci infiniment à mes deux directrices de thèse, Hind Guenou et Maite Mitjavila. Merci d'avoir vu mon potentiel en dépit d'une première interview par visioconférence. J'espère de ne pas vous avoir déçu. Merci de m'avoir toujours motivé et de m'avoir donné les meilleures opportunités. De m'avoir poussé à montrer mon travail lors de conférences scientifiques pour que je me sente fière de mon travail. Je vous remercie également d'être allé au-delà de la relation professionnelle et de vous être intéressées à ma vie personnelle. Hind, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de diriger des TP et TD à l'Université d'Evry. C'était un défi que j'ai apprécié et que je n'oublierai jamais. Merci de m'avoir transmis cet amour pour l'enseignement. Cette expérience m'a aussi permis de comprendre ce qui est ta routine d'enseignant et de chercheur à la fois. Ce n'est pas facile et pour cela je t'admire. J'espère qu'un jour, tu auras les moyens pour pouvoir faire les deux d'une manière plus simple.

Maite, pour te remercier à toi, je dois écrire une autre thèse. La période où, malheureusement, tu n'as pas pu être présente au laboratoire, a été la plus difficile de ma thèse. La façon dont nous nous sommes entendus professionnellement et personnellement a créé une amitié qui, je l'espère, durera toute notre vie. Tu es devenue l'une de mes plus grandes supportrices, maman poule. Tu as toujours vu en moi des qualités que même moi je ne suis pas capable de voir. Merci de tes appels quotidiens pendant le confinement. Merci de m'avoir rappelé que l'échec n'était pas une

option quand je n'en pouvais plus. Et aujourd'hui, je te remercie pour toutes les discussions, même si nous n'étions pas toujours d'accord, qui m'ont permis de forger mon esprit critique. C'était mon petit jeu de trouver des arguments pour te convaincre sur mon point de vu. C'était un plaisir de travailler avec une femme aussi forte et directe, un exemple de la chercheuse que je veux être. Tu me manqueras trop.

Merci également à Anne Dubart-Kupperschmitt. Si Maite est devenue ma maman au laboratoire, tu es devenue ma tante. Merci de croire en moi et de m'intégrer dans le projet iLite. De m'avoir accueilli dans ton équipe à un point tel que les gens pensaient que j'appartenais à l'U1193. Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir recommandé pour m'ouvrir de nouvelles opportunités de travail. Je te remercie également pour les discussions scientifiques qui ont éveillé ma curiosité et mon amour pour le foie. Et enfin, merci pour toutes les pauses-café, tous les déjeuners et tous les Halloween ensemble, où tu as suivi notre folie. Ta force et ton leadership sont des qualités que j'admire et qui resteront dans ma mémoire comme le modèle de femme que j'aspire à devenir.

Je tiens également à remercier tous les collaborateurs qui ont rendu ce projet possible. Merci à Philippe Duquesnoy pour tous ses conseils sur la biologie moléculaire, tous les oligos dessinés et fournis et pour ses corrections de toutes les rédactions en français que j'ai écrit pendant mes années de doctorat. Sans lui, ce manuscrit n'aurait pas été le même. Merci aussi pour tous les desserts qui ont rendu nos journées au laboratoire si agréables.

Merci aussi à mon cher Denis Clay pour son infinie patience. Ton expertise en cytométrie de flux a souvent fait des miracles. Je me souviendrai toujours de ta positivité et de ton énergie. Merci de nous aider à mettre en place tous les blagues que nous avons imaginées avec Anne-Charlotte. Je te le dis toujours et je veux qu'il reste une preuve écrite : Denis, tu es le meilleur !

Grâce à l'équipe IGR de la plateforme d'imagerie et de cytométrie, Valérie, Karine et Tudor, je sais qu'il n'a pas été facile de travailler avec cette poisse que je porte depuis le début de ma thèse. Je vous remercie pour toute la compréhension et la priorité que vous avez donné à mon projet.

Merci à Cyril Quivoron et Fawzia Louache pour les expériences de reconstitution hématopoïétique. Cyril, ton professionnalisme et ta capacité à injecter des fémurs de souris m'ont impressionné. Fawzia, merci beaucoup pour l'intérêt que t'as porté à mon projet et la disponibilité dont t'as toujours fait preuve.

A ma chère Estelle Oberlin, je tiens à te remercier pour la confiance et l'intérêt que tu as accordé à mon projet. Ce fut un honneur pour moi de discuter de l'hématopoïèse humaine avec toi. J'admire ta méticulosité, ton dévouement et ton amour pour la science. J'espère qu'un jour je

reviendrai travailler sur l'hématopoïèse embryonnaire et ce sera un honneur de collaborer avec toi. J'attends avec impatience de voir les nouveaux projets que tu vas développer.

À mes sœurs Antonietta Messina et Anne-Charlotte Ponsen, merci beaucoup pour tant d'anecdotes que nous avons vécues ensemble, pour m'avoir accepté avec toute ma folie, pour être simplement vous. Avec Antonietta, ce fut presque le coup de foudre, peut-être parce que nous étions les seules étrangères à l'époque dans le laboratoire qui s'embrouillaient avec le français. Je suis convaincue que nous avons tous un ange gardien post-doc pour nous guider au cours de notre PhD, Antonietta, tu as été cet ange pour moi. Merci de m'avoir écouté tant de fois, d'avoir essuyé mes larmes, de m'avoir motivé. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour travailler avec toi sur un projet aussi ambitieux que les organoïdes du foie. J'ai tellement appris de toi. Merci de m'avoir appris de façon désintéressée. Je n'en doute pas qu'un jour, tu deviendras la leader de ta propre équipe et tu seras la meilleure. Tu me manqueras trop, mais tu ne te débarrasseras pas de moi si facilement.

Pour ma chère Anne-Charlotte, notre amitié exigeait que mon français s'améliore pour pouvoir faire les blagues qui nous ont réunies. Le cappuccino du matin me fera toujours penser à toi. Je t'admire énormément. Tes mains de chirurgienne, ton soin et ton dévouement à chaque expérience, ton désir d'entreprendre de grands projets scientifiques. J'espère que la vie t'offrira les opportunités que tu mérites et que tu n'hésiteras pas à les accepter. J'aimerais pouvoir te montrer comment je te vois afin que tu voies toutes les qualités que tu as. Merci de m'avoir écouté quand je n'en pouvais plus, de tes nombreux câlins qui m'ont injecté de l'énergie chaque jour, et merci pour tous les bêtises que nous avons faites ensemble. Tu me manqueras trop, mais nous avons encore beaucoup de projets à réaliser ensemble.

Au matriarcats du rez-de-chaussée de Lavoisier, mes respects à chacune de vous, merci pour tous ces moments de folie et de gourmandise. Eléonor, cela a été un plaisir de partager du temps avec toi, je me souviendrai toujours de ta façon élégante et toujours correcte de dire les choses, et de ton visage, surtout ton haussement de sourcil, à chaque fois que je disais une de mes bêtises. Je suis très curieuse de voir tes avancées dans le monde des cholangiocytes. A Nassima, merci de ta gentillesse infinie, toujours prête à aider et avec un sourire. Manon et Marwa, j'attends avec impatience vos soutenance de thèse. Je sais que la thèse n'est pas facile, elle ne l'est jamais, mais vous êtes dans la dernière ligne droite et vous êtes fortes et intelligentes. N'oubliez pas que vous pouvez compter sur moi pour tout ce dont vous avez besoin. Merci d'être toujours aussi gentilles avec moi.

Au bureau de gestion où j'ai passé beaucoup de temps dernièrement et en général aux membres de l'unité mixte UMS44. Merci à Christine, Hélène, Clémentine, Rahma et Vincent et aux

anciennes gestionnaires Noëlla et Sonia pour leur aide tout au long de ces années. Je remercie tout particulièrement ma chère Rahma qui m'a tant chouchoutée et m'a fait énormément rire. Je suis de celles qui pensent que nous avons besoin, sur cette planète, de personnes plus sincères et plus efficaces comme toi. À mon cher Vincent, merci d'avoir créé la bande son de ma thèse et d'avoir rigolé avec mes blagues bêtes. Ta curiosité pour la science et tes questions toujours pertinentes m'ont surpris et me font croire que tu serais un bon chercheur. A tous les deux, j'espère que notre amitié ne prendra pas fin le jour où je soutiendrai ma thèse. A Benoît, merci pour ces nombreuses pauses café pleines de rires et d'anecdotes. J'admire ta responsabilité et organisation. Aux responsables de la plateforme d'imagerie, Philippe et Larbi, toujours à l'écoute et prêts à apporter leur aide à tout moment, mille mercis. À Isabelle et Philippe, merci de votre aide et de toutes les conversations agréables que nous avons eues.

A tous les membres de l'unité 1197, je vous remercie de m'avoir accueillie et de m'avoir fait sentir spéciale. A Philippe, Sabrina et Sylvie, merci pour les conseils, les blagues et les cours de français improvisés. À Sina et Essam, je remercie vos commentaires et l'intérêt que vous avez porté à chacune de mes présentations. A Nassim, merci pour ta bonne humeur qui m'a fait sentir la bienvenue dès le début. À Julien et Aurore merci pour leur bonne humeur. A Billy Billy et Chloé, beaucoup de courage et de chance dans la poursuite de vos thèses. Vous avez la motivation et l'intelligence pour faire de grandes choses. Et n'oubliez pas que nous, les doctorants, jouons un rôle important dans l'ambiance de l'équipe. Continuez à organiser des activités, faites du laboratoire un endroit agréable pour vous et surtout, accueillez à bras ouverts tous les nouveaux étudiants. À ma chère mexicaine, Laura, merci pour tant et tant de séances de thérapie. Tes conseils étaient toujours sages. J'ai toujours eu le sentiment que tu étais la personne qui me comprenait le mieux. A Claude Boucheix qui ne fait pas partie de l'unité U1197 mais qui s'est toujours intéressé à mon projet, toujours prêt à aider de manière désintéressée. Merci pour les conversations sur la science et pour les viennoiseries qui ont souvent régalié nos goûters.

A mis mentores del colegio y del instituto en Colombia y en España. Siempre supe que quería dedicarme a esto y ha sido gracias a este amor loco por la ciencia que me habéis transmitido. A mis amigos en general y en particular, a mi familia de biotecnólogos valencianos: estoy muy orgullosa de todo lo que habéis logrado y de teneros como amigos. Gracias por todo el apoyo y por no haberme olvidado. A Miriam, Evy, Jose, Alba, Alejandro y Lucia, ¡os quiero! A Lucia gracias por patrocinar mis largas sesiones de escritura y sobretodo, por las llamadas de ánimo y de enfado porque no me cogía vacaciones. Algún día tendré las vacaciones que merezco y me encantara pasarlas contigo.

Enfin, la partie la plus importante pour moi, ma famille. Enerzijds aan mijn Belgische ouders en broer, Greet, Luc en Stef: bedankt voor alle steun. Elke week keek ik uit naar het weekend waarin

ik naar België kon reizen en mijn batterijen kon opladen met jullie knuffels en het heerlijke eten van mijn mama Greet. Ik zal nooit genoeg woorden hebben om jullie te bedanken voor mij te adopteren als extra lid van de familie. Stef, jij bent de volgende PhD van de familie, en je kan altijd op mij rekenen voor wat dan ook. Aan mijn lieve Tony en Sofie en mijn kapoentjes Wout en Senne, bedankt voor alle steun en liefde die jullie mij gegeven hebben. Aan de kleintjes in het bijzonder, bedankt, want spelen met jullie doet me even de rest van de wereld vergeten. Bedankt aan mijn Belgische meme's en pepe's, Rozen en Winkel, want ik heb altijd me altijd welkom gevoeld in de familie dankzij jullie en ik wou dan ook aan jullie een paar regels van mijn thesis wijden. Dank ook aan Els, Filip, Maxime en vooral aan Margot, die, ondanks het feit dat we elkaar niet goed begrijpen, altijd een bijzondere belangstelling voor mijn project heeft getoond. Ik denk dat je een goede wetenschapper zou zijn.

Thanks to the most special Belgian in my life and my partner in crime. Robin. 7 years ago, life put us unexpectedly in each other's way and since then, I thank destiny every day for this beautiful coincidence. You have suffered as much as I have during my PhD. Thank you for waiting for me and for always having my back. You were the one who kept me going on even when I wanted to give up. Thank you for reading and correcting every paragraph in English that I wrote during my PhD. I think right now, you know more about the hemangioblast than I do. *Ik hou van jou* and I cannot imagine any other better person to spend the rest of life with. Today begins our life together *mijn vitamientje*.

Gracias a toda mi familia en Colombia que siempre me han enviado su apoyo desde la distancia. Unas líneas de agradecimiento especiales a mi tía Elizabeth y a sus hijos Cristina, Oscar, Juan Camilo y Anita.

Gracias a mis padres y a mi hermana, Inés, Eduardo y Natalia. Hace 19 años nuestra vida cambio para siempre y nos convertimos en inmigrantes. Sé que la vida no ha sido fácil para ustedes, papás, y que cada paso que han dado lo han hecho pensando en mí y en Natalia. ¡Estoy tan orgullosa de ustedes! Soy lo que soy gracias a ustedes. Les agradezco en estas líneas (y sé que no es suficiente) infinitamente todas y cada una de las decisiones que tomaron y que me han conducido hasta aquí. Gracias por apoyarme y enseñarme a volar, aunque eso significaba que no nos veríamos a menudo, que nos hablaríamos poco. Gracias por entender mi sueño y preguntarme incluso si mis ratones seguían vivos. A mi querida hermana, Natalia, eres la persona que más quiero en este mundo y cuando veo que te sientes orgullosa de mí, me haces creer que puedo con todo. Gracias por cada mensaje, cada broma que me sacó de mi rutina y me regaló una sonrisa. Quiero verte grande y celebrar tus triunfos. Los amo familia y esta tesis es por y para ustedes.

Table des matières

Abréviations	15
Avant-propos	25
Chapitre I : Les cellules souches	31
1.1. Introduction.....	31
1.2. Les cellules souches embryonnaires et adultes.....	31
1.3. Les cellules souches pluripotentes	33
1.3.1. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes	35
1.3.2. L'état pluripotent naïf et amorcé.....	35
1.3.3. Les cellules souches pluripotentes induites.....	40
1.3.3.1. Etapes de la reprogrammation	40
1.3.3.2. Challenges des CSPih vers l'application thérapeutique	43
1.4. Applications des cellules souches pluripotentes	46
1.4.1. La recherche fondamentale	48
1.4.2. Développement des médicaments et tests de toxicité.....	52
1.4.3. Médecine régénérative	54
1.4.4. Les organoïdes.....	57
1.5. Problèmes éthiques sur l'utilisation des cellules souches	60
Chapitre II : Les cellules endothéliales	67
2.1. Introduction.....	67
2.2. Anatomie et physiologie des vaisseaux sanguins et lymphatiques	69
2.2.1. Les artères	69
2.2.2. Les veines	70
2.2.3. Les vaisseaux lymphatiques	70
2.2.4. Les capillaires sanguins	70
2.2.5. Les capillaires lymphatiques.....	71
2.3. La cellule endothéliale	72

2.3.1. Les progéniteurs endothéliaux.....	74
2.4. Développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques	76
2.4.1. La vasculogénèse.....	76
2.4.1.1. Mécanismes moléculaires du développement des vaisseaux sanguins	78
2.4.1.2. Spécification artère/veine.....	81
2.4.1.3. Lymphangiogénèse.....	82
2.4.2. L'angiogénèse.....	83
2.5. Rôles de l'endothélium dans l'organisme.....	87
2.5.1. Le transport de molécules à travers de l'endothélium	87
2.5.2. Contrôle du tonus vasculaire	88
2.5.3. Capacités épuratrices des cellules endothéliales.....	90
2.5.4. L'endothélium et l'inflammation	91
2.5.5. L'endothélium et l'organogénèse	94
2.6. Pathologies associées au dysfonctionnement des cellules endothéliales	95
Chapitre III : Les cellules hématopoïétiques	101
3.1. Introduction.....	101
3.2. Classification des cellules hématopoïétiques.....	101
3.2.1. Érythrocytes ou globules rouges.....	102
3.2.2. Plaquettes ou thrombocytes.....	103
3.2.3. Granulocytes : neutrophiles, éosinophiles et basophiles	104
3.2.4. Monocytes et macrophages.....	105
3.2.5. Lymphocytes B et T	105
3.2.6. Les lymphocytes cytotoxiques naturels ou natural killer.....	107
3.2.7. Les cellules dendritiques	107
3.3. Les cellules souches hématopoïétiques	108
3.3.1. Caractérisation phénotypique.....	108
3.3.2. Caractérisation fonctionnelle.....	109

3.3.3. Quiescence, prolifération et différenciation des CSHs	111
3.4. Développement embryonnaire des cellules hématopoïétiques	116
3.4.1. L'hématopoïèse primitive	117
3.4.2. L'hématopoïèse définitive.....	118
3.4.2.1. Spécification de l'endothélium hémogénique	120
3.4.2.2. Transition endothélial-hématopoïétique (TEH)	123
3.4.2.3. Colonisation du foie et expansion des CSH	126
3.4.3. L'hématopoïèse chez l'homme	130
3.4.3.1. L'hématopoïèse in vitro à partir de CSPH.....	131
3.4.4. L'hémangioblaste	135
3.5. Maladies hématopoïétiques.....	137
Chapitre IV : Cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques dérivées des CSPH	143
4.1. Introduction.....	143
4.2. Les cellules endothéliales.....	143
4.2.1. Sources primaires.....	143
4.2.2. Les CSPH, une source infinie des cellules endothéliales	145
4.2.2.1. Cellules endothéliales spécialisées à partir des CSPH	148
4.2.2.2. Améliorations des protocoles de différenciation endothéliale	152
4.2.3. Applications des cellules endothéliales générées par la CSPH.....	153
4.2.3.1. La thérapie cellulaire et la modélisation des maladies	154
4.2.3.2. Ingénierie tissulaire	156
4.3. Les cellules hématopoïétiques.....	159
4.3.1. Différenciation de cellules hématopoïétiques matures à partir des CSPH	159
4.3.2. Différenciation des CSPH en CSH.....	163
4.3.3. Perspectives pour l'amélioration de la différenciation hématopoïétique à partir des CSPH.....	164
Objectifs.....	167

Résultats	171
Axe 1	171
Axe 2	172
Efficient hPSCs differentiation into endothelial and hematopoietic cells via a hemangioblast-like population.....	173
Organoïdes hépatiques vascularisés dérivés des CSPih.....	209
Discussion et perspectives	223
Annexes	245
Bibliographie	271

Abréviations

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine (de l'anglais « *angiotensin converting enzyme* ») appelé aussi CD143

ADAMTS: de l'anglais « *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* »

AGM : Aorte-gonade mésonéphros

AMD : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

AML1 : Protéine 1 de la leucémie myéloïde aiguë (de l'anglais « *acute myeloid leukemia 1 protein* »)

AMM : Autorisation de mise sur le marché

Ang : Angiopoïétine

ANGPTL : de l'anglais « *angiopoïétine-like* »

APLNR : Récepteur de l'apeline

APMAAm : Aminopropylméthacrylamide

ApoE : Apolipoprotein E

APP : Protéine précurseur amyloïde (de l'anglais « *amyloid precursor protein* »)

AR : Acide rétinoïque

ASBGT : Transporteur de sel biliaire apical dépendant du sodium (de l'anglais « *apical sodium-dependent bile salt transporter* »)

AT-II : Angiotensine II

ATP : Adénosine triphosphate

BC : Colonies blastiques (de l'anglais « *blasts colonies* »)

BCL-XL : de l'anglais « *B-cell lymphoma-extra large* »

BCR : Récepteur des cellules B (de l'anglais « *B cell receptor* »)

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau (de l'anglais « *brain-derived neurotrophic factor* »)

BFU-E : de l'anglais « *burst-forming units-erythroid* »

BIRC3 : de l'anglais « *baculoviral IAP repeat containing 3 protein* »

BM : Membrane basale

BMI1 : de l'anglais « *B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1* »)

BMP-4 : Protéine morphogénétique osseuse 4 (de l'anglais « *bone morphogenetic protein 4* »)

BMPR2 : Récepteur de la BMP-2

BPF : Bonnes pratiques de fabrication ou *GMP* (de l'anglais « *good manufacturing practices* »)

c-KIT : de l'anglais « *proto-oncogene c-Kit, tyrosine-protein kinase* »

c-MYC : de l'anglais « *myelocytomatosis oncogene* »

cAMP : Adénosyl monophosphate cyclique

CAR : Récepteur d'antigène chimérique (de l'anglais « *chimeric antigen receptor* »)

CBF : Facteur de liaison au noyau (de l'anglais « *binding core factor* »)

CCN : Cellules de la crête neurale

CD : Cluster de différenciation

CDH5 : Gène qui code pour la VE-cadhérine

CE : Cellules endothéliales

CE-CSPh : CE dérivées de CSPh

CFC : Cellules formant des colonies (de l'anglais « *colony forming cell* »)

CFU-E : Unités de formation de colonies érythroïdes (de l'anglais « *colony-forming unit erythroid* »)

CFU-GEMM : Unités de formation de colonies de granulocytes, érythrocytes, monocytes et mégacaryocytes (de l'anglais « *colony-forming unit for granulocytes, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes* »)

CFU-GM : Unités de formation de colonies de granulocytes et monocytes (de l'anglais « *colony-forming unit colony-forming unit for granulocytes and macrophages* »)

cGMP : Guanosine monophosphate cyclique

CGP : Cellules germinales primordiales

CLP : Progéniteur commun lymphoïde (de l'anglais « *common lymphoid progenitor* »)

CMH : Complexe majeure d'histocompatibilité

CMP : Progéniteur commun myéloïde (de l'anglais « *common myeloid progenitor* »)

CNN : Cellules de la crête neurale

Co : Collagène

COUP-TFII : Facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine (de l'anglais « *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II* »)

CRISPR-Cas9 : de l'anglais *CRISPR* pour « *clustered regular interspaced short palindromic repeats* » et Cas9 (*CRISPR associated protein 9*)

CSE : Cellules souches embryonnaires

CSEh : Cellules souches embryonnaires humaines

CSEm : Cellules souches embryonnaires murines

CSEpi : Cellules souches épiblastiques

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSH-CSPh : CSH générées à partir de CSPh

CSM : Cellules souches mésenchymateuses

CSP : Cellules souches pluripotentes

CSP_h : Cellules souches pluripotentes humaines

CSP_i : Cellules souches pluripotentes induites

CSP_{ih} : Cellules souches pluripotentes induites humaines

CXCL12 : Chimiochine 12 avec le motif C-X-C (de l'anglais « *C-X-C motif chemokine ligand 12* »)

DAB2 : de l'anglais « *disabled homolog 2* »

Dex : *Dexamethasone*

DLL : de l'anglais « *delta-like protein* »

DNMT1 : de l'anglais « *ADN-méthyltransférase 1* »

DOTL1 : de l'anglais « *disruptor of telomeric silencing 1-like* »

dpc : du latin *dies post coitum*

E : Jour embryonnaire chez la souris

EB : Corps embryoïdes (de l'anglais « *embryoid bodies* »)

EBM-2 : de l'anglais « *endothelial basal medium 2* »

EC : Cellules endothéliales (de l'anglais « *endothelial cells* »)

ECFC : Cellules formant des colonies endothéliales (de l'anglais « *endothelial colony forming cell* »)

ECM : Matrice extracellulaire (de l'anglais « *extracellular matrix* »)

EFNB : Ephrine-B

EGF : de l'anglais « *epidermal growth factor* »

EGM-2 : de l'anglais « *endothelial cell growth medium 2* »

EMP : Progéniteurs érythro-myéloïdes (de l'anglais « *erythroid-myeloid progenitors* »)

eNOS : Oxyde nitrique synthase des cellules endothéliales (de l'anglais « *endothelial nitric oxide synthase* »)

EPCR : Récepteur endothélial de la protéine C réactive (de l'anglais « *endothelial protein C receptor* »)

EPO : Erythropoïétine

EPR : Epithélium pigmentaire rétinien

ERK : de l'anglais « *extracellular signal-regulated kinases* »

EryP-CFC : Progéniteur des érythrocytes primitifs (de l'anglais « *primitive erythroid progenitor* »)

ESRRB : de l'anglais « *estrogen related receptor beta* »

ET : Endothéline

ETS : E-vingt-six spécifique (de l'anglais « *E-twenty-six transformation-specific* »)

ETV2 : Variante d'ETS 2 (de l'anglais « *ETS translocation variant 2* »)

Facteur T = *Brachyury*

Facteur VIII : Facteur de coagulation VIII

F8 : Gène qui code pour le facteur de coagulation VIII

Fb : Fibroblastes

Fc : *Fragment* cristallisable

FcYRIIb2 : Récepteurs du Fc des Immunoglobulines G

FEM : Fibroblastes embryonnaires murins

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes (de l'anglais « *fibroblast growth factor* »)

FGFR-3 : Récepteur de type 3 des FGF (de l'anglais « *fibroblast growth factor receptor 3* »)

FLI-1 : de l'anglais « *Friend leukemia integration 1* »

FLK1 : Kinase du foie foetal Flk1 (de l'anglais « *fetal liver kinase 1* »)

FLT : de l'anglais « *Fms-like tyrosine kinase* »

FLT-3L : Ligand de la tyrosine kinase 3 (l'anglais « *fms-like tyrosine kinase-3 ligand* »)

FOX : de l'anglais « *forkhead box protein* »

G-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes (de l'anglais « *granulocyte colony-stimulating factor* »)

GAG : Glycosaminoglycanes

GATA : Séquence nucléotidique GATA

GBX2 : de l'anglais « *gastrulation brain homeobox 2* »

GLUT : Transporteur de glucose (de l'anglais « *GLUcose transporter* »)

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de monocytes (de l'anglais « *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* »)

GMP : Progéniteur commun granulo-monocytaire (de l'anglais « *granulocyte-monocyte progenitor* »)

GP60 : Glycoprotéine 60

GSK-3β : Glycogène synthase kinase 3 bêta (GSK-3β de l'anglais « *glycogen synthase kinase* »)

GSK3 : Glycogène synthase kinase 3 (de l'anglais « *glycogen synthase kinase 3* »)

GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte (de l'anglais « *graft versus host disease* »)

HAEC : de l'anglais « *human aortic endothelial cells* »

Hb : Hémoglobine

HBMEC : de l'anglais « *human brain microvascular endothelial cells* »

HDMEC : de l'anglais « *human dermal microvascular endothelial cells* »

HES : de l'anglais « *hairy and enhancer of split-1* »

HEY : de l'anglais « *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein* »

HIF-α : Facteur de transcription inductible par l'hypoxie (de l'anglais « *hypoxia inducible factor* »)

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes (de l'anglais « *hepatocyte growth factor* »)

HLSEC : de l'anglais « *human liver sinusoidal endothelial cells* »

HOX : de l'anglais « *homeobox cluster* »

HPAEC : de l'anglais « *human pulmonary artery endothelial cells* »

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

HUVEC : Cellules endothéliales humaines du cordon ombilical (de l'anglais "*human umbilical vein endothelial cells*")

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire 1 (de l'anglais « *intercellular adhesion molecule 1* ») appelé aussi CD54

ICC : Immunocytochimie

IGF : Facteur de croissance ressemblant à l'insuline (de l'anglais « *insuline-like growth factor* »)

IL : Interleukine

ITG : Intégrine

KDR : Récepteur 2 du VEGF (de l'anglais « *kinase insert domain receptor* ») appelé aussi CD309

KLF : de l'anglais « *kruppel-like factor* »

KO : de l'anglais « *knock-out* »

LCE : Cellules artérielles, veineuses, lymphatiques pas trouvé

LDL : Lipoprotéines de basse densité (de l'anglais « *low density lipoprotein* »)

LFA-1 : Antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 (de l'anglais « *lymphocyte function-associated antigen-1* »)

LIF : Inhibiteur de la leucémie (de l'anglais « *Leukemia inhibitor factor* »)

LIN28 : de l'anglais « *abnormal cell LINEage* »

LMO : de l'anglais « *LIM domain only 2* »

LMP : Progéniteur commun lymphoïde (de l'anglais « *common lymphoid progenitor* »)

LMPP : Progéniteurs multipotents engagés vers le lignage lymphoïde (de l'anglais « *lymphoid-primed multipotent progenitors* »)

LSEC : Cellules endothéliales sinusoidales du foie (de l'anglais « *liver sinusoidal endothelial cells* »)

LTC-IC : Cellule initiant une culture à long terme (de l'anglais « *long term culture-initiating cell* »)

Lyve : de l'anglais « *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1* »

LYVE-1 : Récepteur 1 de l'hyaluronane endothélial du vaisseau lymphatique (de l'anglais « *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* »)

M-CSF : Facteur de stimulation des colonies de macrophages (de l'anglais « *macrophage colony-stimulating factor* »)

Mac-1 : Antigène macrophage-1

MCI : Masse cellulaire interne

MCP-1 : Protéine chimio attractive des monocytes (de l'anglais « *monocyte chemoattractant protein 1* ») appelée aussi CCL2 (de l'anglais « *chemokine ligand 2* »)

MEP : Progéniteur commun mégacaryocytaire-érythroïde (de l'anglais « *megakaryocyte-erythroid progenitor cell* »)

MLCK : Kinase des chaînes légères de la myosine (de l'anglais « *myosin light-chain kinase* ») appelée aussi MYLK

MLL-AF4 : de l'anglais « *mixed-lineage leukemia-ALL1-fused gene from chromosome 4* »

MPL : Protéine de la leucémie myéloproliférative (de l'anglais « *myeloproliferative leukemia protein* »)

MSF : Milieu sans sérum

mTOR : de l'anglais « *mechanistic target of rapamycin* »

NANOG : de l'irlandais « *land of the young* »

NK : Lymphocytes cytotoxiques naturels, appelés lymphocytes NK (de l'anglais « *natural killer* »)

NKX2-5 : Protéine homéotique Nkx-2.5 (de l'anglais « *NK2 homeobox 5* »)

NO : Oxyde nitrique

NOD/SCID : NOD de l'anglais « *non-obese diabetic* » et SCID de l'anglais « *severe combined immunodeficiency* »

NR2F2 : Protéine Homeobox Nkx-2.5 (de l'anglais « *nuclear receptor subfamily 2 group F member 2* »)

NRP : Neuropiline

OCT3/4 : de l'anglais « *octamer-binding transcription factor 4* » ou *POU5F1*

P-Sp : Splanchnopleure para-aortique (de l'anglais « *para-aortic splanchnopleura* »)

P4HB : Polyhydroxyalcanoates

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PAI-1 : Inhibiteur 1 de l'activateur tissulaire du plasminogène (de l'anglais « *Plasminogen activator inhibitor-1* »)

PD : Maladie de Parkinson (de l'anglais « *Parkinson's disease* »)

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (de l'anglais « *platelet-derived growth factor subunit* »)

PDGFR α : Récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes (de l'anglais « *platelet-derived growth factor receptor alpha* »)

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEC : Progéniteurs endothéliaux circulants

PECAM-1 : Molécule d'adhésion endothéliale et des plaquettes 1 (de l'anglais « *platelet endothelial cell adhesion molecule* ») appelé aussi CD31

PET : Polytéraphalate d'éthylène

PGA : acide polyglycolique

PGI₂ : Prostaglandine I2

PI : Prostacycline

PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase et de la protéine kinase B

PMEDSAH : Poly[2-(méthacryloyloxy)éthyl diméthyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxyde]

Pr : Péricytes

PROX-1 : Prospero protéine homeobox 1 (de l'anglais « *prospero homeobox protein 1* »)

PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (de l'anglais « *pattern recognition receptor* »)

Raldh2 : Rétinaldéhyde déshydrogénase 2

RAR-α : Récepteurs de l'acide rétinoïque alpha

RAS : Système rénine-angiotensine (de l'anglais « *renin-angiotensin system* »)

RBPJ : Protéine recombinante de liaison à la calvitie (de l'anglais « *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region* »)

RHO : Rhodopsine (de l'anglais « *rhodopsin* »)

Rock1 : Inhibiteur du Rho-Kinase

ROS : de l'anglais « *reactive oxygen species* »

RUNX1 : Facteur de transcription à domaine Runt 1 (de l'anglais « *runt-related transcription factor 1* »)

SARS-CoV-2 : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (de l'anglais « *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* »)

SCA-1 : Antigène des cellules souches 1 (de l'anglais « *stem cell antigen 1* »)

SCF : Facteur des cellules souches (de l'anglais « *stem cell factor* »)

SCI : Traumatisme de la moelle épinière (de l'anglais « *spinal cord injury* »)

SCL : Protéine de cellules souches leucémiques (de l'anglais « *stem cell leukemia* ») appelé aussi TAL1 (de l'anglais « *T-cell acute leukemia 1* »)

SCO : Sang de cordon ombilical

SDF-1 : Facteur dérivé des cellules stromales 1 (de l'anglais « *Stromal cell-derived factor 1* »)

SEC : Cellules endothéliales épuratrices (de l'anglais « *scavenger endothelial cells* »)

sGSK-3βi : Inhibiteur de la GSK-3β

SLAM : Molécule de signalisation de l'activation lymphocytaire (de l'anglais « *signaling lymphocyte activation molecule* »)

SMD : Maladie de Stargardt (de l'anglais « *Stargardt's macular dystrophy* »)

SOSD : SOS syndrome (de l'anglais « *sand of Sahara syndrom* »)

SOX2 : de l'anglais « *SRY sex determining region Y-box 2 ou SRY-box-2* »

SP : de l'anglais « *side population* »

SR : Récepteurs éboueurs (de l'anglais « *scavenger receptors* »)

SR1 : de l'anglais « *Stem-Reginin1* »

SRB1 : Récepteurs éboueurs classe B type 1 (de l'anglais « *scavenger receptor class B type 1* »)

SSEA : Antigènes embryonnaires spécifiques (de l'anglais « *stage-specific embryonic antigen* »)

STAB2 : de l'anglais « *Stabilin 2* »

SVF : Sérum de veau foetal

T-box : Famille des T-box

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène (de l'anglais « *tissue plasminogen activator* »)

T1DM : Diabète mellitus de type 1 (de l'anglais « *type 1 diabetes mellitus* »)

TA : Tunique adventice

TAL1 : Leucémie lymphoblastique aiguë T (de l'anglais « *T-cell acute leukemia 1* »)

TALENS : de l'anglais « *transcription activator-like effector nucleases* »

TBX3 : de l'anglais « *T-box transcription factor 3* »

TCR : Récepteur des cellules T (de l'anglais « *T cell receptor* »)

TEER : Résistance électrique transépithéliale/endothéliale (de l'anglais « *trans-endothelial electrical resistance* »)

TEH : Transition endothéliale-hématopoïétique

TEK : Tyrosine kinase endothélial (de l'anglais « *TEK tyrosine kinase, endothelial* ») appelé aussi TIE2

TF : Facteur tissulaire

TFCP2L1 : de l'anglais « *transcription factor CP2 like 1* »

TGF-β : Facteur de croissance transformant (de l'anglais « *tumor/transforming growth factor* »)

TI : Tunique intima ou interne

TIE-2 : de l'anglais « *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* »)

TM : Tunique media ou moyenne

TNF-α : Facteur de nécrose tumorale alpha (de l'anglais « *tumor necrosis factor* »)

TPO : Thrombopoïétine

TRA : de l'anglais « *tumor rejection antigen-1* »)

Transporteurs ABC : Transporteurs ATP-dépendants (de l'anglais « *ATP-binding cassette transporter* »)

TxA₂ : Thromboxane A2

UM171 : UM pour « *Université de Montréal* »

VCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (de l'anglais « *vascular cell adhesion protein 1* ») appelé aussi CD106

VE-cadhérine : Cadhérine endothéliale vasculaire (de l'anglais « *VE vascular endothelium-cadherine* ») appelé aussi CD144

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire (de l'anglais « *vascular endothelial growth factor* »)

VEGFR : Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (de l'anglais « *vascular endothelial growth factor receptor* »)

VLA : Antigène très tardif (de l'anglais « *very late antigen* »)

vWF : von Willebrand

WNT : Site d'intégration sans aile (de l'anglais « *wingless* et *integration site* »)

WT : Contrôle (de l'anglais « *wild type* »)

ZO-1 : du latin « *zonula occludens 1* »

α -SMA : Actine du muscle lisse α OU SMA- α : actine du muscle lisse α (de l'anglais « *alpha smooth muscle actin* »)

Avant-propos

Cette année marque le 22ème anniversaire de l'isolement des premières cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) et le 13ème anniversaire de la reprogrammation des premières cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites humaines (CSPih). Au cours de ces années, les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh), CSEh et CSPih, se sont positionnées comme une alternative aux cellules primaires humaines pour la recherche fondamentale, la découverte de nouveaux médicaments ou la thérapie cellulaire grâce à leur capacité d'auto-renouvellement indéfini et de différenciation en tout type cellulaire.

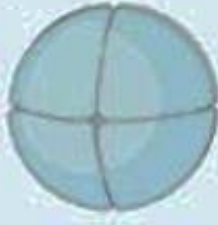
Parmi les lignages cellulaires dérivées à partir des CSPh, on trouve les cellules endothéliales (CE) et les cellules hématopoïétiques. Les premières recouvrent l'intérieur des vaisseaux sanguins tandis que les secondes forment les cellules sanguines, bien que certaines fassent également partie de tissus et d'organes. Les deux lignages assurent le transport de l'oxygène et des nutriments vers les tissus de l'organisme en plus de participer à l'hémostase et à la réponse immunitaire. Au cours de l'embryogenèse, le développement, proche dans l'espace et le temps, des CE et hématopoïétiques, a conduit à l'hypothèse de l'existence d'un progéniteur mésodermique commun aux deux lignages, l'hémangioblaste. Cependant, les protocoles actuels de différenciation endothéliale et hématopoïétique des CSPh, génèrent les deux lignages indépendamment.

Dans ce travail, j'ai étudié la différenciation d'un progéniteur avec des caractéristiques propres à l'hémangioblaste à partir des CSPh *in vitro*. Son isolement m'a permis de générer des populations fonctionnelles entièrement endothéliales ou hématopoïétiques. Outre les applications en médecine régénérative de ces deux types cellulaires pour le traitement des maladies cardiovasculaires ou hématologiques, un tel progéniteur pourrait permettre l'établissement de modèles multicellulaires complexes *in vitro*, tels que les organoïdes. Les CE sont des cellules clés pour la vascularisation de ces entités et, avec les cellules hématopoïétiques, elles jouent un rôle fondamental dans l'organogénèse. L'établissement d'un progéniteur bipotent, facilite la dérivation des ces deux lignages *in vitro* à partir d'un seul protocole de différenciation.

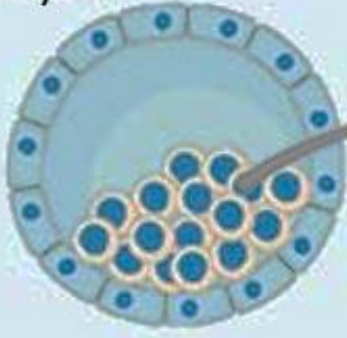
Tout au long de l'introduction bibliographique de ce manuscrit, j'aborderai les progrès réalisés dans la dérivation des CSPh depuis leur découverte et leurs applications. Je ferai un récapitulatif également le développement embryonnaire et les fonctions assurées par l'endothélium et les cellules hématopoïétiques chez l'homme. Enfin, je terminerai par les progrès obtenus à ce jour dans la dérivation de ces deux lignages à partir des CSPh, leurs applications et les défis qui restent à surmonter pour leur application en thérapie cellulaire.

INTRODUCTION

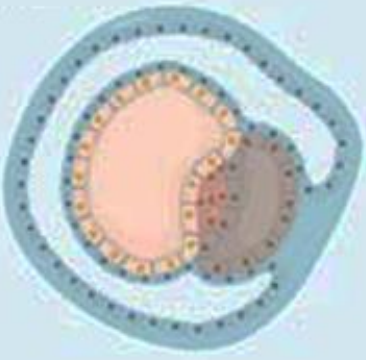
Morula



Blastocyste



Gastrula



Embryon



CHAPITRE I
LES CELLULES
SOUCHES

Chapitre I : Les cellules souches

1.1. Introduction

Le désir de devenir immortel a accompagné l'être humain depuis son existence, marqué par le déclin du corps, destiné à une mort certaine dès la naissance. Cette question, loin d'être exclusivement philosophique, a interpellé les biologistes depuis des siècles au point de chercher à comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement et la régénération des êtres vivants. Aujourd'hui, les avancées dans ce domaine de recherche pourraient être les clés de la guérison des maladies grâce à la médecine dite régénérative que nous approfondirons dans ce chapitre et tout au long de ce manuscrit.

Durant le développement embryonnaire chez l'homme et chez les autres mammifères, la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde génère une cellule-œuf ou zygote avec la capacité d'engendrer tous les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (e.g. le placenta) nécessaires à la formation d'un organisme. Cette faculté exceptionnelle à générer tous les types de cellules d'un individu diminue au cours du développement de l'embryon. À la fin de la gestation, le fœtus possède un nombre réduit de cellules capables de générer un nombre limité de lignages cellulaires. Cependant, loin de disparaître à l'âge adulte, ces cellules sont responsables du renouvellement des tissus et de leur régénération lors d'une blessure. Quelles sont ces cellules et comment sont-elles devenues l'avenir de la médecine, seront les questions traitées dans ce chapitre.

1.2. Les cellules souches embryonnaires et adultes

En 2005, une étude réalisée par Spalding et collègues a révélé que l'âge moyen des organes (à l'exception du cerveau) d'un individu adulte, d'environ 35 ans, pouvait se situer entre 10 et 16 ans (Spalding et al., 2005). Cette différence d'âge est attribuée au renouvellement en continu des tissus adultes (connu sous le nom de « *tissue turnover* » en anglais) et dépend du type cellulaire. Ainsi, par exemple, les cellules épithéliales de l'intestin ont une espérance de vie moyenne de 5 jours, alors que les globules rouges ont une durée de vie moyenne de 3 mois. L'homéostasie tissulaire assure l'équilibre entre les processus de mort cellulaire, de prolifération, de croissance, de différenciation et de migration cellulaire des tissus assurant ainsi le bon fonctionnement des organes, ceci par l'intermédiaire des cellules souches.

Les cellules souches sont définies par leur potentiel exceptionnel à la fois de s'auto-renouveler et de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires spécialisés. L'auto-renouvellement est essentiel pour la conservation de la population souche dans l'organisme. Il s'effectue soit par division cellulaire symétrique dont les deux cellules filles conservent le potentiel souche, soit par division

asymétrique donnant lieu à une cellule fille souche et une cellule fille différenciée. Leur potentiel de différenciation vers un ou plusieurs lignages cellulaires contribue à la formation et/ou régénération partielle ou total des tissus et des organes.

Durant le développement embryonnaire, le zygote est la première cellule souche dite totipotente. Il a la particularité de générer tous les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires nécessaires pour engendrer un organisme vivant. Cette capacité est maintenue par les cellules filles, les blastomères, lors de la division cellulaire jusqu'au stade de 8 cellules chez les embryons de

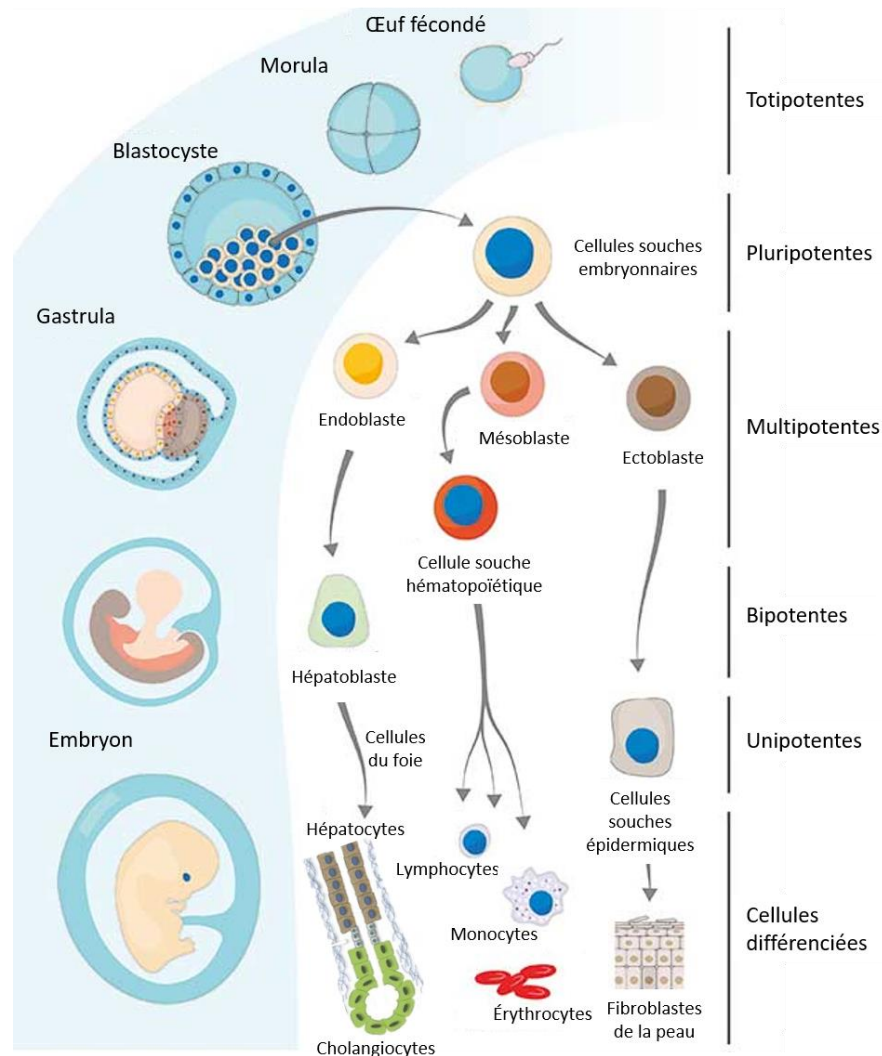


Figure 1. Les cellules souches embryonnaires et adultes. Chez l'embryon, l'œuf fécondé et les premières cellules dérivés de cet œuf (blastomères) jusqu'au stade morula ont la capacité de générer tous les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. C'est la raison pour laquelle ces cellules sont aussi appelées cellules souches totipotentes. Au stade blastocyste, les cellules de la masse cellulaire interne (MCI) donnent lieu exclusivement aux tissus embryonnaires. Il s'agit des CSP qui peuvent être aussi maintenues *in vitro* sur la forme de cellules souches embryonnaires (CSE). Toutes les deux, MCI et CSE, se différencient vers les trois feuillettes embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Ces cellules multipotentes embryonnaires vont générer tous les tissus du corps humain. Au stade embryonnaire ainsi qu'au stade adulte, des cellules souches multipotentes (*e.g.* les cellules souches hématopoïétiques), bipotentes (*e.g.* les hépatoblastes) et unipotentes (*e.g.* les cellules souches épidermiques) vont générer plusieurs, deux ou un type cellulaire, respectivement qui vont acquérir les caractéristiques des cellules différenciées nécessaires pour le bon fonctionnement des tissus et des organes. Figure adaptée du site web *Enzo life sciences* dédié aux cellules souches.

primates ou au stade de 16 cellules chez les embryons de souris (Kelly, 1977). Après les clivages successifs de l'embryon, la compaction initie une première différenciation du blastocyste en deux populations cellulaires : le trophoctoderme et la masse cellulaire interne (MCI). Le trophoctoderme, constitué par les cellules périphériques du blastocyste, forme les tissus extra-embryonnaires tel que le placenta et le cordon ombilical. La MCI donne naissance *in vivo* aux trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme à l'origine de tous les tissus d'un organisme adulte. Elle a alors un potentiel transitoire de différenciation, plus limité que le zygote, réduit aux cellules des tissus embryonnaires. Cette propriété de pluripotence est très rapidement perdue *in vivo* au cours du développement et donne lieu à l'apparition de cellules souches multipotentes, bipotentes et unipotentes avec des potentiels de différenciation restreints à un ou plusieurs types cellulaires, respectivement, assurant ainsi la formation des tissus embryonnaires, le maintien et la régénération des tissus adultes (Figure 1).

1.3. Les cellules souches pluripotentes

Depuis la découverte des cellules souches totipotentes et pluripotentes et en vertu de leurs propriétés exceptionnelles, la génération des tissus et des organes humains *in vitro* pour différentes applications a été rapidement envisagé. À ce jour, les propriétés totipotentes du zygote ne peuvent pas être maintenues indéfiniment en culture. Cependant, les cellules souches pluripotentes (CSP) sont devenues un outil clé en recherche fondamentale, pour la découverte de médicaments et elles ont ouvert la voie vers une médecine personnalisée et régénérative.

Au cours de la deuxième partie du XXe siècle, l'isolement des tératocarcinomes (tumeurs dérivées à partir des cellules germinales), aussi dits carcinomes embryonnaires, s'est montré décisif pour l'étude et la caractérisation des cellules pluripotentes (Stevens, 1958, 1970). Ces expériences ont permis d'établir les conditions nécessaires pour l'isolement et la culture infinie *in vitro* de la MCI d'embryons préimplantatoires de souris au stade de blastocyste (Evans and Kaufman, 1981). Quelques années plus tard, ces techniques ont été extrapolées à des embryons de primates, permettant la culture *in vitro* des premières lignées de cellules souches embryonnaires (CSE) de macaques rhésus (Thomson et al., 1995) et humaines (Thomson et al., 1998a). La problématique éthique inhérente à l'utilisation de CSE humaines (CSEh) ainsi que les études sur le clonage et les mécanismes responsables de la pluripotence ont débouché à la reprogrammation de cellules somatiques murines en 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006) et des cellules somatiques humaines en 2007 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) en CSP. Ces études ont montré que la surexpression temporelle de seulement quatre facteurs de transcription liés à la souche tels que OCT4 (de l'anglais « *octamer-binding transcription factor 4* » ou POU5F1), SOX2 (« *sex determining region Y-*

box 2 »), c-MYC (de l'anglais « *myelocytomatosis oncogene* ») et KLF4 (de l'anglais « *kruppel-like factor 4* ») chez la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006) et l'homme (Takahashi et al., 2007) ou OCT4, SOX2, NANOG (de l'irlandais "*land of the young*") et LIN28 (de l'anglais « *abnormal cell LI*Neage ») chez l'homme (Yu et al., 2007) sont suffisants pour conférer la pluripotence aux cellules adultes différenciées.

Par la suite, d'autres méthodes pour dériver des CSP *in vitro* ont été développées et sont résumées dans la Figure 2. Des cellules germinales embryonnaires ont été obtenues à partir de la culture *in vitro* de cellules germinales primordiales (CGP), les précurseurs embryonnaires des spermatozoïdes et des ovules. Les CGP ont été isolées à partir des embryons de souris à jour 8.5 après l'accouplement (dpc du latin *dies post coitum*) (Matsui et al., 1992) et à partir des embryons humains de 5 à 9 semaines après la fécondation (Shamblott et al., 1998). Les cellules souches germinales chez les mâles adultes ou spermatogonies, ont également permis l'obtention d'une population avec des caractéristiques propres aux CSE à partir des biopsies de testicules de souris (Kanatsu-Shinohara et al., 2004) et des testicules humains (Kossack et al., 2009). De plus, le développement *in vitro* d'embryons préimplantatoires de souris (Lin et al., 2003) et humains (Lin et

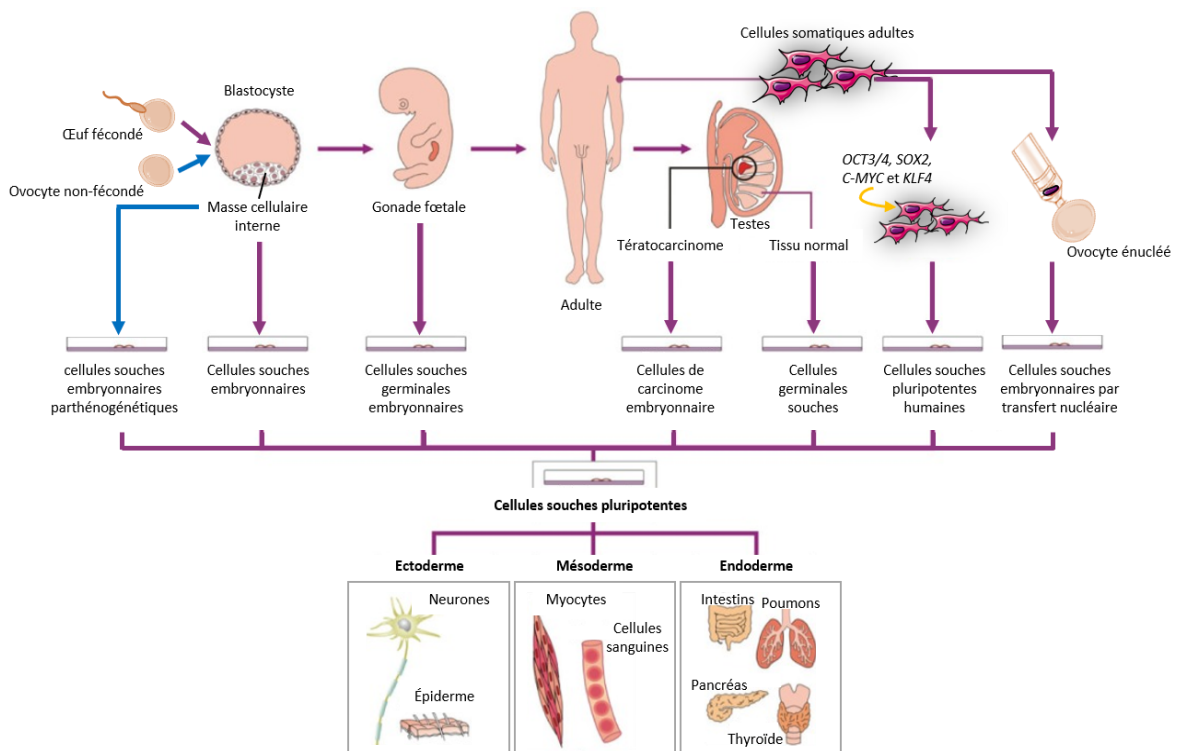


Figure 2. Méthodes pour la production des cellules souches pluripotentes (CSP). Les cellules souches embryonnaires (CSE) peuvent être générées à partir de la masse cellulaire interne (MCI) des blastocystes dérivés d'un œuf fécondé (CSE) ou d'un ovocyte non-fécondé (CSE parthénogénétiques). Les cellules souches germinales embryonnaires ou adultes peuvent générer *in vitro* des cellules souches germinales embryonnaires ou des cellules germinales souches, respectivement. Les tératocarcinomes ou tumeurs d'origine germinale sont aussi une source des CSP, dites cellules de carcinome embryonnaire. Finalement, les cellules somatiques adultes peuvent être reprogrammées en CSP grâce à la surexpression des facteurs de transcription liés à la soucitude ou par transfert nucléaire dans des ovocytes énucléés. Figure modifié et traduite de *Swelstad & Kerr 2009*.

al., 2003; Revazova et al., 2007) à partir des ovocytes non fécondés ont permis l'isolement des CSP dites parthénogénétiques. Finalement, le transfert nucléaire somatique dans un ovocyte bloqué en métaphase II de la méiose et énucléé est devenu une alternative à la reprogrammation des cellules somatiques (e.g. fibroblastes) en CSP (Tachibana et al., 2013).

1.3.1. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes

La grande variété de méthodes utilisées aujourd'hui pour générer des CSP (Figure 2) requiert la distinction précise de ce qui est une cellule pluripotente. Pour cela, des tests *in vitro* et *in vivo* ont été mis en place pour caractériser les nouvelles lignées de CSP humaines. Chez l'homme, les tests *in vitro* sont basés sur la détection des marqueurs dits de la pluripotence, tel que l'activité de l'enzyme phosphatase alcaline (Henthorn et al., 1988), en particulier l'isoforme placentaire, l'expression des antigènes embryonnaires spécifiques glycolipidiques SSEA-3 et SSEA-4 (de l'anglais « *stage-specific embryonic antigen* »), d'antigènes de sulfate de kératine TRA-1-60 et TRA-1-81 (de l'anglais « *tumor rejection antigen-1* ») ainsi que l'absence de SSEA-1, et l'expression des facteurs de transcription NANOG, SOX2 et OCT4 (Adewumi et al., 2007; Martí et al., 2013).

Le potentiel de différenciation vers les trois feuillets embryonnaires est évalué *in vitro* par la formation des corps embryoïdes (EB de l'anglais « *embryoid bodies* ») et *in vivo*, grâce à la formation de tératomes (tumeurs composées des dérivés des trois feuillets embryonnaires) chez des souris immunodéficientes.

A la différence des CSEh, les CSE murines (CSEm) sont également testées pour leur contribution à la formation de chimères *in vivo* (interdite chez l'homme pour des raisons éthiques) une fois microinjectées dans des blastocystes murins diploïdes (Bradley et al., 1984) ou tétraploïdes (Nagy et al., 1993) au stade préimplantatoire. Dans ce dernier cas, la contribution des blastocystes tétraploïdes est limitée aux tissus extra-embryonnaires et l'embryon se développe presque entièrement à partir de CSEm greffées (Nagy et al., 1993).

1.3.2. L'état pluripotent naïf et amorcé

Pendant plusieurs années les tests *in vitro* et *in vivo* ont permis de valider la pluripotence des CSP, néanmoins, en 2007 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007) la dérivation de cellules embryonnaires à partir d'épiblastes de souris au stade postimplantatoire a remis en question la pluripotence des CSEh. La MCI des blastocystes de mammifère se différencie dans l'embryon préimplantatoire en deux populations : l'épiblaste et l'endoderme primitif qui, une fois implantés dans l'utérus, donneront respectivement naissance aux trois feuillets embryonnaires et au sac vitellin (Figure 3). De manière remarquable, les cellules embryonnaires murines obtenues à partir de

l'épiblaste postimplantatoire (CSEpi) sont différentes des CSEm dérivées de la MCI ou des épiblastes avant leur implantation dans la paroi utérine et pourtant, elles présentent des caractéristiques plus proches aux CSEh (Tableau 1) (De Los Angeles et al., 2015; Weinberger et al., 2016). Les CSEm ont

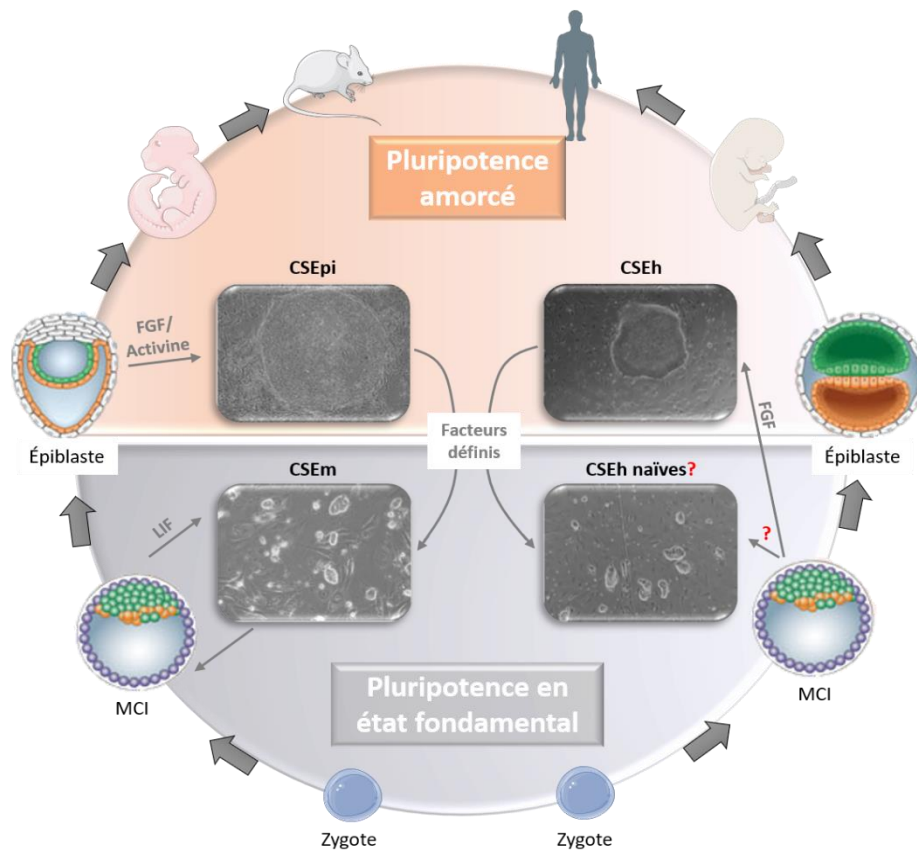


Figure 3. Etat fondamental de la pluripotence. Les cellules souches embryonnaires (CSE) de souris (CSEm) sont générées à partir de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste et sont maintenues *in vitro* grâce à l'addition du LIF (+ sérum de veau fœtal ou + des inhibiteurs de ERK et GSK3). Elles présentent une morphologie compacte et sont considérées des cellules en état fondamental ou naïf. Au contraire, les CSE dérivées de l'épiblaste au stade postimplantatoire (CSEpi) correspondent aux CSP amorcées, dépendent du FGF et de l'Activine pour s'auto-renouveler, leur morphologie est aplatie et moins dense. Du côté humain, seulement les CSE humaines (CSEh) ont été générées à partir de la MCI. Il existe un grand débat sur leur état de pluripotence, mais en raison de leur ressemblance aux CSEpi et des dernières études qui montrent la possibilité de diriger les CSEh vers un état de pluripotence naïf en utilisant des facteurs définis, les CSEh sont considérées aujourd'hui des cellules en état amorcé. Figure inspirée du site web de *Theunissen Lab* dédié à la pluripotence (<https://theunissenlab.wustl.edu/research/>). Les images des CSE au microscope inversé appartiennent à *De los Angeles et al. 2018*.

une morphologie sphérique et compacte (Evans and Kaufman, 1981; Tesar et al., 2007) (Figure 3), une forte capacité clonogénique et leur maintien en état pluripotent *in vitro* dépend de la présence du facteur inhibiteur de la leucémie (LIF, de l'anglais « leukemia inhibitor factor ») (Williams et al., 1988) complétée soit avec du sérum soit avec des inhibiteurs de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3, de l'anglais « glycogen synthase kinase 3 ») et de la voie ERK (de l'anglais « extracellular signal-regulated kinases ») (ces conditions sont aussi connues comme 2i/LIF) (Ying et al., 2008). Des études transcriptomiques et épigénétiques ont confirmé que, la MCI et les CSEm dérivées

d'embryons femelles (XX) conservent les deux chromosomes X activés (Schulz et al., 2014), présentent un génome hypo-méthylé (souvent lié à l'activation des gènes) (Leitch et al., 2013) et survivent même en l'absence de méthyltransférases (Geula et al., 2015). Elles privilégient les éléments amplificateurs (en anglais « *enhancers* ») distaux pour le contrôle de l'expression du facteur de transcription OCT4 (Yeom et al., 1996) et expriment les facteurs de transcription dits naïfs tel que KLF4, KLF2, ESRRB (de l'anglais « *estrogen related receptor beta* »), TFCP2L1 (de l'anglais « *transcription factor CP2 like 1* »), TBX3 (de l'anglais « *T-box transcription factor 3* ») et GBX2 (de l'anglais « *gastrulation brain homeobox 2* ») (Dunn et al., 2014).

Au contraire, les colonies de CSEpi sont aplaties et moins denses (Figure 3). Elles sont cultivées en présence du facteur de croissance des fibroblastes (FGF de l'anglais « *fibroblast growth factor* ») et d'Activine (ou Nodal) et génèrent difficilement de colonies à partir de cellules isolées (Tesar et al., 2007). Comme dans l'épiblaste implanté dans l'utérus, les CSEpi ont un des chromosomes X inactivé, un génome hyper-méthylé et ne tolère pas la perte des méthyltransférases (Geula et al., 2015). L'expression d'OCT4 est sous le contrôle d'amplificateurs proximaux (Tesar et al., 2007; Yeom et al., 1996) et les facteurs de transcription naïfs sont exprimés très faiblement. De plus, les CSEpi sont très inefficaces dans la formation de chimères *in vivo* lorsqu'elles sont micro-injectées dans des épiblastes préimplantatoires et ne contribuent pas à la formation des cellules germinales. Pour toutes ces raisons, les CSEpi sont considérées comme des CSP en état amorcé (de l'anglais « *primed* »), autrement dit, ces cellules pourraient être prédisposées à la différenciation cellulaire en opposition aux CSEm, des CSP en état naïf (de l'anglais « *naive* ») ou en état fondamental (de l'anglais « *ground state* »). Ces deux états de pluripotence peuvent être générés indifféremment à partir de CSEm ou de CSEpi, *in vitro* (Hanna et al., 2009a). Les CSEpi et les cellules directement provenant d'épiblastes postimplantatoires, cultivées dans des conditions naïves (2i/LIF), adoptent un phénotype correspondant à l'état fondamental tandis que les CSEm rentrent à l'état amorcé, si elles sont cultivées dans des conditions d'induction (FGF2/Activine).

Chez l'homme, les CSEh présentent de nombreuses caractéristiques similaires aux CSEpi de souris, telles que leur morphologie, l'état de méthylation de l'ADN et la mort cellulaire induite par la perte de la DNA méthyltransférase DNMT1 (de l'anglais « *ADN-méthyltransférase 1* ») (Liao et al., 2015), la clonogénicité, les amplificateurs OCT4 proximaux et l'inactivation d'un chromosome X. En outre, le renouvellement des CSEh est dépendant du FGF2 exogène. Quant à leur contribution à la formation des embryons chimères, les CSEh ne peuvent pas être greffées dans les épiblastes humains pour des raisons éthiques. Certaines études ont injecté des CSEh dans des embryons de souris. Toutefois, les résultats n'ont pas été concluants, car l'absence de chimérisme peut être attribuée aux différences du développement embryonnaire entre la souris et l'homme (Figure3, Tableau 1). Ainsi

toutes ces similitudes entre CSEh et les CSEpi, suggèrent que les CSEh correspondent à un état de pluripotence amorcée similaire au stade d'épiblaste postimplantatoire humain, même si elles ont été générées à partir de la MCI des blastocystes. Pour confirmer cette hypothèse et en raison de l'impossibilité d'obtenir des cellules humaines de l'épiblaste implanté dans l'utérus, divers laboratoires ont essayé d'amener les CSEh à un état fondamental tel qu'il a été précédemment fait avec des CSEpi. Pour cela, ils ont surexprimé des couples de facteurs de transcription liés à la pluripotence chez les CSEh (OCT4 et KLF4 ; KLF2 et KLF4 ou KLF2 et NANOG) dans des conditions de culture 2i/LIF (les conditions 2i/LIF seules ne permettent pas de cultiver des CSE naïves) (Hanna et al., 2010; Weinberger et al., 2016). D'autres équipes, ont choisi des méthodes sans modification génétique où les CSEh sont cultivées en présence de 2i/LIF avec des combinaisons des inhibiteurs de la p38, des kinases Jun N-terminal, de la protéine kinase C atypique, de la protéine kinase associée à RHO (de l'anglais « *rhodopsin* ») (Gafni et al., 2013) et de faibles doses de FGF2 et TGFβ1 (de l'anglais « *tumor/transforming growth factor* » ou Activine A). Ces méthodes et d'autres similaires, loin de conclure le débat sur l'état de la pluripotence des CSEh, ont souligné le fait que les conditions de culture peuvent modifier l'état de la pluripotence *in vitro* et même créer des états artificiels qui n'ont pas un équivalent dans le développement embryonnaire. Des études transcriptomiques, au niveau unicellulaire, ont montré la grande hétérogénéité présente dans les cultures de CSEh selon la méthode employée, avant et après avoir induit l'état naïf, avec des cultures où les deux états coexistent (Yan et al., 2013). Ils ont aussi identifié des CSEh avec des caractéristiques à la fois naïves et amorcées qui pourraient représenter des états transitoires entre les cellules naïves et amorcées. Par ailleurs, la comparaison entre les CSEh et les CSEpi a également souligné les différences inter-espèces telles que les mécanismes responsables de l'inactivation du chromosome X (Vallot et al., 2013) et la tolérance à la perte de certaines méthyltransférases à l'état amorcé dans les CSEh (Liao et al., 2015), ou l'expression de certains facteurs naïfs dans les CSEh (e.g les CSEh naïves ne semblent pas exprimer de forts niveaux de KLF2). Les analyses transcriptomiques ont aussi confirmé que les CSEh sont plus similaires aux MCI humaines qu'aux CSEpi (Yan et al., 2013).

Aujourd'hui les études sur les états de pluripotence vont au-delà de la recherche fondamentale sur les mécanismes du développement de l'embryon et cherchent à améliorer les techniques actuelles de différenciation *in vitro* à partir des CSP. Les CSP naïves pourraient offrir une différenciation plus efficace par rapport aux cellules amorcées et contribuer à éliminer complètement les marques épigénétiques des CSP dérivées des cellules somatiques. Cependant, l'absence d'une référence des cellules naïves *in vivo* chez l'homme, l'hétérogénéité des CSEh résultant de la grande diversité de techniques de culture, l'absence de modèles de chimérisme *in vivo* pour les CSEh et la méconnaissance des effets secondaires possibles dans le maintien prolongé *in*

in vitro d'un état normalement transitoire et instable *in vivo* (l'état naïf *in vivo* pourrait être plus génétiquement instable), font que les CSP amorcées restent encore la source privilégiée des CSP pour la différenciation *in vitro* de diverses lignées cellulaires (Davidson et al., 2015; De Los Angeles et al., 2015; Weinberger et al., 2016).

Tableau 1. Caractéristiques principales des cellules souches embryonnaires murines (CSEm) et humaines (CSEh), et des cellules souches épiblastiques murines (CSEpi).

	CSEm	CSEpi	CSEh
<i>Tissu d'origine</i>	MCI (3.5-4.5 dpc)	Epiblaste (5.5-7.5 dpc)	MCI (5-7 dpc)
<i>État de la pluripotence</i>	Naïf	Amorcé	Amorcé
<i>Cytokines de maintenance</i>	LIF + sérum ou LIF + inhibiteurs d'ERK et du GSK3	FGF/Activin	FGF
<i>Morphologie des colonies</i>	Sphériques et compactes	Aplaties et peu compactes	Aplaties et peu compactes
<i>Clonogénicité</i>	Elevée	Faible	Faible
<i>Inactivation du chromosome X</i>	Non	Oui	Oui
<i>Niveaux de méthylation de l'ADN</i>	Hypométhylation	Hyperméthylation	Hyperméthylation
<i>Amplificateur du Oct3/4</i>	Distal	Proximal	Proximal
<i>Facteurs de transcription naïfs</i>	Exprimés	Réprimés	Réprimés
<i>Différenciation in vitro</i>	Oui	Oui	Oui
<i>Formation de tératomes in vivo</i>	Oui	Oui	Oui
<i>Génération des chimères germinales</i>	Oui	Non	-
<i>Résistance à la perte de méthyltransférases</i>	Oui	Non	Non

1.3.3. Les cellules souches pluripotentes induites

En 2007, pour la première fois, une équipe japonaise (Takahashi et al., 2007) et une équipe américaine (Yu et al., 2007) ont réussi à reprogrammer des fibroblastes humains de différentes origines (fibroblastes du derme, du tissu synovial et de poumon) en cellules pluripotentes. Ces cellules, depuis connues sous le nom de cellules souches pluripotentes induites humaines (CSPih), ont été créées grâce à la surexpression de quatre facteurs de reprogrammation liés à la pluripotence, OCT4, SOX2, C-MYC et KLF4 (Takahashi et al., 2007) ou OCT4, SOX2, NANOG et LIN28 (Yu et al., 2007), par transduction avec des vecteurs intégratifs. Ces études ont démontré que comme les CSEh, les CSPih expriment les antigènes glycolipidiques SSEA-3 et SSEA-4 ainsi que les antigènes de sulfate de kératane TRA-1-60 et TRA-1-81 et elles ont une activité télomérase élevée. De plus, les CSPih ont une morphologie similaire à celle des CSEh, une croissance exponentielle et la capacité de former des types cellulaires dérivés des trois feuilletts embryonnaires *in vitro* (par la formation d'EB) et *in vivo* (par la formation de tératomes). Le profil de méthylation de l'ADN des CSPih ressemble davantage à celui des CSEh, ce qui suggère que la reprogrammation comprend une réforme épigénétique pour acquérir des fonctionnalités pluripotentes (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

1.3.3.1. Etapes de la reprogrammation

Bien que les premières études sur la CSPih aient montré une grande similitude entre ces cellules et celles dérivées de la MCI, certaines équipes ont signalé des différences significatives entre ces deux types de CSPh, notamment en ce qui concerne le transcriptome (Chin et al., 2009), la méthylation de l'ADN (Deng et al., 2009) et la capacité de différenciation (Kim et al., 2011; Takahashi and Yamanaka, 2016). Cependant, d'autres études portant sur un nombre plus important de CSPih (>50) ont confirmé que les cellules reprogrammées sont très difficilement distinguables des CSEh (Bock et al., 2011; Guenther et al., 2010; Yamanaka, 2012).

La reprogrammation des cellules somatiques est, un général, un processus très inefficace où seulement environ 1% des cellules initiales deviennent des CSPih (Singh et al., 2015; Takahashi and Yamanaka, 2016). Malgré les connaissances limitées sur les mécanismes qui régissent la reprogrammation cellulaire, aujourd'hui il est admis que cette inefficacité est due au fait que la principale étape de ce processus est stochastique (Hanna et al., 2009b). Ainsi, la reprogrammation des cellules somatiques commence par la surexpression de facteurs exogènes conduisant à des événements aléatoires tels que, l'inhibition de l'histone méthyltransférase de la lysine DOTL1 (de l'anglais « *disruptor of telomeric silencing 1-like* ») (Mikkelsen et al., 2008; Onder et al., 2012), la répression des gènes spécifiques du lignage, la transition mésenchymateuse-épithéliale (Li et al., 2010) et l'activation du métabolisme basé sur la glycolyse au détriment de la phosphorylation

Tableau 2. Exemples des facteurs et molécules chimiques capables de remplacer les facteurs originaux utilisés par l'équipe de Yamanaka pour reprogrammer les cellules somatiques en CSPih. Traduit et complété de Singh et al., 2015.

Facteur/petite molécule	Fonction	Facteur qui remplace	Ref.
<i>NANOG</i>	Facteur de transcription spécifique des ESC	Avec LIN28, il remplace K et M	Yu et al., 2007
<i>LIN28</i>	Protéine de liaison à l'ARN	Avec NANOG, il remplace K et M	Yu et al., 2007
<i>L-MYC or N-MYC</i>	Proto-oncogènes. Facteurs de transcription liées à la prolifération cellulaire	M	Nakagawa et al., 2010
<i>SV40 LT (T)</i>	Antigène large T du virus simien 40 (SV40)	K ; M*, LIN28, NANOG	Mali et al., 2008 Medvedev et al., 2010
<i>BIX-01294</i>	Petite molécule. Inhibiteur de l'histone méthyltransférase G9a	S, M	Shi et al., 2008 Medvedev et al., 2010
<i>VPA</i>	Petite molécule. Inhibiteur de l'histone désacétylase	K, M	Huangfu et al., 2008
<i>YAP</i>	Activation de la voie de signalisation Hippo-Yap	K, M	Zhao et al., 2017
<i>TCL-1A</i>	La protéine 1A de la leucémie/lymphome à cellules T. Promu la prolifération cellulaire	O, K	Picanço-Castro et al., 2010
<i>GLIS1</i>	Facteur de transcription enrichi en ovocytes fécondés et non fécondés	M	Maekawa et al., 2011
<i>CHIR99021</i>	Petite molécule. Inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3	Avec <i>Parnate</i> , il remplace S et M	Li et al., 2009
<i>Parnate</i>	Petite molécule. Inhibiteur de la déméthylase spécifique de la lysine 1	Avec <i>CHIR99021</i> , il remplace S et M	Li et al., 2009

O: OCT4 ; S: SOX2 ; K: KLF4 ; M: c-MYC, M*: N-MYC

oxydative des cellules somatiques (Folmes et al., 2011). Au cours de cette étape, l'expression des gènes induits par le stress augmente également et par conséquent, la sénescence et l'apoptose des cellules, bloquent la reprogrammation (Banito et al., 2009). À la fin de cette étape, seules les cellules ayant acquis toutes les transformations mentionnées ci-dessus et ayant échappé à la mort cellulaire poursuivront le processus de reprogrammation (Takahashi and Yamanaka, 2016). La deuxième étape considérée comme déterministe commence une fois que les gènes endogènes associés à la pluripotence (*e.g.* *SOX2*, *ESRRB*, *NANOG*, *OCT3/4*, etc.) sont exprimés (≈ 10 jours après la transduction des cellules) (Stadtfield et al., 2008a). Les événements qui se produisent à ce stade sont liés à la maturation de l'état pluripotent, tels que l'élongation des télomères chromosomiques (Maherali et al., 2008; Takahashi et al., 2007), la déméthylation des histones (Wang et al., 2011) et de l'ADN. Dans le cas des CSPi de souris ou des CSPih générées dans des conditions naïves, la réactivation du chromosome X constitue également un phénotype clé de la pluripotence (Barakat et al., 2015; Maherali et al., 2007). Bien qu'à la fin de la première étape, on puisse distinguer des colonies de CSPih similaires aux CSEh, une interruption de la reprogrammation à ce stade peut générer des CSPih partiellement programmées aussi dites pré-CSPih (Desprat et al., 2014; Tanabe et al., 2013).

Afin d'améliorer la reprogrammation des cellules somatiques en CSPi, plusieurs facteurs moléculaires et chimiques ont été combinés avec les facteurs utilisés par Yamanaka ou en remplacement d'un ou de plusieurs d'entre eux (Ebrahimi, 2015). Il s'agit, entre autres, des inhibiteurs d'histones méthyltransférases (Medvedev et al., 2010; Shi et al., 2008) ou des histones désacétylases (Huangfu et al., 2008) et des inducteurs des histones déméthylases (*e.g.* Vitamine C) (Wang et al., 2011) (Tableau 2).

Grâce aux études préliminaires de reprogrammation des fibroblastes chez la souris et à leur facile isolement et culture *in vitro*, les premières cellules somatiques humaines utilisées pour la reprogrammation ont été des fibroblastes (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Cependant, dans les années qui ont suivi les publications des équipes de Yamanaka et Thomson, une grande diversité de types cellulaires ont été reprogrammées en CSPih, telles que les kératinocytes (Aasen et al., 2008), les cellules endothéliales (CE) (Féraud et al., 2016a; Haase et al., 2009), les cellules souches CD34⁺ du sang de cordon ombilical (SCO) (Loh et al., 2009; Ye et al., 2009), les cellules souches neurales (Kim et al., 2009a), les mélanocytes (Utikal et al., 2009), les cellules épithéliales amniotiques (Féraud et al., 2016a; Zhao et al., 2017), les cellules du sang périphérique (Féraud et al., 2016a; Loh et al., 2009; Seki et al., 2010), les hépatocytes (Liu et al., 2010), les cellules mésenchymateuses (Sugii et al., 2010), les cellules épithéliales rénales prélevées dans l'urine (Zhou et al., 2012) et les astrocytes (Ruiz et al., 2010), entre autres (Tableau 3). Bien que dans tous ces cas, les CSPih obtenues répondent aux critères des CSP, certaines études ont suggéré que le potentiel de différenciation de ces cellules

pouvait être lié à leur origine somatique (Kim et al., 2010, 2011). Les CSPih pourraient se différencier préférentiellement vers la lignée somatique de départ et être moins efficace dans la différenciation vers d'autres lignages à cause des empreintes épigénétiques qui persistent même après la reprogrammation. D'autres auteurs ont attribué ces différences à la variabilité entre donneurs plutôt qu'aux types de cellules somatiques d'origine (Kajiwara et al., 2012). D'ailleurs, la reprogrammation des CSPih a été aussi démontré être indépendante de l'âge et du sexe du donneur. Ainsi, Takahashi et al. 2007 ont réussi à générer des lignées des CSPih à partir d'un donneur féminin de 36 ans et d'un donneur masculin de 69 ans (Takahashi et al., 2007). De même, Lapasset *et al.* ont réussi à reprogrammer des cellules sénescents et des cellules de centenaires (Lapasset et al., 2011). Dans tous les cas, les lignées des CSPih ont montré des télomères d'une taille similaire à celle des CSEh, suggérant la suppression des marqueurs épigénétiques du vieillissement. Aujourd'hui la question reste ouverte. Néanmoins, la reprogrammation des cellules somatiques par transfert de noyaux d'ovocytes et la dérivation des CSPih naïves pourraient permettre une étude plus approfondie sur l'existence ou non d'une mémoire épigénétique dans les CSPih.

Par ailleurs, l'origine des cellules somatiques avant leur reprogrammation en CSPi est un point important à considérer en thérapie cellulaire. En effet la source idéale de cellules somatiques doit être accessible par des méthodes non invasives. Elle doit être facile à cultiver et amplifiable *in vitro*, pour obtenir un nombre suffisant de cellules à reprogrammer dans les plus courts délais. Bien entendu, leur reprogrammation doit être efficace (Raab et al., 2014) (Tableau 4). Selon ces critères, des lignées de CSPih ont été dérivées à partir de kératinocytes extraits des follicules pileux (Aasen and Belmonte, 2010) ou à partir d'une goutte de sang (10 µl) prélevée par une piqûre au bout du doigt (Tan et al., 2014).

1.3.2.2. Challenges des CSPih vers l'application thérapeutique

Les CSPih ont contribué dans l'avancée de la recherche fondamentale mais surtout médicale. La possibilité de reprogrammer des cellules somatiques d'un patient et de les différencier vers un lignage cellulaire spécifique *in vitro* permet la réalisation de travaux à visée thérapeutique principalement en thérapie cellulaire. Les cellules souches adultes sont limités en nombre et parfois elles sont inaccessibles. Les CSPih ont contourné ces biais. De manière incontestable, les CSPih représentent une source inépuisable de cellules autologues. Néanmoins, l'utilisation de ces cellules en thérapie cellulaire dépend encore de l'amélioration des méthodes de reprogrammation, de la culture cellulaire et de la différenciation pour minimiser les dangers occasionnés par des agents externes (*e.g. virus, bactéries, etc.*) et par les cellules elles-mêmes (*i.e.* formation des tumeurs).

L'un des facteurs de reprogrammation utilisé par l'équipe de Yamanaka, l'oncogène c-MYC, a suscité un débat sur son implication dans la formation de tumeurs *in vivo* causée par sa réactivation dans les cellules différenciées greffées. L'oncogène c-MYC a été décrit comme un des acteurs principaux dans le développement de 70% des cancers humains (Kuttler and Mai, 2006). Dans des souris chimères dérivées des CSPi, 20% d'entre elles ont développé des tumeurs liées à la réactivation de *c-Myc* dans les cellules issues de cellules reprogrammées (Okita et al., 2007). C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche ont reprogrammé des cellules somatiques en absence de ce facteur de transcription au détriment de son efficacité (Nakagawa et al., 2008). D'autres équipes ont opté pour la substitution par d'autres protéines de la même famille (L-Myc) avec moins de risque tumoral (Nakagawa et al., 2010). L'addition de composés chimiques tels que les petites molécules (de l'anglais « *small molecules* »), tel que le CHIR99021 et le Parnate, s'est montrée efficace d'une part en remplaçant les facteurs oncogéniques (Huangfu et al., 2008; Medvedev et al., 2010; Shi et al., 2008) et d'autre part en évitant l'utilisation de vecteurs intégratifs (Tableau 2).

Un autre inconvénient dans la reprogrammation des CSPi est l'utilisation de rétrovirus et de lentivirus pour induire l'expression exogène de facteurs de reprogrammation. Bien qu'efficace, cette méthode présente un risque lors de leur utilisation en thérapie cellulaire et dans la modélisation des maladies *in vitro*. L'intégration aléatoire de l'ADN viral dans le génome de l'hôte peut provoquer des mutations qui aboutissent à la formation de tumeurs ou d'autres effets indésirables. Il est aussi soupçonné de pouvoir générer une réponse immunitaire chez le patient greffé. Afin de résoudre ce problème deux types de stratégies ont été adoptés. La première stratégie privilégie la reprogrammation des cellules par des méthodes non intégratives (Tableau 5, Figure 4) ou "sans empreintes" (en anglais « *footprint-free*») parmi lesquelles figurent les adénovirus (bien que l'efficacité de la reprogrammation soit d'environ 0,0002% pour les cellules humaines) (Stadtfield et al., 2008b) et le virus Sendai (Fusaki et al., 2009). Les lentivirus ont également été modifiés avec des cassettes loxP qui permettent l'excision de l'ADN viral du génome de l'hôte en présence de la cre-recombinase (Haridhasapavalan et al., 2019; Somers et al., 2010). Parmi les autres méthodes sans vecteurs viraux, on distingue les vecteurs plasmidiques épisomaux (Okita et al., 2008), les protéines recombinantes (Kim et al., 2009a), la transfection d'ARN messagers et de microARN (Warren et al., 2010), ou les PiggyBac, des transposons qui, bien qu'intégrés dans l'ADN de l'hôte, peuvent être éliminés en présence d'une transposase (Haridhasapavalan et al., 2019; Malik and Rao, 2013; Woltjen et al., 2009). La deuxième stratégie, comme cela a été illustré dans le cas de l'oncogène c-Myc, se base sur l'utilisation de petites molécules (e.g. CHIR99021, Parnate ou la vitamine C) pour reprogrammer les cellules somatiques. Récemment, une équipe a réussi à reprogrammer des fibroblastes (Hou et al., 2013), des cellules souches neurales et des cellules épithéliales de l'intestin

grêle de souris (Ye et al., 2016) en CSPi qu'en utilisant exclusivement de petites molécules (Haridhasapavalan et al., 2019; Malik and Rao, 2013).

Tableau 3. Sources des cellules somatiques humaines et les facteurs de reprogrammation utilisés pour l'obtention des CSPih. Adapté et traduit de Singh et al., 2015.

Type de cellules	Facteurs de reprogrammation	Ref.
<i>Fibroblastes</i>	OSKM / OSLN	Takahashi et al., 2007 Yu et al., 2007
<i>Keratinocytes</i>	OSKM	Aasen et al., 2008
<i>Cellules endothéliales du cordon ombilical</i>	OSLN	Haase et al., 2009
<i>Cellules CD34⁺ du sang de cordon ombilical, de la moelle osseuse ou du sang périphérique adulte.</i>	OSKM	Loh et al., 2009 Ye et al., 2009
<i>Cellules souches neurales fœtales</i>	O	Kim et al., 2009
<i>Mélanocytes</i>	OSKM / OKM	Utikal et al., 2009
<i>Cellules épithéliales amniotiques</i>	OSYap	Zhao et al., 2017
<i>Préadipocytes blancs</i>	OSKM	Sugii et al., 2010
<i>Cellules mésenchymateuses du tissu adipeux</i>	OSKM	Sugii et al., 2010
<i>Hépatocytes</i>	OSKM	Liu et al., 2010
<i>Cellules T du sang périphérique</i>	OSKM	Seki et al., 2010
<i>Astrocytes</i>	OSKM	Ruiz et al., 2010
<i>Cellules hématopoïétiques (CD34⁺) du sang périphérique</i>	OSKM	Loh et al., 2009
<i>Cellules mésangiales du rein</i>	OSKM	Song et al., 2011
<i>Cellules épithéliales rénales dans l'urine</i>	OS	Zhou et al., 2012

O: OCT4 ; S: SOX2 ; K: KLF4 ; M: c-MYC ; N: NANOG ; L: LIN28

Enfin, l'utilisation de CSPih pour des applications cliniques comporte d'autres risques qui sont partagés avec d'autres types de cellules pluripotentes et qui sont liés aux méthodes de culture *in vitro*. Ce sujet sera abordé dans la section générale des applications des cellules pluripotentes.

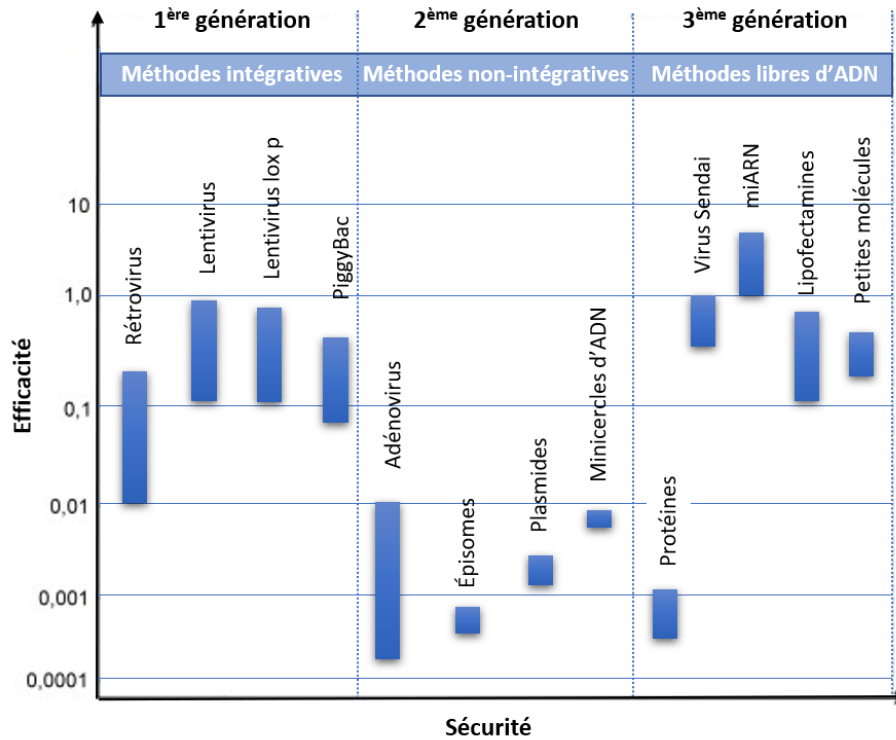


Figure 4. Méthodes pour la reprogrammation des cellules somatiques en CSPih. L'efficacité en % des cellules reprogrammées et la sécurité de ces méthodes vers l'application thérapeutique de CSPih est associée à chaque méthode décrite. Traduit de *Csobonyeiova et al. 2017*.

1.4. Applications des cellules souches pluripotentes

Le rôle actif des cellules souches dans la régénération des tissus et leurs propriétés de renouvellement et de différenciation ont suscité un grand intérêt et ont permis d'envisager leur application dans la médecine régénérative, notamment en thérapie cellulaire (Gurusamy et al., 2018). La thérapie cellulaire vise à rétablir la fonction d'un tissu ou d'un organe par la transplantation de cellules provenant du patient lui-même (transplantation autologue) ou d'un autre donneur (transplantation allogénique) (Gurusamy et al., 2018). Les cellules souches de tissus adultes ont été les premières à être utilisées à cette fin. En fait, depuis les années 1970, les cellules souches de la peau sont utilisées pour reconstruire les couches de l'épiderme des patients atteints de brûlures graves (Li and Maitz, 2018; O'Connor et al., 1981). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) isolées de la moelle osseuse et plus tard du SCO ou du sang périphérique, sont également utilisées depuis 1980 pour le traitement des maladies malignes du sang telles que les leucémies (Thomas et

al., 1975). Ces dernières années, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont fait l'objet d'une grande attention en raison de leurs propriétés régénératrices dans divers tissus du corps humain

Tableau 4. Tableau comparatif des sources des cellules somatiques humaines d'intérêt pour la production des CSPih pour la thérapie cellulaire. Adapté et traduit de Raab et al., 2014.

Tissu d'origine	Cheveux	Sang			Peau	Urine
<i>Source</i>	Follicules pileux	Sang périphérique	Sang du cordon ombilicale	Sang d'une piqûre au bout du doigt	Biopsie de peau/prépuce	Urine
<i>Type cellulaire</i>	Kératinocytes	Cellules T matures Cellules myéloïdes	Cellules endothéliales	Cellules myéloïdes	Fibroblastes	Cellules épithéliales rénales
<i>Conditions de culture</i>	+	+	+	+	++	+
<i>Efficacité de l'isolement</i>	++	+	+	+	-	++
<i>Efficacité de reprogrammation</i>	++	-	+	+	+	++
<i>Méthode d'isolement</i>	Non invasif	Non invasif	Non invasif	Non invasif	Invasif	Non invasif
<i>Disponibilité</i>	++	+	-	++	+	++
<i>Temps de reprogrammation</i>	2-3 semaines	3-5 semaines	2-4 semaines	2-3 semaines	3-5 semaines	3 semaines
<i>Coût de la culture cellulaire</i>	+	-	-	+	++	+
<i>Reprogrammation sans intégration</i>	+	+	+	+	+	+

Adapté à l'utilisation en thérapie cellulaire. ++ : forte, + : intermédiaire, - : faible.

(Lukomska et al., 2019; Parekkadan and Milwid, 2010). Ces cellules multipotentes peuvent se différencier principalement en cellules du tissu cartilagineux (chondrocytes), du tissu osseux (ostéocytes), du tissu adipeux (adipocytes) et du tissu vasculaire (péricytes et muscle lisse) (Gurusamy et al., 2018; Lukomska et al., 2019). De plus, ils participent au contrôle de plusieurs processus physiologiques de manière paracrine, dont la réponse immunitaire, grâce à la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs, limitant la réaction du greffon contre l'hôte. Il existe aujourd'hui plus de 350 essais cliniques utilisant les CSM pour traiter diverses pathologies telles que les maladies rhumatoïdes (*e.g.* arthrose, polyarthrite rhumatoïde), la dégénérescence musculaire (*e.g.* myopathies), les maladies cardiovasculaires (*e.g.* infarctus, l'ischémie des membres inférieurs), le diabète, les maladies auto-immunes et les maladies du greffon contre l'hôte (GVHD de l'anglais « *graft versus host disease* ») (Kabat et al., 2020).

Malgré des résultats encourageants accumulés depuis le début de la thérapie cellulaire avec les cellules souches adultes, il y a encore des freins dans leur utilisation en routine. Pour certaines maladies, les cellules souches adultes du patient peuvent être également dysfonctionnelles ou être la cause de la pathologie, ce qui oblige, souvent, la transplantation allogénique de cellules provenant d'un donneur sain (Ikehara, 2003). Dans ces circonstances, il existe un risque élevé de rejet des cellules transplantées par le système immunitaire de l'hôte. La recherche de donneurs compatibles avec le receveur de la greffe est souvent ardue et les résultats de la greffe peuvent varier selon le donneur et le tissu d'origine des cellules transplantées (Lukomska et al., 2019). De plus, l'obtention de la quantité de cellules requise à transplanter nécessite souvent des méthodes invasives d'extraction par biopsie et/ou l'amplification de ces cellules *in vitro*. Les cellules souches sont des cellules rares présentes en très faibles quantités dans l'organisme (entre 0.01% et 5% dans les tissus) (Łos et al., 2019). Malgré leur capacité d'autorenouveau, les cellules souches adultes ont une capacité limitée de prolifération et les mécanismes nécessaires pour les maintenir en culture *in vitro* ne sont pas toujours connus (Łos et al., 2019). Pour toutes ces raisons, depuis l'isolement des premières lignées des CSEh et plus tard, avec la dérivation des CSPih, les CSP sont rapidement devenues une source alternative pour la thérapie cellulaire. Dans cette section, non seulement les applications des CSP en médecine régénérative seront abordées, mais aussi leur contribution à la recherche fondamentale et à la découverte de nouveaux médicaments (Figure 5).

1.4.1. La recherche fondamentale

Comme il a été mentionné ci-dessus, l'isolement des CSE, à partir de la MCI du blastocyste préimplantatoire et des CSEpi de l'épiblaste postimplantatoire de souris, ont permis d'étudier les mécanismes fondamentaux de la pluripotence et de sa perte au fur à mesure que le développement

embryonnaire progresse vers la gastrulation. Ainsi, il a été possible de mettre en évidence un *continuum* de la pluripotence *in vitro* entre les CSP de souris à l'état naïf et les cellules à l'état amorcé

Tableau 5. Différentes méthodes de transfert des facteurs de reprogrammation dans les cellules somatiques et leur efficacité de reprogrammation. Adapté et traduit de Singh et al., 2015.

	Reprogrammation	Facteurs	Type cellulaire	Efficacité %	Ref
<i>Méthodes intégratifs</i>	Rétrovirus	OSKM	Fibroblastes de souris	0.001-1	Takahashi and Yamanaka, 2006
		OSK + VPA	Fibroblastes humains	≈1	Huangfu et al., 2008
	Lentivirus	OSKM	Fibroblastes humains	0.1-1	Yu et al., 2007
	Lentivirus inducibles	OK + parnate + CHIR99021	Kératinocytes et fibroblastes de souris	0.02	Li et al., 2009
		OSKM	Fibroblastes humains	0.1-2	Maherali et al., 2008
<i>Méthodes non intégratifs</i>	Virus Sendai	OSKM	Fibroblastes humains	≈ 0.1	Fusaki et al., 2009
	Adénovirus	OSKM	Fibroblastes de souris	0.001-0.0001	Stadtfield et al., 2008
	Lentivirus LoxP	OSKM	Fibroblastes humains	0.1-1	Somers et al., 2010
	Episomes (plasmides) ADN	OSK	Fibroblastes de souris	Très faible	(Okita et al., 2008)
	PiggyBAC	OSKM	Fibroblastes de souris	≈0.01	Woltjen et al., 2009
	Polypeptides ciblés avec poly arginines	OSKM	Fibroblastes humains	Très faible	Kim et al., 2009a
	ARNm et microARN	OSKM	Fibroblastes humains	≈4.40	Warren et al., 2010

O: OCT4; S: SOX2; K: KLF4; M: c-MYC.

(Afanassieff et al., 2018). Chez l'homme, l'impossibilité d'étudier l'embryon après son implantation dans les parois utérines a rendu impossible de confirmer si un processus similaire a lieu au cours des premiers stades du développement embryonnaire, malgré que les CSEh et les CSPih aient pu être amenés à un état naïf similaire à celui de la souris (Afanassieff et al., 2018; Gafni et al., 2013). La reprogrammation des cellules somatiques humaines, soit par la surexpression de facteurs de pluripotence, soit par le transfert nucléaire vers un ovocyte énucléé, a aussi permis d'approfondir l'étude du contrôle épigénétique responsable de la détermination cellulaire (Papp and Plath, 2013), de la mémoire dite épigénétique (Papp and Plath, 2011) ou de l'inactivation du chromosome X (Patrat et al., 2020).

La différenciation des CSPh en divers types cellulaires a favorisé la caractérisation des voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire humain. Souvent, les protocoles de différenciation reproduisent les premiers stades de l'embryogenèse à savoir, la formation d'un des trois feuilletts embryonnaires, puis la différenciation de celui-ci vers une lignée cellulaire spécifique caractérisée par la génération des progéniteurs et au final, la maturation de ces derniers pour acquérir le phénotype des cellules adultes recherché (Zhu and Huangfu, 2013). Du fait de l'absence de modèles expérimentaux adéquats à la compréhension du développement embryonnaire humain, l'utilisation des CSP est devenue cruciale en recherche fondamentale et, particulièrement, dans l'étude de l'hématopoïèse chez l'homme (Vargas-Valderrama et al., 2019). Les premières cellules sanguines sont produites très tôt dans l'embryon, vers la troisième semaine de gestation chez l'homme (Bloom and Bartelmez, 1940a) et le septième jour (E7) chez la souris (Palis et al., 1999). Ceci a rendu difficile la caractérisation des premiers événements conduisant à la détermination des cellules hématopoïétiques chez les deux espèces. Avec l'isolement des CSEm, il a été possible de caractériser *in vitro* un progéniteur bipotent de cellules hématopoïétiques et endothéliales, l'hémangioblaste (Choi et al., 1998; Kennedy et al., 1997) qui avait déjà fait l'objet d'études chez le poulet (Sabin, 1920). Quelques années plus tard, ces résultats *in vitro* ont permis à Huber *et al.* d'isoler l'hémangioblaste à partir d'embryons de souris, confirmant ainsi son existence (Huber et al., 2004). Un équivalent de l'hémangioblaste a également été généré à partir des CSPh (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007; Wang et al., 2004), bien que les limitations d'accès aux embryons humains précoces aient empêché son isolement et que son existence *in vivo* chez l'homme reste encore controversé (voir chapitre III). La différenciation hématopoïétique des CSPh a révélé aussi des différences dans les voies de signalisation régissant l'hématopoïèse primitive et définitive entre les souris et les humains. Ainsi, contrairement aux embryons de souris où la voie WNT détermine le programme de l'hématopoïèse primitive (Kinder et al., 1999), chez l'homme, la voie WNT est

nécessaire pour la détermination de l'hématopoïèse définitive (Sturgeon et al., 2014), confirmant la valeur des CSPh comme modèle dans l'étude du développement humain (voir chapitre III).

Les CSPh ont été utilisées pour modéliser et étudier les cellules souches dites cancéreuses qui partagent des caractéristiques avec les cellules pluripotentes, notamment leur capacité d'auto-renouvellement et, dans certains cas, leur potentiel de différenciation (van Rensburg et al., 2011). La génération de lignées CSPih à partir de cellules cancéreuses et leur différenciation *in vitro* et *in vivo* en cellules néo-cancéreuses, a permis d'étudier les premières étapes de la formation de la tumeur (Kim et al., 2013). De plus, l'acquisition des caractéristiques cancéreuses requiert des modifications épigénétiques similaires à celles observées dans la reprogrammation des cellules somatiques en CSPih (Suvà et al., 2013). Ainsi, les CSPih ont permis d'analyser le phénotype cancéreux des patients dans leur contexte génétique et épigénétique pour mieux comprendre pourquoi certains d'entre eux répondent mieux à certains traitements que d'autres.

Enfin, faute de modèles appropriés reproduisant fidèlement les pathologies humaines, les CSPh sont devenues une source alternative de nombreux types cellulaires utilisés dans la modélisation des maladies humaines *in vitro* et *in vivo* et dans l'étude de leur ontologie. C'est en particulier le cas lorsque l'accès aux cellules n'est possible que *post-mortem* (e.g. les tissus cardiaques ou neurax). Bien que l'intérêt pour la modélisation des maladies *in vitro* soit évident depuis l'isolement des CSEh, ce domaine de recherche était limité par l'absence (et dans certains pays, l'interdiction) de diagnostic génétique des embryons préimplantés et par l'inefficacité de la technologie de manipulation

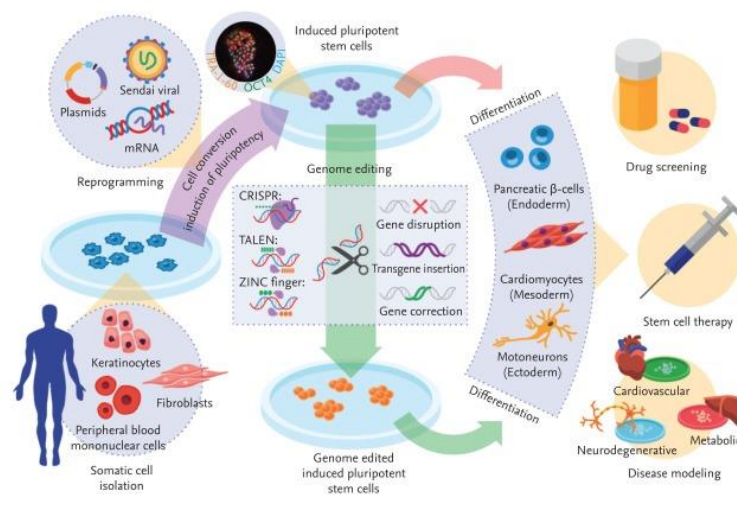


Figure 5. Applications des CSPih. Les CSPih issues de la reprogrammation des cellules humaines somatiques (e.g. kératinocytes, cellules mononuclées du sang périphérique ou fibroblastes) sont, aujourd'hui, une source importante de cellules pour l'obtention de théoriquement n'importe quel type cellulaire grâce à leur potentiel de différenciation et auto-renouvellement. Les cellules différenciées directement à partir des CSPih ou à partir des CSPh génétiquement modifiées sont un outil prometteur pour le criblage de médicaments, la thérapie cellulaire ou la modélisation des maladies. Diecke *et al.* 2014.

génétique de l'époque. Avec la reprogrammation des cellules somatiques, rapidement en 2008, des lignées de CSPih ont été dérivées à partir de cellules de patients atteints de maladies monogéniques, parmi lesquelles la maladie de Parkinson, des myopathies (par exemple la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker), le diabète juvénile ou la maladie de Huntington (Park et al., 2008). Même si cette première étude n'a pas analysé les phénotypes pathologiques des cellules différenciées des CSPih, elle a constitué une première preuve de concept de la dérivation du CSPih pour la modélisation des maladies *in vitro*. L'utilisation d'outils de modification génétique tels que les nucléases à doigt de zinc, les nucléases effectrices de type activateur de transcription (en anglais « *TALENS* ») ou, plus récemment, la technologie des courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées, CRISPR-Cas9 (de l'anglais *CRISPR* pour « *clustered regular interspaced short palindromic repeats* » et *Cas9* « *CRISPR associated protein 9* »), a été cruciale pour la dérivation de lignées CSPih isogéniques (des lignées qui ne diffèrent des lignées CSPih témoin que par le gène d'intérêt pour la maladie) et pour établir une corrélation directe entre le phénotype observé et la mutation analysée (Ding et al., 2013; Horii et al., 2013; Şişli et al., 2020). Ainsi grâce aux CSPih, il a été possible de confirmer la corrélation entre la transformation protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP, de l'anglais « *amyloid precursor protein* ») et la phosphorylation de la protéine tau (P-tau) dans le développement de la maladie d'Alzheimer chez l'homme, une hypothèse qui, bien que connue depuis longtemps, n'avait pas été confirmée par des modèles animaux (Israel et al., 2012). De même, la différenciation hématopoïétique des CSPih provenant de patients atteints du syndrome de Down avec un syndrome myéloprolifératif transitoire a permis d'étudier l'implication de la trisomie du chromosome 21 et des mutations tronquées du gène GATA1 dans le développement du syndrome myéloprolifératif (MacLean et al., 2012).

1.4.2. Développement des médicaments et tests de toxicité

L'identification des cibles biologiques associées au développement d'une pathologie et de leurs agents thérapeutiques, inhibant soit la progression de la maladie soit les symptômes, requiert des modèles cellulaires *in vitro* pour permettre le criblage à haut débit de candidats chimiques. Une fois que les potentiels agents thérapeutiques sont identifiés, il est nécessaire de choisir la voie d'administration et la dose du traitement afin de maximiser les effets positifs et de minimiser leur toxicité dans les organes et tissus non ciblés. Généralement, l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des agents thérapeutiques dépend des modèles animaux et des modèles cellulaires dérivés de cellules immortalisées, qui analysent principalement les effets des molécules sur le cœur, le cerveau, le foie et les reins. Cependant, ces modèles ne représentent pas toujours avec précision les conditions physiologiques et pathologiques humaines (Christensen et al., 2018). Le cœur humain, par exemple, diffère de celui de la souris à la fois en termes de fréquence cardiaque (10 fois plus

élevée chez la souris que chez l'homme), d'électrophysiologie et du type de canaux ioniques (Karagiannis et al., 2019).

La nécessité d'établir avec exactitude de nouveaux modèles expérimentaux qui récapitulent mieux les pathologies humaines et qui prédisent la cytotoxicité des agents thérapeutiques, a mis en évidence les CSPh comme une source alternative de cellules humaines. Durant ces dernières années, l'utilisation des neurones, des oligodendrocytes, des astrocytes et des progéniteurs neuronaux différenciés à partir des CSPih de patients atteints de maladies neurologiques, ont permis d'identifier des composés chimiques (nouveaux ou déjà utilisés pour le traitements d'autres maladies) pour traiter au moins 25 maladies neurologiques dont la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington, l'atrophie musculaire spinale ou la maladie de Parkinson (Avior et al., 2016). Les hépatocytes différenciés des CSPih de patients atteints d'un déficit de l'alpha-1-antitrypsine, une affection qui peut principalement provoquer une maladie pulmonaire obstructive chronique et une insuffisance hépatique, se sont également révélés utiles pour la détection de composés qui inhibent l'accumulation de l'antitrypsine (l'un des symptômes de cette maladie) après avoir balayé 3131 composés avec l'imagerie à haut débit (Choi et al., 2013). Également, les cardiomyocytes dérivés des CSPh sont devenus une alternative prometteuse aux tests toxicologiques actuels pour détecter des médicaments causant arythmies mortelles. L'évaluation de 60 médicaments sur des cardiomyocytes dérivés de CSPh, en utilisant la mesure de la durée des potentiels de champ extracellulaire, a confirmé la grande sensibilité, spécificité et précision de ce test pour la prédiction du risque de développement des arythmies cardiaques causées par ces molécules chimiques (Ando et al., 2017).

L'avenir de la pharmacologie est le développement de médicaments personnalisés en utilisant des banques de CSPh, représentatives de la variabilité humaine génétique existante, tout en tenant compte du fond génétique du patient pour les rendre plus effectifs (Christensen et al., 2018). De plus, récemment, la création de chimères homme/cochon (Wu et al., 2017) a ouvert la possibilité de créer des modèles animaux avec des organes humains plus pertinent pour la modélisation des pathologies et les analyses toxicologiques des médicaments. Toutes ces applications sont, néanmoins, confrontées aux défis qui limitent l'utilisation courante des CSPh. En particulier, la grande variabilité des CSPh intra et interlignées peut entraîner des différences dans la différenciation et donc, conduire à des résultats et des interprétations faussées (Christensen et al., 2018). En ce sens, l'établissement de protocoles standards pour la dérivation de lignées de CSPh, les conditions de culture en absence de couches nourricières et avec des milieux de culture définis, ainsi que l'automatisation du maintien et de la différenciation des ces cellules, pourraient contribuer à réduire la variabilité intra et interlignées. Une fois isolés, les progéniteurs générés à partir des CSPh, doivent

être bien caractérisés, pour éviter le biais causé par les différences des potentiels de différenciation. Dans tous les cas, il est nécessaire d'établir systématiquement des contrôles de la stabilité génétique des lignées de CSPh en culture pour éviter l'acquisition de mutations qui pourraient affecter le phénotype des cellules différenciées (Christensen et al., 2018). Finalement, l'immaturité de la plupart des cellules différenciées à partir des CSPh est l'un des grands défis à résoudre (Patterson et al., 2012). Nombreuses maladies, sans traitement actuel, apparaissent à l'âge adulte et affectent les cellules matures. Le fait d'utiliser des cellules similaires à l'état embryonnaire ou foetal peut masquer les effets des molécules chimiques testées sur elles. La mise au point de méthodes qui permettent l'acquisition de caractéristiques adultes de ces cellules pourrait contribuer à l'établissement définitif des CSPh dans le monde pharmaceutique.

1.4.3. Médecine régénérative

L'une des applications la plus prometteuse des CSPh est le traitement des maladies par la thérapie cellulaire autologue ou allogénique, avec la création de banques de cellules souches. Les premiers protocoles d'isolement des CSEh et de reprogrammation des cellules somatiques en CSPih impliquaient l'utilisation de sérum du veau foetal (SVF) et d'une couche nourricière de fibroblastes embryonnaires murins (FEM) traités à la mitomycine ou irradiés (pour empêcher leur prolifération) (Takahashi et al., 2007; Thomson et al., 1998b). Ces produits d'origine animale compromettent l'utilisation des CSPh et de leurs dérivés en clinique en étant un risque de transmission de toxines et de maladies inter-espèces et en augmentant la possibilité d'une réponse immunitaire contre les cellules transplantées. L'utilisation de cellules humaines (Richards et al., 2002) principalement des fibroblastes dérivés de prépuce, des matrices extracellulaires produites par les FEM (Klimanskaya et al., 2005) ou d'un mélange de protéines extracellulaires sécrétées par les cellules du sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm, connu sous le nom de Matrigel (Xu et al., 2001a), a été envisagée comme des alternatives aux cellules nourricières murines. En 2006, Ludwig *et al.* ont démontré que les CSEh pouvaient être maintenues sur une surface recouverte d'un mélange de protéines humaines comprenant la vitronectine, le collagène IV, la fibronectine et la laminine et cultivées dans un milieu sans sérum appelé TeSR1 (Ludwig et al., 2006). Quelques années plus tard, Chen et al. ont produit le premier milieu de culture des CSPh défini, exempt de tout produit d'origine animale, le milieu E8, composé d'insuline, du sélénium, de transferrine, d'acide ascorbique et des facteurs de croissance tels que le bFGF et le TGF β (ou Nodal) dans du milieu DMEM/F12 (Chen et al., 2011a). Récemment, d'autres travaux ont utilisé des surfaces recouvertes d'une seule des protéines recombinantes mentionnées ci-dessus (vitronectine, laminine ou fibronectine) (Braam et al., 2008), de petits peptides dérivés de ces protéines (par exemple le fragment E8 de la laminine-511) (Rodin et al.,

2010) ou des polymères synthétiques qui permettent le maintien des CSPh en culture en conditions définies (Shao et al., 2015).

Actuellement, toutes ces avancées contribuent à la dérivation des lignées CSEh et CSPih dans des conditions de grade clinique nécessaires pour la thérapie cellulaire (Baghbaderani et al., 2015; Crook et al., 2007). En plus de l'interdiction d'utiliser des produits d'origine animale, les bonnes pratiques de fabrication (BPF ou GMP de l'anglais « *good manufacturing practices* ») imposent aussi la vérification de la stabilité génétique des CSPh, à savoir un caryotype normal exempté de toute aberration chromosomique ; de l'absence d'agents microbiologiques tels que mycoplasmes, bactéries, champignons, virus ou endotoxines, qui pourraient provoquer des maladies chez le receveur et de la pureté de ces cellules exemptées de cellules pluripotentes résiduelles ou de cellules provenant d'autres lignées cellulaires. Ces conditions de culture cellulaire sont essentielles à la sécurité du produit final à transplanter. Dans le cas des CSPih et comme décrit dans les sections précédentes, l'utilisation de vecteurs non intégratifs et le séquençage du génome sont nécessaires pour confirmer l'absence d'ADN étranger et de mutations dans les cellules à transplanter (Sullivan et al., 2018).

En 2010, le premier essai clinique avec des cellules dérivées des CSEh a été lancé pour traiter des lésions de la moelle épinière. À cette fin, l'entreprise pharmaceutique qui a réalisé cet essai, a différencié des oligodendrocytes à partir des CSEh. Un an plus tard, cette entreprise a arrêté l'essai argumentant des problèmes économiques. Bien qu'aucun effet secondaire n'ait été signalé, aucun des patients n'a montré d'amélioration. Cet essai, fut repris par une autre entreprise sur 35 patients qui, en 2017, a souligné l'amélioration des patients transplantés et a confirmé l'absence d'effets secondaires (Eguizabal et al., 2019). Ces premiers essais cliniques ont été suivis par d'autres équipes ciblant différentes maladies. En 2018, une trentaine d'essais cliniques étaient en cours dans le monde pour le traitement de maladies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le diabète myélite de type I, la maladie de Parkinson ou la maladie du GVHD, la plupart avec des cellules dérivées des CSEh (Eguizabal et al., 2019) (Figure 6, Tableau 6). En France en 2014, l'équipe du professeur Menasché a réalisé la première transplantation de cellules cardiaques dérivées des CSPh pour traiter une patiente de 68 ans atteinte d'une grave insuffisance cardiaque, ces travaux ont montré une amélioration chez la patiente sans complications apparentes (Menasché et al., 2015).

Avec le développement des technologies de modification génétique, une nouvelle application des CSPh s'est ouverte à la médecine régénérative. Les essais précliniques concernant les maladies monogéniques ont montré que la correction génique était possible dans les CSPih issues de cellules mutées de patients. L'obtention de cellules différenciées corrigées étaient alors transplantables chez les patients malades (Şişli et al., 2020). Malgré de nombreux essais précliniques et cliniques avec les CSPh, la thérapie cellulaire continue à faire face à un certain nombre d'obstacles. En 2015, un essai clinique au Japon a été interrompu en raison de mutations acquises par les CSPih au cours du protocole, mettant ainsi en évidence l'instabilité génétique des CSPih (Mandai et al., 2017).



Figure 6. Phases pour le développement, approbation et mise sur le marché des médicaments ou agents thérapeutiques. Les essais pré-cliniques permettent l'identification des potentiels agents thérapeutiques ainsi que l'évaluation de leur efficacité et toxicologie *in vitro* et *in vivo* (dans modèles animaux). Pendant la phase clinique I, les candidats aux médicaments sont testés sur des volontaires sains pour confirmer leur sécurité d'emploi, leur devenir dans l'organisme, ainsi que les effets indésirables. Pour les cellules souches, la phase I peut se réaliser dans un nombre réduit des patients malades et peut être associé directement à la phase clinique II. Les phases II et III, réalisés sur des patients malades, ont pour but de démontrer l'efficacité de ce produit et confirmer la sécurité du même. A la fin de ces phases, les pharmaceutiques peuvent recevoir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du produit thérapeutique. Les années suivantes constituent la phase IV, où le médicament continue à être analysé, grâce aux données obtenues à partir des patients réels. Image originale du projet BD4cancer.

La reprogrammation, amplification et différenciation en grandes quantités cellulaires est très laborieuse et coûteuse. Le futur de cette technologie compte sur l'automatisation de la culture et de la différenciation de ces CSPih pour augmenter la production et réduire les coûts (Kropp et al., 2016a). Des alternatives à la culture cellulaire traditionnelle comme, par exemple, l'utilisation des grands bioréacteurs où les cellules sont cultivées en 3D, ont commencé à se mettre en place dans certains laboratoires (Olmer et al., 2012), mais il faudra toujours s'assurer que le produit final ne présente pas de danger. L'identification des petites molécules qui pourraient remplacer les cytokines et les facteurs de croissance dans les conditions d'amplification et de différenciation des CSPh sont aussi étudiées pour minimiser le coût (Chen et al., 2020; Haridhasapavalan et al., 2019). D'autre part, la thérapie cellulaire autologue privilégiée depuis des années, mais très chère en pratique, donne place maintenant à la thérapie allogénique et la fabrication de banques de CSPih. Les études dans ce domaine ont montré qu'il est nécessaire d'avoir 140 donneurs HLA homozygotes pour couvrir

environ 90% de la population japonaise (Okita et al., 2011), ou 150 donneurs pour couvrir 93% de la population anglaise (Taylor et al., 2012) et assurer des cellules compatibles avec l'hôte.

Enfin, de nombreuses études cliniques ont montré que très peu de patients transplantés avec des dérivés des CSPh présentaient des améliorations significatives de leur état pathologique. Bien que ces résultats moins positifs puissent être liés à la dose et à la voie d'administration, l'une des hypothèses envisagées est le manque de maturation des cellules différenciées dérivés des CSPh. Le développement de méthodes qui permettent l'acquisition de caractéristiques adultes de ces cellules aidera, sans aucun doute, à la mise en place définitive d'une thérapie cellulaire dans le futur.

1.4.4. Les organoïdes

Même si ces dernières années les CSPh sont devenues un outil puissant pour la recherche fondamentale, pour la découverte de nouveaux médicaments et pour la médecine régénérative, il reste des défis qui limitent leur application en tant que modèles *in vitro* de tissus et d'organes et comme source de cellules pour la thérapie cellulaire. Notamment, des études transcriptomiques, protéomiques et fonctionnelles ont démontré que les différents types cellulaires issus de la différenciation des CSPh ont des phénotypes et des fonctionnalités similaires à ceux des cellules embryonnaires ou fœtales (Patterson et al., 2012; Vethe et al., 2017; Wenxuan et al., 2019). La maturation de ces cellules a été atteinte dans certains cas après transplantation *in vivo* dans des modèles animaux (Kadota et al., 2017; Pagliuca et al., 2014). Ce résultats suggèrent que, dans de bonnes conditions, les cellules issues de CSPh seraient également capables de mûrir *in vitro*. Cependant, l'intégration de paramètres physiologiques aux protocoles de différenciation des CSPh, tels que l'architecture spatiale, le microenvironnement ou la niche, les facteurs paracrines ou les régimes mécaniques, qui contribuent à la maturation des cellules *in vivo* est une tâche loin d'être simple.

À la fin du XXème siècle, des études menées sur des biopsies de tissus et d'organes humains ont permis le développement de techniques de culture en trois dimensions (3D) qui ont abouti à la formation de ce que l'on appelle aujourd'hui des organoïdes (Simian and Bissell, 2016). Les organoïdes sont des agrégats en 3D composés par un ou plusieurs types cellulaires dérivés de cellules souches ou de progéniteurs, capables de s'autoorganiser reproduisant une micro-anatomie mimant l'architecture, la compartimentation et la fonctionnalité des organes observés *in vivo* (Lancaster and Knoblich, 2014). Grâce aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (ECM de l'anglais « *extracellular matrix* ») favorisées au sein de ce système, la production d'organoïdes à partir de CSPh pourrait contribuer à l'acquisition de caractéristiques adultes des cellules différenciées. Les premiers organoïdes dérivés des CSP, sont issus des CSEm en Matrigel, en 2008,

pour générer des tissus du cortex cérébral et de la cupule optique (Eiraku et al., 2008). Depuis lors, des organoïdes de foie (Takebe et al., 2013), de cerveau (Lancaster et al., 2013), d'intestin (Múnera and Wells, 2017), de rein (Morizane and Bonventre, 2017), etc. ont été générés à partir des CSPh (Lancaster and Knoblich, 2014). Loin d'obtenir des populations pures d'un seul type cellulaire, le concept d'organoïde préconise les systèmes multicellulaires qui représentent la complexité cellulaire d'un organe (Lancaster and Knoblich, 2014; Simian and Bissell, 2016). Ainsi, par exemple, dans les organoïdes d'intestin, on retrouve des entérocytes, des cellules de Paneth, des cellules entéro-endocrines, des cellules de gobelet et des cellules souches intestinales organisées tout au long des cryptes, d'une manière similaire à celle observée *in vivo* (Múnera and Wells, 2017). Cependant, au-delà du parenchyme, les organes sont composés de cellules nerveuses, vasculaires, musculaires ou immunitaires nécessaires au développement et au bon fonctionnement de l'organe. Actuellement, les organoïdes manquent d'une telle organisation, bien que certains groupes de recherche aient déjà commencé à incorporer des CE (Takebe et al., 2013), des neurones (Workman et al., 2017) et/ou des CSM (Taguchi and Nishinakamura, 2017). L'ajout des autres types cellulaires demande une mise au point des conditions de culture des organoïdes en question. Il s'agit de déterminer le milieu de culture commun et adéquat aux différentes cellules, d'identifier les proportions cellulaires qui organiseront l'organoïde et également l'ajout de matrices extracellulaires pour favoriser l'agrégation des différents types cellulaires. Cependant, force est de constater, que les organoïdes ressemblent davantage à leurs homologues fœtaux qu'aux adultes, malgré les études qui suggèrent que les organoïdes favorisent la maturation des CSPh par rapport aux protocoles traditionnels en 2D (Amiri et al., 2018; Camp et al., 2015, 2017, Vargas Valderrama *et al.* 2020 voir annexe 1).

Toutefois, les organoïdes se sont avérés utiles pour la modélisation de diverses maladies. En 2017, une équipe américaine a réussi à modéliser la maladie de Hirschsprung (Workman et al., 2017). Une maladie caractérisée par l'absence de nerfs dans l'intestin, une déficience musculaire et l'obstruction partielle de cet organe. Les organoïdes intestinaux générés contenaient, en plus des cellules typiques de l'intestin, des cellules de la crête neurale (CCN) également issues des CSPh. La modification génétique de ces CCN, pour introduire une des mutations liées au développement de cette maladie, a entraîné un échec de la différenciation des CCN en neurones et en cellules gliales dans des organoïdes intestinaux, contrairement aux organoïdes témoins contenant des CCN de type sauvage. Les analyses transcriptomiques ont révélé aussi une diminution de la transcription des gènes liés à la différenciation du muscle lisse, suggérant la pertinence de ce système pour récapituler le phénotype de la maladie (Workman et al., 2017). Les organoïdes cérébraux ont été aussi utilisés pour modéliser des maladies infectieuses, notamment les effets du flavivirus ZIKV (mieux connu sous le nom de Zika), en particulier le développement de microcéphales et d'autres défauts cérébraux

graves. Grâce aux organoïdes de cerveau, il a été possible de confirmer que le virus affecte principalement les progéniteurs neuronaux, empêchant leur prolifération et augmentant la mort cellulaire (Garcez et al., 2016). En conséquence, les organoïdes infectés présentent une taille réduite, une diminution de l'épaisseur de la zone ventriculaire et une dilatation des structures ventriculaires par rapport aux organoïdes témoins (Garcez et al., 2016). Ce modèle *in vitro* a également permis d'identifier des molécules chimiques qui inhibent l'infection des tissus neuraux par ce virus (Zhou et al., 2017).

Dans le développement de nouveaux médicaments, bien que les organoïdes aient permis l'établissement de nouvelles cibles biologiques pertinentes pour certaines pathologies et ouvert la possibilité d'étudier les interactions entre les cellules humaines et des agents pathogènes, il existe encore une grande variabilité dans leur formation qui empêche leur utilisation pour le criblage des composés dans des tests à haut débit. Cependant, les organoïdes du cœur, des reins, du foie et du cerveau, principalement, ont le potentiel de devenir le futur des études pharmacologiques *in vitro*, car ils représentent mieux que les tests 2D actuels les conditions physiologiques humaines, ou *in vivo*, en combinaison avec les modèles animaux (Liu et al., 2018; Rowe and Daley, 2019). En ce sens, les organoïdes ont montré non seulement leur survie après plusieurs mois de transplantation dans des modèles animaux (Camp et al., 2015; Watson et al., 2014a), mais aussi leur intégration chez l'hôte, établissant, par exemple, des connexions neuronales (Mansour et al., 2018b) et vasculaires (van den Berg et al., 2018; Mansour et al., 2018a) ou produisant de l'albumine humaine détectée dans le sang (Si-Tayeb et al., 2010), dans le cas des organoïdes du foie.

Jusqu'à présent, il n'y a pas encore d'essais cliniques en cours sur les organoïdes dérivés des CSPh. En revanche, les études précliniques de modélisation des maladies et de correction génique laissent augurer un bon avenir pour l'utilisation de ces organoïdes. Comme dans les cas des cultures traditionnelles de CSPh, une des conditions limitantes est la possibilité d'augmenter l'échelle de production pour l'obtention d'organoïdes plus volumineux pouvant devenir une alternative réelle aux greffes d'organes. La plupart des organoïdes ont une taille inférieure à 1-3 mm, avec des zones nécrosées au cœur des organoïdes les plus gros (Lancaster and Knoblich, 2014; Lancaster et al., 2013). La vascularisation de ces entités cellulaires pourrait permettre la génération d'organoïdes plus gros assurant la distribution de nutriments et de l'oxygène jusqu'au centre de l'organoïde (Vargas Valderrama et al. 2020, voir annexe 2). Récemment, une équipe américaine a créé des tissus plus gros (>2,5 ml de volume et ≈4 mm d'épaisseur) sans signes apparents de nécrose ou de mort cellulaire, à partir d'organoïdes cérébraux et cardiaques dérivés des CSPh dans une ECM. À l'aide d'une imprimante 3D, les chercheurs ont créé des canaux perfusés entre les organoïdes cultivés à haute densité (Skylar-Scott et al., 2019).

Les organoïdes pourraient être utilisés en clinique au-delà des transplants, avec des systèmes de soutien extracorporel tels qu'il a été proposé pour le foie (Kumar et al., 2011). Ces systèmes sont conçus pour l'élimination des toxines solubles dans le plasma, la biotransformation et la synthèse des protéines chez les patients souffrant de problèmes hépatiques. Ainsi, le sang du patient pourrait circuler à travers un dispositif, à l'extérieur du corps, composé principalement d'un bioréacteur avec un grand nombre d'hépatocytes. Jusqu'à présent, les études sur des modèles animaux ont utilisé des cellules de foie immortalisées comme preuve de concept (Nibourg et al., 2012). Cependant, l'interdiction d'utiliser ces cellules pour les traitements cliniques (à cause de leurs propriétés cancéreuses), la rareté des hépatocytes humains primaires et les résultats positifs sur la fonctionnalité des organoïdes hépatiques dérivés des CSPh suggèrent que ces derniers seraient la source de biomasse la plus appropriée à cette fin.

1.5. Problèmes éthiques sur l'utilisation des cellules souches

Dans les sections précédentes, nous avons vu comment les cellules souches, et en particulier les CSP, ont révolutionné les champs de la biologie cellulaire conventionnelle. En une décennie, les progrès réalisés avec ces cellules laissent espérer l'émergence d'un produit thérapeutique comme une véritable alternative au traitement de plusieurs maladies. Toutefois, ces applications soulèvent des questions éthiques qui doivent être prises en compte et anticipées.

D'abord, l'utilisation de tout matériel biologique donné par une personne doit suivre une procédure de consentement volontaire et informé du donneur. Le caractère volontaire du don implique l'absence de toute rémunération financière afin d'éviter la coercition et l'enrichissement illicite par cette activité. Il est de la responsabilité des chercheurs et de tout le personnel en relation avec le donneur d'informer et de répondre en détail aux questions sur les risques et l'utilisation des cellules ou de tout autre matériel biologique donné. Ces dernières années, le développement des techniques de séquençage de l'ADN a de nouveau soulevé la question de l'anonymat des donneurs et de la confidentialité des données. Bien que dans la plupart des cas, les informations que les chercheurs reçoivent sur le donneur soient insuffisantes pour l'identifier, mais nécessaires pour mener des recherches scientifiques voulues (par exemple, l'âge, le sexe, les états pathologiques), l'augmentation des bases de données sur le génome (par exemple, grâce à des plateformes privées telles que "*myheritage*") pourrait, à l'avenir, faciliter l'identification du donneur et même révéler des informations non désirées. De même, les études de recherche réalisées avec tout matériel biologique pourraient fournir des informations sur des états pathologiques inconnus par le donneur et dont la non-communication pourrait mettre sa vie en danger. Il est donc nécessaire d'anticiper ces scénarios et d'établir explicitement le souhait du patient de connaître ou non toute information relative à son

état de santé révélé pendant l'utilisation de ses échantillons biologiques, ainsi que les moyens de le contacter, tout en garantissant son droit à la confidentialité de ses données personnelles (Moradi et al., 2019).

En ce qui concerne l'utilisation des cellules souches, les CSEh sont sans aucun doute l'une des sources biologiques qui a suscité le plus de débats éthiques. L'isolement des CSE de la MCI du blastocyste humain implique la destruction d'un embryon qui, autrement, aurait pu conduire à la formation d'un être humain, à condition qu'il soit implanté dans l'utérus d'une femme (Moradi et al., 2019). Les embryons préimplantatoires sont exclusivement obtenus suite au don à la recherche par des couples qui ont suivi un processus de fécondation *in vitro* ou un diagnostic préimplantatoire et qui ne sont plus tenus de vouloir mener une grossesse à terme, conformément à la loi de bioéthique de l'État français (Ministère de solidarités et de la santé 2011). Ainsi, les embryons ne sont, dans aucun cas, conçus à des fins scientifiques. Cependant, le problème éthique réside principalement dans notre définition de l'être humain et de notre perception sur quand la vie humaine acquiert le même statut moral que celui d'un être humain, nouveau-né ou adulte. Une partie de la population considère, qu'à partir du moment où un ovule est fécondé, *in vivo* ou *in vitro*, l'embryon (y compris l'état de zygote) est un être humain ayant les mêmes droits qu'un être humain déjà né. Par conséquent, la destruction de l'embryon est un crime comparable à un homicide. Suite à ce débat, les premières lois de bioéthique de 1994 en France ont interdit toute recherche sur les embryons humains (site web du Ministère de solidarités et de la santé, 2019) et aux États-Unis, pendant le mandat de George Bush, le financement gouvernemental pour la dérivation de nouvelles lignées de CSEh a été arrêté (2001). En France, la loi de bioéthique a intégré en 2004 la possibilité d'établir des exceptions dans l'utilisation des embryons pour la recherche scientifique et en 2013 l'utilisation des embryons a été autorisée de manière réglementée sous l'agrément et le contrôle de l'Agence de biomédecine. Récemment, en 2019, un nouveau projet de loi visant à faciliter le travail avec les CSEh a été soumis à l'Assemblée nationale (Ministère de solidarités et de la santé, 2019b). Pour la première fois, ce projet de loi considère les embryons humains et les CSEh de manière indépendante. En pratique, cette loi permettrait la libre utilisation des CSEh dans la recherche à condition qu'ils soient déclarés à l'Agence de biomédecine sans qu'il soit nécessaire de lui demander une autorisation formelle. Aux États-Unis, le président Obama a abrogé en 2009 l'interdiction de George Bush et a confirmé l'autorisation de dériver de nouvelles lignées de CSEh à partir d'embryons congelés issus de la fécondation *in vitro* avec le consentement des parents, similaire à la loi française. Dans les deux cas, l'évolution de la législation dans ce domaine reconnaît les avantages de l'utilisation des CSEh dans le progrès de la recherche médicale, en particulier dans l'avenir de la médecine régénérative.

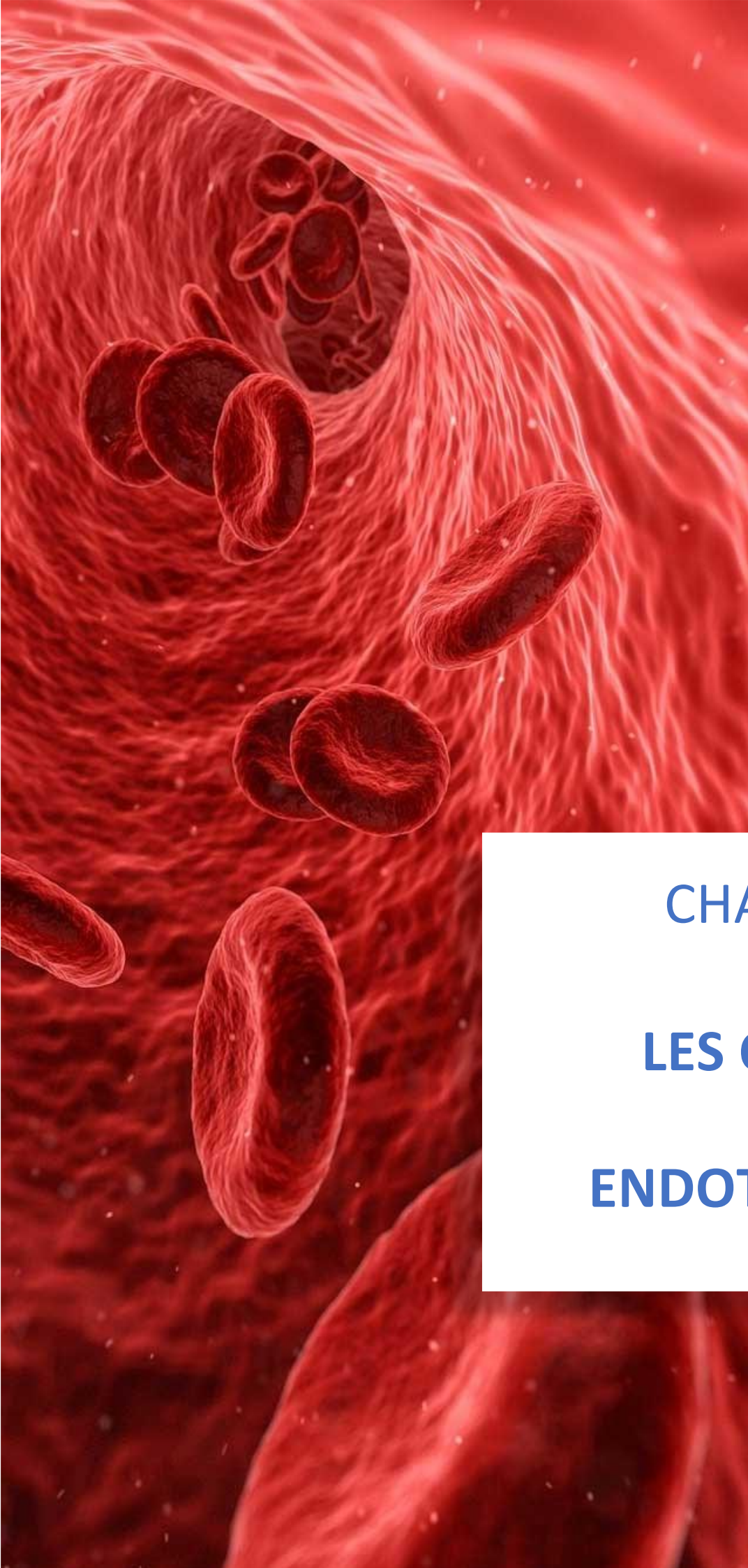
Enfin, bien que les CSPih aient été décrites, pendant des années, comme l'alternative éthique aux CSEh, la génération de cellules sexuelles ou de gamètes *in vitro*, ouvre un nouveau débat éthique. Bien que pour l'instant, la différenciation des CSP en gamètes présente de nombreux défis techniques, si elle était réalisée, elle ouvrirait la possibilité de la fécondation *in vitro* à partir de cellules adultes et, plus problématique en termes éthiques, la fécondation asexuée à partir d'un ovule et de spermatozoïde issus de la même lignée de CSPh (Moradi et al., 2019). En ce sens, le nouveau projet de loi en France énoncé ci-dessus mentionne explicitement que tous les travaux de recherche sur la dérivation de gamètes à partir de CSPh doivent être communiqués à l'Agence de biomédecine, bien qu'ils ne nécessitent pas son autorisation (Ministère de solidarités et de la santé, 2019b). D'autres applications des CSPh ont également donné lieu à des débats éthiques. C'est le cas des organoïdes cérébraux. En effet, ces organoïdes soulèvent la possibilité de créer une entité consciente *in vitro*. Leur transplantation chez l'animal pourrait produire des organes humains, où les cellules neurales humaines pourraient donner de nouvelles capacités cérébrales à l'hôte animal. Puisque la conscience est une caractéristique déterminante des êtres humains qui nous différencie des autres animaux, si elle était générée *in vitro* ou *in vivo* chez d'autres animaux, quel état moral devrait être attribué à ces nouvelles entités vivantes ? Sans aucun doute, ces dernières années, la science a souvent dépassé les prédictions de la science-fiction. Anticiper les conséquences éthiques et morales des nouvelles technologies pourrait permettre d'éviter les mauvaises pratiques tout en renforçant leurs avantages.

Tableau 6. Essais cliniques avec des cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) jusqu'à 2019. Traduit de Eguizabal et al. 2019

Identifiant	Maladie	CSPh	Dispositif	Cellules différenciées	Sponsor	Pays	Phase	Début	Fin	Patients	État actuel
NCT01217008	SCI	CSEh	GRNOPC1	Oligodendrocytes	Asterias Biotherapeutics	E.U.	I	Oct-10	Juill-13	5	Complété
NCT01344993	AMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	E.U.	I/II	Avr. 11	Août 15	13	Complété
NCT01345006	SMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	E.U.	I/II	Avr. 11	Août 15	13	Complété
NCT01469832	SMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	R.-U.	I/II	Nov. 11	Sept 15	12	Complété
NCT01625559	SMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	CHABiotech CO., Ltd	Corée	I	Sept 12	Juin 15	3	Inconnu
NCT01674829	AMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	CHABiotech CO., Ltd	Corée	I/IIa	Sept 12	Avr. 15	12	Inconnu
NCT01691261	AMD	CSEh	PF-05206388	EPR	Pfizer	R.-U.	I	Juin 15	Nov. 16	10	En cours
NCT02057900	IHD	CSEh		Prog. CD15+ Isl-I +	Assistance Pub. Hôp. Paris	France	I	Juin 13	Juin 18	6	En recrutement
NCT02239354	T1DM	CSEh	VC-01™	Prog. de cellules β	ViaCyte	E.U.	I/II	Sept. 14	Janv. 21	40	En cours
NCT02286089	AMD	CSEh	OpRegen	EPR	Cell Cure Neurosciences	Israël	I/II	Mars 15	Sept. 19	15	En recrutement
NCT02302157	SCI	CSEh	AST-OPC1	Prog. Oligodendrocytes	Asterias Biotherapeutic.	E.U.	I/II	Mars 15	Déc. 18	35	En recrutement
NCT02445612	SMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	E.U.	I/II	Juill. 15	Déc. 29	13	En cours
NCT02452723	PD	pCSEh	ISC-hpNSC	Cellules souches neurales	Cyto Therapeutics Pty Lim.	Australie	I	Mars 16	Mars 19	12	En recrutement
NCT02463344	AMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	E.U.	I/II	Juill. 12	Déc. 29	11	En cours
NCT02464956	AMD	CSPIh autol		EPR	Moorfields Eye Hosp. NHS	R.-U.	I	Juill-15	Avr. 16	10	Inconnu
NCT02590692	AMD	CSEh	CPCB-RPE1	EPR	Regenerative Parch Tech.	E.U.	I/II	Oct. 15	Sept. 22	20	En recrutement
NCT02749734	AMD ; SMD	CSEh	ESC-RPE	EPR	Southwest Hospital, China	Chine	I	Mai 15	Déc. 17	15	En recrutement
NCT02755428	AMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Chinese Academy Sc.	Chine	I	Avr. 17	Déc. 20	10	En recrutement
NCT02903576	AMD ;	CSEh		EPR	Federal Univ. São	Brazil	I/II	Août 15	Juin 19	18	En recrutement

	SMD				Paulo						
NCT02923375	GVHD	CSPih allog	CYP-001	CSM	Cynata Therapeutics	Australie	I	Mars 17	Sept.19	16	En recrutement
NCT02941991	SMD	CSEh	MA09-hRPE	EPR	Astellas Inst. Regen.Med.	R.-U.	I/II	Juin. 13	Déc. 19	11	En cours
NCT03046407	AMD	CSEh	ESC-RPE	EPR	Chinese Academy Sc.	Chine	I	Mars 17	Déc. 20	10	En recrutement
NCT03119636	PD	CSEh		Prog. Neurales	Chinese Academy Sc.	Chine	I/II	Mai 17	Déc. 20	50	En recrutement
NCT03162926	T1DM	CSEh	VC-02	Prog. de cellules β	ViaCyte	E.U.	I	Juill. 17	Juin 18	15	En recrutement
NCT03163511	T1DM	CSEh	VC-02	Prog. de cellules β	ViaCyte	E.U.	I/II	Juill. 17	Déc. 20	55	En recrutement
ChiCTR-OCB-15005968	SOSD	CSEh		Épithélium cornéen	Eye Institute Xiamen Univ.	Chine	I/II	Oct. 15	Déc. 18	20	En recrutement
ChiCTR-OCB-15007054	AMD	CSEh	ESC-RPE	EPR	Chinese Academy Sc.	Chine	I	Juin 16	Juin 17	10	En recrutement
ChiCTR-OCB-15007055	RPD	CSEh	ESC-RPE	EPR	Chinese Academy Sc.	Chine	I	Sept. 15	Déc. 17	5	En recrutement
	AMD	CSPih allog		EPR	RIKEN Center for Dev.Biol.	Japan	I	Feb. 17		5	En recrutement
UMIN000011929	AMD	CSPih autol		EPR	RIKEN Center for Dev.Biol.	Japan	I	Sept. 14	Sept. 15	1	Interrompu
	PD	CSPih allog		Neurones dopaminergiques	Center for iPS Cel Res.	Japan	I	2018			

SCI : traumatisme de la moelle épinière ; AMD : dégénérescence maculaire liée à l'âge ; SMD : maladie de Stargardt ; IHD : ischémie myocardique ; T1DM : diabète myélites type I ; PD : Maladie de Parkinson ; GVHD : maladie du greffon contre l'hôte ; SOSD : atteintes sévères de la surface oculaire ; RPD : rétinites pigmentaires ; CSM : cellules souches mésenchymateuses ; EPR : épithélium pigmentaire rétinien ; prog. : progéniteurs ; autol. : autologue ; allog. : allogénique.



CHAPITRE II

LES CELLULES

ENDOTHELIALES

Chapitre II : Les cellules endothéliales

2.1. Introduction

Depuis l'apparition des premiers êtres vivants sur terre, leur survie a été liée à leur capacité d'obtenir des nutriments et de les distribuer à l'ensemble de leur organisme, ainsi qu'aux échanges gazeux, assurant l'apport d'énergie nécessaire à l'exécution des processus physiologiques et à l'élimination des déchets produits par le métabolisme cellulaire. Pour des organismes unicellulaires et de petits multicellulaires, la diffusion moléculaire a été suffisante pour cet objectif. Toutefois, ce phénomène physique n'est efficace que pour des petites distances de moins de 1 mm. Le développement de nouvelles stratégies de transport a été crucial pour l'évolution des organismes pluricellulaires. Le système vasculaire chez les végétaux et les animaux, a évolué pour permettre le transport efficace des nutriments vers chaque cellule de l'organisme (même chez des individus de plusieurs mètres de hauteur), l'échange de gaz et l'élimination des déchets résultants du métabolisme cellulaire (Monahan-Earley et al., 2013; Raven, 2018). Notamment, chez les mammifères et les oiseaux, cette adaptation est traduite en un système vasculaire composé d'une pompe anatomique, le cœur, qui est la force motrice du flux sanguin dans le corps. Il s'agit d'un circuit clos de vaisseaux sanguins qui, contrairement aux systèmes ouverts (*e.g.* des mollusques et des arthropodes) assure, non seulement le transport de grandes quantités de nutriments et de gaz, mais aussi régule le flux sanguin en fonction des besoins métaboliques de chaque organe et permet la libération contrôlée des métabolites au bon moment et au bon endroit. La grande particularité de ce système est l'endothélium, la couche cellulaire qui recouvre la paroi interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques, qui les transforme en un système actif au-delà de simples tuyaux (Monahan-Earley et al., 2013). Tout au long de ce chapitre, nous discuterons en profondeur sur les CE, leur origine embryonnaire et les différents rôles de ces cellules dans la formation et le maintien des vaisseaux sanguins et lymphatiques, mais aussi dans d'autres processus physiologiques et pathologiques tels que l'inflammation ou l'organogénèse.

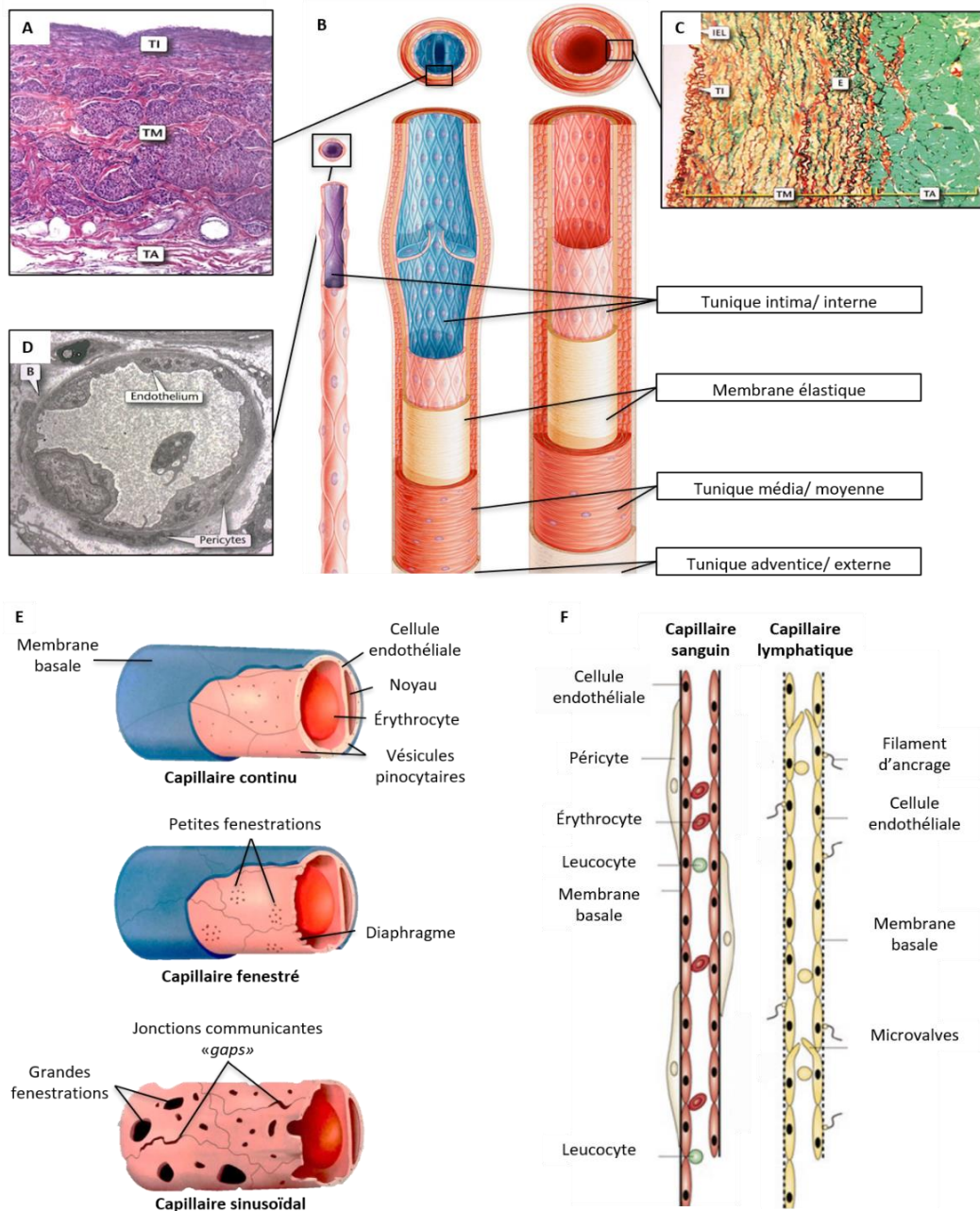


Figure 7. Structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques. A. C. et D. Les structures des vaisseaux sanguins sont présentées sur des coupes histologiques H/E de la veine cave (A) et sur des coupes histologiques de l'artère subclavière avec une coloration au trichrome Van Gieson (C) (Kerr 2010). À la différence des grands vaisseaux, les capillaires contiennent uniquement la TM. L'image au microscope électronique d'un capillaire met en évidence la présence de l'endothélium autour du lumen, de l'ECM ou membrane basale (B) et des péricytes à l'extérieur du capillaire (D) (Kerr 2010). **B.** Schéma représentatif de la structure des trois grands groupes des vaisseaux sanguins : les capillaires en violet, les veines en bleu et les artères en rouge. Les veines et les artères partagent une structure similaire composée de trois couches : la tunique intima (TI) ou interne, la tunique media (TM) ou moyenne et la tunique adventice (TA) ou externe (*schéma modifié et traduit d'après Kja-artists*). Une membrane élastique (E) délimite les TI et les TM. **E.** Les capillaires sanguins sont classifiés en capillaires continus, fenestrés ou sinusoidaux. Ces deux dernières se caractérisent par la présence de petits et de grands pores ou fenestrations, respectivement (Kerr 2010). **F.** À la différence des capillaires sanguins, les capillaires lymphatiques n'ont pas une membrane basale continue. Ils ne sont pas entourés par des péricytes mais ils sont stabilisés par des filaments d'ancrage qui sont attachés au tissu conjonctif. Les CE ont des prolongements vers le lumen des capillaires qui forment des microvalves ou valvules (Jones et al. 2001).

2.2. Anatomie et physiologie des vaisseaux sanguins et lymphatiques

Comme il a été mentionné précédemment, le système vasculaire des mammifères est un système clos. Le sang oxygéné est transporté du cœur vers les différents organes et tissus par les artères qui se ramifient dans tout le corps en artères de plus petite taille. Les artères les plus petites, ou artérioles, sont connectées aux capillaires sanguins où s'effectuent les échanges de nutriments et de gaz entre le sang et les tissus. Après son passage par les capillaires, le sang désoxygéné circule dans les veinules puis dans les veines pour converger au cœur. Ce sang désoxygéné est transporté du cœur vers les poumons par l'artère pulmonaire, où a lieu les échanges gazeux entre les capillaires sanguins et les alvéoles pulmonaires. À l'issue de ces échanges, le sang, de nouveau oxygéné, retourne au cœur par la veine pulmonaire pour, ensuite, être distribué à tout l'organisme (Hantusch, 2019).

Bien qu'il s'agisse d'un système vasculaire clos, il y a souvent un excès de liquide interstitiel dans les tissus. Le système vasculaire lymphatique est le responsable du drainage de cet excès de liquide et de son retour dans la circulation sanguine. Contrairement au système vasculaire sanguin, le système vasculaire lymphatique est ouvert et unidirectionnel. Les fluides, les protéines plasmatiques et même certaines cellules sont extravasés des tissus vers les capillaires lymphatiques qui se déversent dans des plus gros vaisseaux lymphatiques, puis dans des vaisseaux collecteurs, dans des gros troncs lymphatiques et finalement, dans un des deux canaux thoraciques qui rejoignent le flux sanguin à travers la veine sous-clavière droite et gauche. Tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques ont en commun une couche cellulaire recouvrant leur paroi interne : l'endothélium ou tunique interne. Cependant, les différences de fonctionnalité se traduisent par une différence anatomique tel qu'il sera décrit dans les sections suivantes (Hantusch, 2019).

2.2.1. Les artères

Les artères sont les vaisseaux responsables du transport du sang du cœur vers les organes. Elles sont soumises à une pression sanguine plus élevée que tout autre vaisseau sanguin, cette pression étant plus élevée dans les artères les plus proches du cœur (*e.g.* l'aorte ou l'artère pulmonaire). Ces vaisseaux sanguins sont donc une structure adaptée à ce débit sanguin. En effet, la paroi des artères et artérioles est constituée de 3 tuniques entourant le lumen : l'intima, la média et l'adventice. La tunique intima ou interne est une fine couche de CE en contact direct avec le sang. On l'appelle également endothélium. La tunique moyenne est, à l'inverse, une épaisse couche de muscle lisse nommée tunique moyenne qui entoure la tunique interne et la membrane basale (une couche de fibres élastiques présente autour des CE). La tunique moyenne est responsable de leur vasomotricité. Son épaisseur varie selon le type d'artère et dans le cas des artères élastiques, comme l'aorte, elle

peut également contenir des couches d'élastine et de collagène. Cette couche est recouverte par une couche de tissu conjonctif, la tunique externe ou adventice, composée principalement de fibres de collagène et d'élastine (Figure 7). Les artères se ramifient tout au long du corps en artères plus petites et par conséquent, leur diamètre interne ainsi que l'épaisseur de la paroi varient considérablement. Les artères les plus grandes ont un diamètre interne des quelques centimètres avec une épaisseur de la paroi de quelques mm tandis que les artérioles les plus petites peuvent avoir une lumière d'environ 30 μm et une paroi de 10 à 20 μm (Tableau 7) (Hantusch, 2019; Kerr, 2010).

2.2.2. Les veines

Contrairement aux artères, les veines ramènent le sang de tous les organes et tissus du corps humain au cœur. Le flux sanguin s'effectue principalement contre la force de gravité. Pour éviter le reflux, la tunique interne de ces vaisseaux s'étend avec la membrane basale vers l'intérieur du lumen, générant ce que l'on appelle des valvules veineuses. Les veines sont généralement plus fines que les artères, avec une tunique moyenne plus réduite et une couche externe plus importante. Comme les artères, les veines se ramifient en veines plus petites (Figure 7). La gamme de diamètre interne varie entre 3 cm pour les plus grosses veines (*e.g.* la veine cave) et quelques micromètres pour les veinules ($\approx 500 \mu\text{m}$), avec une épaisseur de paroi comprise entre 1-1,5 mm et 2-5 μm (Tableau 7) (Hantusch, 2019; Kerr, 2010).

2.2.3. Les vaisseaux lymphatiques

Les vaisseaux lymphatiques partagent des caractéristiques anatomiques avec les veines. Ils sont constitués par les trois tuniques, interne, moyenne et externe et contiennent également des valvules à l'intérieur qui empêchent le reflux de la lymphe. Cependant, à la différence des veines, la paroi des vaisseaux lymphatiques est plus fine et les microvalves sont plus fréquentes dans le lumen. Tout au long des vaisseaux lymphatiques, il existe des structures uniques à ce système, les nœuds lymphatiques ou ganglions lymphatiques. Ces nœuds sont des unités de filtration contenant des macrophages qui phagocytent des déchets, des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules immunitaires (lymphocytes B et T) (Hantusch, 2019; Kerr, 2010).

2.2.4. Les capillaires sanguins

Les capillaires sanguins sont responsables de l'échange gazeux et de la distribution des nutriments à tous les tissus du corps humain. En moyenne, les cellules de l'organisme sont à moins de 10 μm du capillaire sanguin le plus proche. Contrairement aux artères et aux veines, ces vaisseaux sanguins ne sont pas entourés d'une tunique moyenne ou d'une tunique externe et sont

principalement composés de la tunique interne recouverte par une membrane basale. Lors de la formation des nouveaux capillaires, dans la plupart des cas, des cellules d'origine mésenchymateuse, les péricytes, se différencient en cellules musculaires lisses et/ou en fibroblastes tout autour de ces vaisseaux pour les stabiliser. Le diamètre interne des capillaires est, en moyenne, de 5 μm et l'épaisseur de leur paroi est d'environ 1 μm (Tableau 7). Le flux sanguin et la pression à l'intérieur des capillaires sont régulés par les artérioles et les sphincters précapillaires, d'origine musculaire, situés entre la transition artériole-capillaire.

Étant donné que les organes et les tissus n'ont pas tous les mêmes besoins énergétiques, les capillaires sanguins ont des caractéristiques morphologiques qui leur permettent de répondre aux besoins du tissu où ils se localisent. Dans le système nerveux central, le lit capillaire du cerveau forme la barrière hémato-encéphalique caractérisée par un endothélium continu avec des jonctions étanches entre les cellules grâce à l'expression de protéines de membrane telles que les occludines, les claudines et les cadhérines. Cette barrière étanche, limite le transport paracellulaire, c'est-à-dire, le transport des molécules dissoutes dans l'eau à travers les espaces intercellulaires. En revanche, l'endothélium possède des transporteurs dans la membrane plasmique (*e.g.*, les transporteurs ATP-dépendants ou les transporteurs ABC de l'anglais « *ATP-binding cassette transporters* ») qui permettent le transport actif des nutriments tout en empêchant le passage de substances toxiques, protégeant ainsi le tissu cérébral. Dans d'autres organes tels que le foie ou les reins, qui assurent les fonctions de détoxification et d'élimination des déchets du métabolisme cellulaire, ou dans d'autres organes qui nécessitent le transport de grosses molécules depuis ou vers la circulation sanguine (*e.g.* la rate ou la moelle osseuse), l'endothélium présente des perforations transcellulaires ou des pores, avec ou sans diaphragme (*i.e.* fine membrane). Chez les glomérules du rein, l'intestin ou les glandes sécrétoires, l'endothélium est dit fenestré, avec de petits pores à diaphragme et recouvert par une membrane basale continue. Dans le foie, la rate ou la moelle osseuse, les capillaires, aussi dits sinusoïdes, contiennent des pores plus larges sans diaphragme et se caractérisent par la présence réduite de la membrane basale, absente dans certains cas (Figure 7) (Hantusch, 2019; Kerr, 2010).

2.2.5. Les capillaires lymphatiques

Bien que pendant longtemps les capillaires lymphatiques soient restés peu étudiés, on sait aujourd'hui qu'ils sont morphologiquement différents des capillaires sanguins. Les capillaires lymphatiques sont généralement plus gros, avec un diamètre qui varie entre 10 et 75 μm et peuvent atteindre entre 100 et 500 μm une fois qu'ils sont remplis de fluide interstitiel. La membrane basale est discontinue et peut même être absente. À la différence des capillaires sanguins, les capillaires lymphatiques ne sont pas entourés de péricytes. En revanche, les CE lymphatiques se projettent dans

et hors des capillaires. À l'intérieur, ces projections forment des microvalves qui empêchent le reflux de la lymphe. À l'extérieur, les CE sont ancrées au tissu conjonctif par des filaments d'ancrage, composés principalement de glycoprotéines et de fibrilline, qui contribuent à les stabiliser et à empêcher leur effondrement. Les projections vers l'extérieur créent également des espaces intercellulaires, avec jonctions étanches réduites, ce qui leur confère une grande perméabilité contrairement aux capillaires sanguins continus (Figure 7) (Hantusch, 2019; Kerr, 2010).

2.3. La cellule endothéliale

Tel qu'il a été décrit dans la section précédente, les CE recouvrent les parois internes de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques des vertébrés. *In vitro*, les CE humaines présentent une morphologie en pavé (en anglais « *cobblestone* »). *In vivo*, leur taille et leur morphologie varient en fonction du vaisseau sanguin. Par exemple, la largeur des cellules de l'artère iliaque est, approximativement, de $13,2 \pm 4,1 \mu\text{m}$ et leur longueur de $25,8 \pm 8,5 \mu\text{m}$, tandis que la largeur des cellules de l'artère hépatique est de $4,9 \pm 1,5 \mu\text{m}$ et leur longueur de $21,9 \pm 6,6 \mu\text{m}$ (Garipcan et al., 2011).

Tableau 7. Différences structurelles entre les types des vaisseaux sanguins. Traduit de Kerr 2010.

Vaisseau sanguin	Diamètre	Épaisseur de la paroi du vaisseau
<i>Aorte</i>	2,5 cm	2 mm
<i>Artères élastiques</i>	1 cm	1 mm
<i>Artères musculaires</i>	0,5-10 mm	0,5 mm
<i>Artérioles</i>	30-200 μm	10-20 μm
<i>Capillaires</i>	<10 μm	<1 μm
<i>Veinules</i>	>500 μm	2-5 μm
<i>Veines</i>	1-10 mm	0,5 mm
<i>Veine cave</i>	3 cm	1,5 mm

Au niveau moléculaire, malgré la grande hétérogénéité de ce lignage cellulaire, les CE peuvent être identifiées par l'expression d'un panel de protéines spécifiques principalement membranaires mais également cytoplasmiques (Marcu et al., 2018). L'un des marqueurs le plus utilisé pour identifier les CE est la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine, de l'anglais « *vascular endothelium-cadhérine* »), aussi dite cluster de différenciation 144 (CD144), codée par le gène humain *CDH5*. La VE-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion cellulaire par la formation de liaisons homophiliques et est donc essentielle au maintien de la

barrière vasculaire (Corada et al., 1999; Gory et al., 1999). Sa phosphorylation induite, entre autres, par le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF, de l'anglais « *vascular endothelial growth factor* ») ou le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α , de l'anglais « *tumor necrosis factor* »), entraîne une perte de l'adhérence entre les CE provoquant ainsi l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Abedi and Zachary, 1997; Angelini et al., 2006). Dans les interactions intercellulaires, il se trouve également la molécule d'adhésion endothéliale et des plaquettes 1 (PECAM-1 de l'anglais « *platelet endothelial cell adhesion molecule* » ou CD31) (Newman et al., 1990). Cette glycoprotéine transmembranaire contribue à la formation de la barrière endothéliale et à la diapédèse ou migration extravasculaire des leucocytes au cours du processus inflammatoire (Newman et al., 1990). Dans ce processus, la présence de molécules pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , régule aussi dans les CE l'expression de deux glycoprotéines appartenant à la sous-famille des immunoglobulines, la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1 de l'anglais « *intercellular adhesion molecule 1* » ou CD54) et la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1 de l'anglais « *vascular cell adhesion protein 1* » ou CD106) qui se lient aux intégrines présentes dans les membranes des leucocytes et des lymphocytes (Kanda et al., 1998) (voir 2.5.4. *L'endothélium et l'inflammation*). Enfin, le récepteur 2 du VEGF (VEGFR-2 de l'anglais « *vascular endothelial growth factor receptor* » ou KDR de l'anglais « *kinase insert domain receptor* ») appelé aussi CD309 est, sans aucun doute, l'un des récepteurs des CE le plus caractéristique en raison de son implication dans le développement embryonnaire (voir 2.4.1. *La vasculogénèse*) et dans la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (voir 2.4.2. *L'angiogénèse*). Il participe aussi à des processus tels que la migration et la prolifération de ce lignage cellulaire (Shalaby et al., 1995). La voie de signalisation médiée par les angiopoïétines 1 et 2 (Ang-1 et Ang-2) joue également un rôle important dans la différenciation et la stabilité endothéliale (ou quiescence des CE matures). Leur récepteur commun appelé TIE-2 (de l'anglais « *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* »), codé par le gène *TEK* (tyrosine kinase endothéliale, de l'anglais « *TEK tyrosine kinase, endothelial* »), est principalement exprimé à la membrane des CE et par conséquent, utilisé pour leur identification (Suri et al., 1996). De même, la protéine CD34, associée principalement au phénotype hématopoïétique, a été aussi identifiée dans les CE de la plupart des vaisseaux sanguins, à l'exception des gros vaisseaux sanguins et des capillaires sinusoidaux du placenta (Fina et al., 1990). Néanmoins, différentes études sur les CE humaines provenant de la veine du cordon ombilical (HUVEC de l'anglais "*human umbilical vein endothelial cells*"), de la moelle osseuse et du SCO, décrivent l'expression du CD34 pendant les premières semaines de culture *in vitro* et sa diminution au fil des passages et suggèrent que le CD34 ne pourrait identifier qu'une sous-population de progéniteurs endothéliaux (Asahara et al., 1997; Ingram et al., 2004; Yoder, 2009).

Des protéines spécifiques aux CE ont aussi été décrites à l'intérieur de leur cytoplasme. Le facteur de von Wildebrand (vWF) est une glycoprotéine stockée dans des granules de stockage appelés corps de Weibel-Palade. Elle est sécrétée dans la circulation sanguine, notamment par les CE, et participe à l'hémostase en recrutant les plaquettes et en transportant le facteur de coagulation VIII dans le sang (Wagner and Marder, 1984). De même, l'enzyme du type oxyde nitrique synthase (eNOS de l'anglais "*endothelial nitric oxide synthase*" ou NOS-3) spécifique aux CE, qui, comme son nom l'indique, synthétise l'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine et de l'oxygène, participant ainsi à la régulation du tonus vasculaire (Heiss et al., 2015) (voir 2.5. *Rôles de l'endothélium dans l'organisme*).

Dans l'endothélium lymphatique, les CE expriment, en plus, le récepteur 3 du VEGF (VEGFR-3), le récepteur 1 de l'hyaluronane endothélial du vaisseau lymphatique (LYVE-1, de l'anglais « *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* »), la podoplanine et le facteur de transcription PROX-1 (de l'anglais « *prospero homeobox protein 1* ») (Hantusch, 2019).

Finalement, il convient de noter qu'un bon nombre des marqueurs endothéliaux mentionnés ci-dessus sont exprimés aussi par d'autres types cellulaires. C'est le cas du CD31 ou du vWF exprimé par les plaquettes et certaines cellules hématopoïétiques. C'est pourquoi, l'identification des CE nécessite l'observation, à la fois, de plusieurs marqueurs endothéliaux et l'absence de marqueurs hématopoïétiques tels que CD45 ou CD43 (leucosialine), ainsi que la constatation de la fonctionnalité propre à l'endothélium (voir 2.5. *Rôles de l'endothélium dans l'organisme*).

2.3.1. Les progéniteurs endothéliaux

En 1997, Asahara *et al.* ont isolé et caractérisé *in vitro* une population de CE humaines jusqu'alors inconnues, les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) (Asahara et al., 1997). Cette population CD34⁺CD309⁺, présente dans la fraction de cellules mononuclées du sang périphérique des individus adultes, cultivée sur une matrice de collagène, donne lieu à des CE ayant des caractéristiques progénitrices (Asahara et al., 1997). Notamment, en plus d'exprimer les marqueurs endothéliaux CD31, E-selectin, eNOS et d'endocyter les lipoprotéines de basse densité (LDL de l'anglais « *low density lipoprotein* »), les PEC ont une forte capacité de prolifération et participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans des modèles d'ischémie des membres inférieurs chez la souris et le lapin (Asahara et al., 1997; Kalka et al., 2000). Cette étude a été également cruciale pour révéler la capacité à former un réseau sanguin *de novo* chez les mammifères adultes, un phénomène qui était considéré limité aux premiers stades du développement embryonnaire. Des études ultérieures ont identifié la moelle osseuse comme le principal réservoir des PEC, qui sont mobilisés via le sang en réponse aux lésions vasculaires signalées par des cytokines, telles que le

facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de monocytes (GM-CSF de l'anglais « *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ») (Takahashi et al., 1999). De même, les PEC ont été isolées à partir de la moelle osseuse humaine et du SCO (Bompais et al., 2004; Ingram et al., 2004). Cette dernière source s'est révélée abondante en PEC avec des caractéristiques clonogéniques et angiogéniques *in vitro* et *in vivo* plus importantes que celles des PEC provenant du sang périphérique adulte (Au et al., 2008; Ferratge et al., 2017a).

Depuis la publication de Asahara *et al.*, différents protocoles d'isolement des PEC ont été publiés par différents équipes (Bompais et al., 2004; Hill et al., 2003; Ponio et al., 2014; Urbich et al., 2003). L'absence de marqueurs spécifiques de cette population rend leur identification et leur comparaison entre laboratoires difficiles (Medina et al., 2017). En effet, l'une des populations identifiées comme PEC correspond aux cellules hématopoïétiques myéloïdes qui favorisent l'angiogenèse de manière paracrine (appelées cellules progénitrices endothéliales précoces ou cellules angiogéniques myéloïdes circulantes) (Urbich et al., 2003) contrairement aux PEC d'origine endothéliale (appelées cellules progénitrices tardives ou CE formant des colonies, ECFC de l'anglais « *endothelial colony forming cell* ») qui participent activement à la formation des vaisseaux sanguins et sont incorporées dans la tunique interne des vaisseaux sanguins (Critser and Yoder, 2010). Récemment, les marqueurs de cellules souches, tels que l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (Nagano et al., 2007) ou le phénotype SP (de l'anglais « *side population* ») identifié par l'efflux de colorants (*e.g.* hoechst) médié par les pompes ABC (Iba et al., 2019; Wakabayashi et al., 2018), ont été identifiés dans les PEC et les CE recouvrant les parois des vaisseaux sanguins. Ces études suggèrent que les PEC ayant une activité aldéhyde déshydrogénase plus faible contribueraient davantage à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins que les PEC ayant une activité enzymatique plus élevée (Nagano et al., 2007). De plus, ces techniques ont également permis d'identifier la présence de progéniteurs dans les parois des vaisseaux sanguins (Iba et al., 2019), ouvrant le débat sur l'origine des PEC qui seraient exclusivement dérivés de la moelle osseuse (comme les progéniteurs hématopoïétiques) ou qui résideraient dans les parois des vaisseaux sanguins et migreraient lors d'une lésion vasculaire. Si cette dernière hypothèse est vraie, elle soulèverait de nouvelles questions : existe-t-il des zones de vasculogenèse contenant une concentration plus élevée de progéniteurs endothéliaux ? Toutes les CE ont-elles la capacité de devenir des PEC ou cette population est-elle déterminée dès le développement embryonnaire et maintenue tout au long de la vie adulte par une niche, comme c'est le cas des CSH ? Les PEC circulants ont-ils les mêmes propriétés progénitrices et angiogéniques que les progéniteurs résidants ?

2.4. Développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques

Le système vasculaire est le premier système fonctionnel à se former chez les mammifères, pendant la troisième et la quatrième semaine de gestation chez l'homme et autour du jour embryonnaire (E) 8 chez la souris. Les progéniteurs dérivés du mésoderme migrent vers le sac vitellin où ils forment les îlots sanguins, des agrégats de progéniteurs hémato-endothéliaux qui se différencient, à l'intérieur, en cellules hématopoïétiques et à l'extérieur, en progéniteurs endothéliaux également appelés angioblastes (Huber et al., 2004; Sabin, 1920). Les îlots sanguins convergent pour former le plexus capillaire primitif extra-embryonnaire entre les jours 13 et 15 du développement intra-utérin chez l'homme et vers le E8 chez la souris (Drake and Fleming, 2000). À l'intérieur de l'embryon, les angioblastes dérivés du mésoderme latéral, splanchnopleure et somatopleure (Ambler et al., 2001; Asai et al., 2017; Pardanaud et al., 1996), forment le plexus intra-embryonnaire primitif vers les jours 15 et 17 du développement intra-utérin chez l'homme et entre E8 et E8.5 chez la souris (Figure 8). Les plexus extra et intra-embryonnaires se prolongent et se différencient, formant les premières veines et artères du système vasculaire qui seront reliées au tube cardiaque pour permettre le flux sanguin. À la fin du premier mois de grossesse chez les humains et autour du E9.5, chez la souris, l'embryon possède déjà la veine et l'artère vitelline, la veine et l'artère ombilicale, l'aorte dorsale et ventrale et la veine cardinale (Strilić et al., 2009; Walls et al., 2008). Le remodelage de l'arbre vasculaire se poursuit avec la création de nouvelles branches, et la fusion et la régression d'autres. L'aorte dorsale en est un exemple de ce phénomène. Chez les embryons de souris, deux aortes dorsales primitives sont observées sous la plaque latérale mésodermique à E8. Ces deux vaisseaux migrent vers l'axe central de l'embryon puis fusionnent en une seule aorte dorsale à E9,5 (Strilić et al., 2009).

Une fois le système vasculaire sanguin établi, le système lymphatique commence à se former à partir des veines cardinales et intersomatiques à E9-E9,5 chez la souris et à partir de la sixième semaine du développement intra-utérin chez l'homme (Alitalo et al., 2005; Srinivasan et al., 2007). Les CE des veines migrent hors du vaisseau sanguin où elles se différencient en sacs lymphatiques primitifs à partir desquels se formeront la plupart des vaisseaux et des ganglions lymphatiques (Srinivasan et al., 2007).

2.4.1. La vasculogénèse

La vasculogénèse est le processus par lequel les vaisseaux sanguins sont formés *de novo* à partir de progéniteurs endothéliaux, les angioblastes, au cours des premières semaines du développement embryonnaire chez les vertébrés (Risau et al., 1988). Ces angioblastes convergent en désignant un plexus vasculaire *in situ*, dans le cas de la vasculogénèse de type I (*e.g.* formation de l'aorte), ou

migrent vers d'autres sites que leur site d'origine, dans le cas de la vasculogénèse de type II (e.g. formation de l'endocarde ou du plexus neural). Bien que ce processus soit couramment décrit au cours des premiers stades du développement embryonnaire, il a également été observé chez les adultes, où des progéniteurs endothéliaux sont mobilisés dans le sang jusqu'aux sites qui requièrent

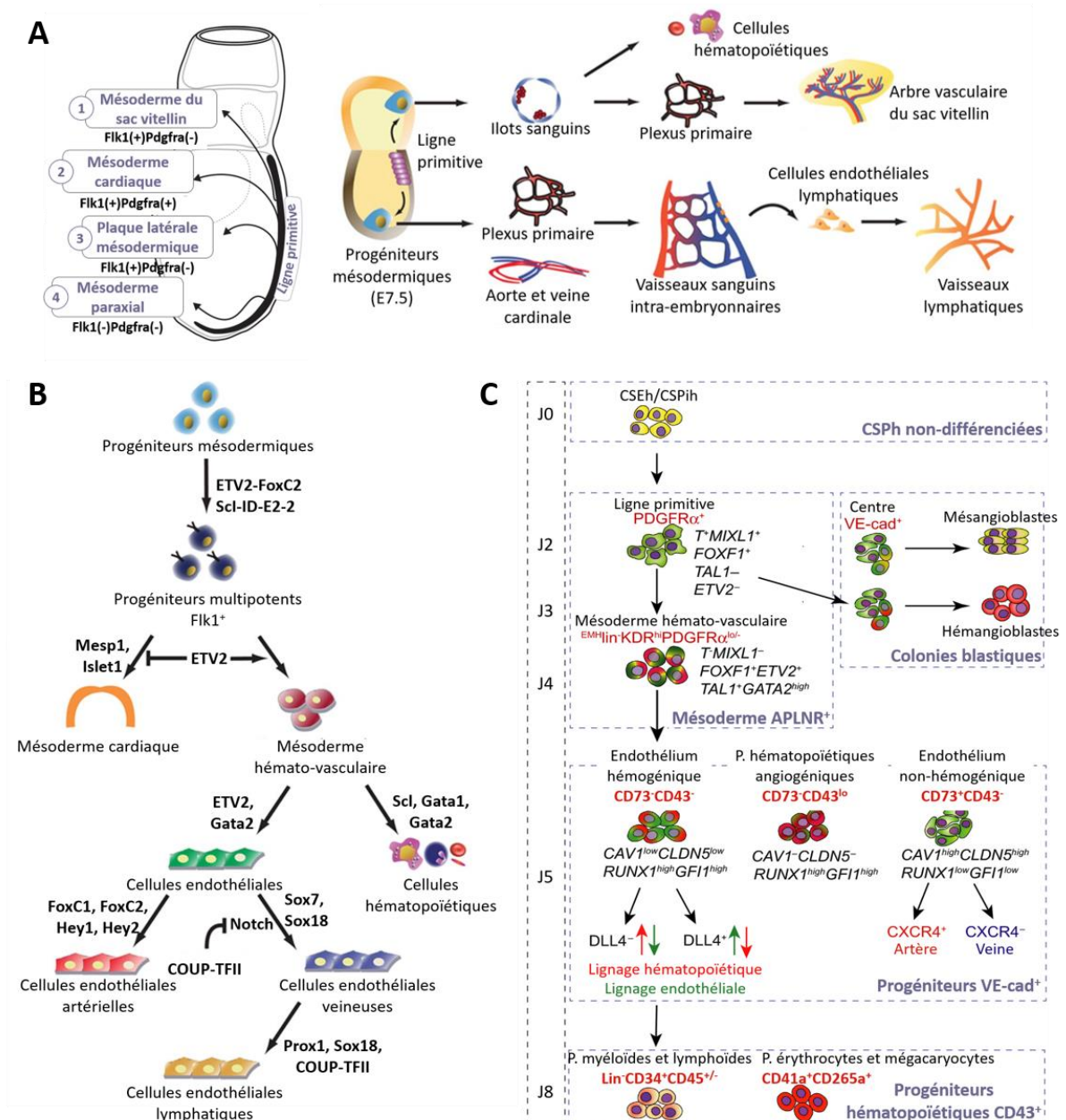


Figure 8. Développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques. A. Les CE dérivent des progéniteurs $Flk1^+PDFGR-\alpha^+$ du mésoderme, du sac vitellin et de la plaque latérale mésodermique. Les progéniteurs endothéliaux, aussi dits angioblastes, convergent en formant des plexus capillaires extra- et intra-embryonnaires qui donneront lieu aux vaisseaux sanguins. Le système lymphatique émerge à partir des CE des veines cardinales. Traduit et adapté de Koyano-Nakagawa et Garry 2017 et Park et al. 2013. B. La spécification du mésoderme en angioblastes, et plus tard, en CE matures des veines et artères est contrôlé par l'expression des facteurs de transcription tels que ETV2, GATA2, SCL, SOX7, SOX18, entre autres tel qu'il est indiqué dans le schéma. Traduit de Park et al. 2013. C. Chez l'homme, la séquence du développement des vaisseaux sanguins a pu être constatée grâce à la différenciation des CSP. Traduit de Slukvin 2016.

la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (Asahara, 1997; Takahashi et al., 1999).

2.4.1.1. Mécanismes moléculaires du développement des vaisseaux sanguins

Comme mentionné précédemment, les angioblastes ont leur origine dans le mésoderme. Chez la souris, la gastrulation commence à E6,25 grâce à l'expression de la protéine morphogénétique osseuse de type 4 (BMP-4, de l'anglais « *bone morphogenetic protein 4* ») par l'épiblaste et l'ectoderme extra-embryonnaire (Ramkumar and Anderson, 2011). La BMP-4 agit sur l'épiblaste postérieur, précurseur de la ligne primitive et induit l'expression du ligand WNT3 (de l'anglais « *wingless et integration site* »). Une fois la ligne primitive établie, WNT3 régule l'expression du facteur de transcription *Brachyury* (également appelé facteur T), qui appartient à la famille des T-box et est essentiel pour la spécification des précurseurs mésodermiques (Fujimoto and Yanagisawa, 1984; Wilkinson et al., 1990). L'action conjointe de la BMP-4 (Huber et al., 1998; Marom et al., 2005), du facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF ou FGF-2 de l'anglais « *basic fibroblast growth factor* ») (Huber et al., 1998; Karabagli et al., 2002; Pearson et al., 2008), de l'activine (Cornell and Kimelman, 1994; Flamme and Risau, 1992; Huber et al., 1998; Mitrani et al., 1990) et de la voie WNT (Kelly et al., 2004; Lindsley et al., 2006; Sumi et al., 2008; Tam and Loebel, 2007) permet la migration et la spécification du mésoderme naissant en mésoderme extra-embryonnaire (sac vitellin), mésoderme cardiaque, mésoderme paraxial et en plaque latérale mésodermique (Parameswaran and Tam, 1995). Palpant *et al.* ont démontré à partir de la différenciation des CSEh, que de fortes doses d'activine (100 ng/ml) associées à des doses réduites de BMP-4 (5 ng/ml) induisaient la formation du mésoderme cardiaque, tandis que faibles doses d'activine (50 ng/ml) en présence de fortes doses de BMP-4 (40 ng/ml) généraient un mésoderme hémogénique (Palpant et al., 2015). De même, la présence de la BMP-4 et de la voie WNT a été démontrée nécessaire à la spécification de CSP dans le mésoderme latéral, contrairement au mésoderme paraxial, différencié en absence de BMP-4 (Tanaka et al., 2009).

Chez la souris, lors de la spécification du mésoderme et autour de E7.0, l'expression du facteur de transcription ETV2 (variante d'ETS 2, de l'anglais « *ETS variant transcription factor 2* »), appartenant à la famille des facteurs ETS (E-vingt-six spécifique, de l'anglais « *E-twenty-six specific* »), marque le début du mésoderme vasculaire (Koyano-Nakagawa et al., 2012; Rasmussen et al., 2011). Bien que tous les mécanismes d'action de ce facteur de transcription ne soient pas connus, la différenciation héματο-vasculaire des CSEm a permis de positionner l'action de l'ETV2 sous le contrôle des voies de signalisation du BMP-4, WNT et Notch (Lee et al., 2008). Différentes études suggèrent que l'ETV2 induit la différenciation d'une population mésodermique caractérisée par le VEGFR-2 (FLK1 chez la souris, de l'anglais « *fetal liver kinase 1* ») (Ferdous et al., 2009; Kataoka et al., 2011; Lee et al., 2008; Rasmussen et al., 2011). En effet, les embryons de souris exemptés de ETV2

(*Etv2*^{-/-}) meurent autour de E9,5 en l'absence de vaisseaux sanguins, de cellules sanguines et de l'endocarde (Lee et al., 2008), un phénotype similaire à celui observé chez les souris *Flk1*^{-/-} (Shalaby et al., 1995). L'ETV2 participe également à l'activation de gènes endothéliaux, seuls ou avec le facteur de transcription FOXC2 (de l'anglais « *forkhead box protein C2* »), tels que la VE-cadhérine, TIE-2 (de l'anglais « *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* »), PECAM-1, SOX7, NRP1, NRP2 (neuropiline), entre autres (Behrens et al., 2014; Ferdous et al., 2009; Lee et al., 2008; Robinson et al., 2014), entre E7.0 et E11.5, le moment à partir duquel il n'est plus exprimé par les CE et il est remplacé par d'autres facteurs de transcription de la famille ETS (Koyano-Nakagawa et al., 2012; Rasmussen et al., 2011).

Le mésoderme *VEGFR-2*⁺ (*Flk1*⁺) est également un précurseur du mésoderme cardiogénique. Le facteur de transcription nécessaire pour son établissement, NKX2-5 (de l'anglais « *NK2 homeobox 5* »), est aussi induit par l'expression d'ETV2 (Ferdous et al., 2009). Cependant, ETV2 inhibe la différenciation du lignage cardiogénique mais permet la formation de l'endocarde à partir de celle-ci (Liu et al., 2012; Rasmussen et al., 2011). À la fin de la spécification mésodermique, contrairement aux précurseurs cardiogéniques, les précurseurs hémato-vasculaires sont identifiés par l'absence du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes α (*PDGFR α* de l'anglais « *platelet derived growth factor receptor alpha* ») (Hirata et al., 2007; Sakurai et al., 2006). Les progéniteurs mésodermiques *VEGFR-2*⁺*PDGFR α* ⁻*ETV2*⁺ migrent vers le sac vitellin et vers différents endroits de l'embryon entre E7,25 et E8,5 où ils initient la formation des plexus vasculaires extra- et intra-embryonnaires (Koyano-Nakagawa et al., 2012; Rasmussen et al., 2011). A ce moment, les voies de signalisation médiées par le FGF-2 (Flamme and Risau, 1992; Poole et al., 2001) et le VEGF (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996) participent à la prolifération, la migration et l'acquisition du phénotype endothélial des angioblastes (Poole et al., 2001).

La famille du VEGF comprend 5 facteurs de croissance, les VEGF A, B, C, D et E, le VEGF-A étant le plus étudié à ce jour (Holmes and Zachary, 2005). Il est exprimé par plusieurs types cellulaires tout au long du développement embryonnaire (e.g. par la notochorde, l'endoderme, le tube neural et les somites) et à l'âge adulte. Il se lie aux récepteurs du VEGF-1 (FLT1, de l'anglais « *Fms-like tyrosine kinase 1* » chez la souris, *VEGFR-1* chez l'homme) et au *VEGFR-2*, présents principalement aux membranes des CE. Les embryons de souris mutants pour le VEGF-A, homozygotes (*Vegf-A*^{-/-}) ou hétérozygotes (*Vegf-A*^{+/-}), meurent précocement entre E11 et E12 (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Bien que des vaisseaux sanguins ont été décrits chez ces embryons, leur nombre était beaucoup plus réduit, avec moins de branchements par rapport aux embryons sauvages. Ce phénotype était plus évident chez les souris homozygotes (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Strilic *et al.* ont également démontré que l'absence d'un seul allèle de *Vegf-A* est suffisante

pour empêcher la formation du lumen dans l'aorte dorsale (Strilić et al., 2009) en raison de l'incapacité des CE à remodeler leur cytosquelette. Ces résultats suggèrent que le VEGF-A n'est pas nécessaire pour la spécification de l'angioblaste mais il est essentiel pour la formation des vaisseaux sanguins. En effet, le VEGF participe à la migration des angioblastes et à l'organisation de l'arbre vasculaire par chimiotactisme. La formation de l'aorte dorsale en est un exemple. Le VEGF sécrété par les somites (induit par la protéine *sonic hedgehog* de la notochorde) et par l'endoderme établit l'axe de formation de l'aorte dorsale et de la veine cardinale comme l'illustre sur la Figure 9. Cependant, la sécrétion d'antagonistes de la BMP, Noggin et Chordin, par la notochorde à ce stade empêche l'assemblage des angioblastes dans les vaisseaux sanguins, y compris l'aorte, dans la ligne centrale de l'embryon. Comme résultat, deux aortes dorsales se forment sous la plaque latérale mésodermique, parallèle à l'endoderme à E8. Puis, la diminution de l'expression de Noggin et Chordin par la notochorde entre E9 et E9,5, en présence du VEGF dans l'axe central de l'embryon induit, finalement, la fusion de la paire des aortes dans le sens antéro-postérieur (Strilić et al., 2009).

Malgré le fait que le développement des CE embryonnaires ait été principalement étudié chez le poisson-zèbre, le poulet et la souris ; chez l'homme la différenciation des CSPh a permis de confirmer

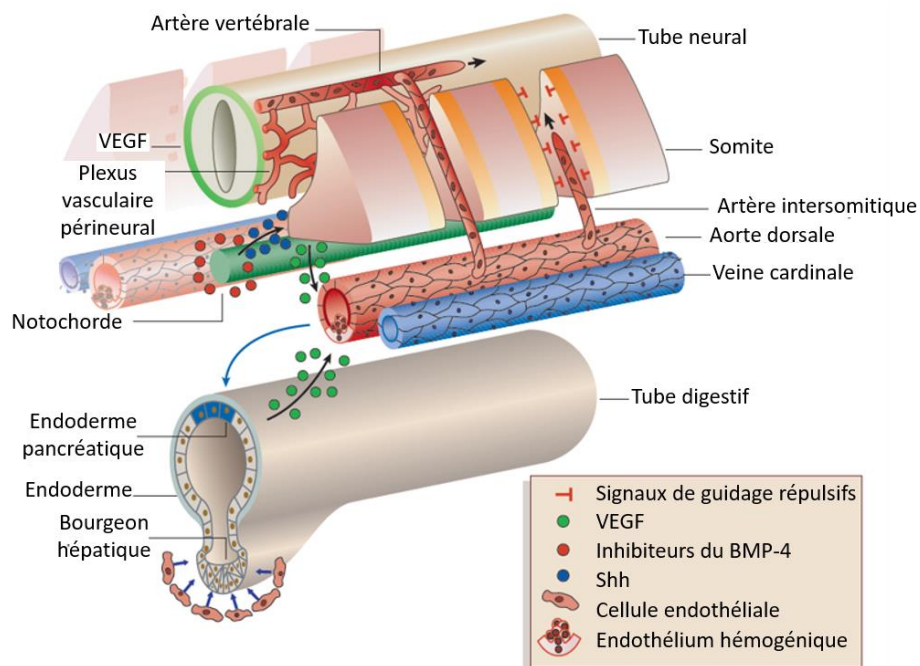


Figure 9. Positionnement des artères et veines dans l'organisme. Le VEGF sécrété par le tube neural, l'endoderme et les somites (en réponse au *Sonic hedgehog* sécrété par la notochorde) induit la formation des vaisseaux sanguins dans leurs alentours. Les signaux de guidage répulsifs des somites mènent à la formation des artères intersomatiques à partir de l'aorte dorsale en direction de l'artère vertébrale. La notochorde sécrète des inhibiteurs de la BMP-4 (Noggin et Chordin), ce qui délimite l'élongation de la paire des aortes et des veines cardinales dans les axes latéraux de l'organisme jusqu'à l'E9.5. De plus, la position des aortes et des veines cardinales, source du VEGF somitique, pourrait déterminer leur différenciation en artère et veine. Les cellules exposées à une dose plus forte de VEGF formeraient l'artère ; en revanche, les cellules plus éloignées des somites, exposées à quantités plus faibles du VEGF, donneront lieu aux veines. *Traduit de Coultas et al. 2005.*

in vitro les événements décrits ci-dessus et résumés dans la Figure 8 (Slukvin, 2013). Cependant, l'impossibilité d'étudier les embryons humains à un stade aussi précoce empêche encore la confirmation de ces événements *in vivo*.

2.4.1.2. Spécification artère/veine

Pendant plusieurs années, les forces hémodynamiques à l'intérieur des vaisseaux sanguins ont été considérées comme les principales responsables du phénotype artériel et veineux, un phénomène postérieur à la vasculogénèse (Coultas et al., 2005). Toutefois, l'identification de marqueurs de ces deux types de CE a permis de situer la différenciation artérielle/veineuse avant le début de la circulation sanguine (Coultas et al., 2005). Chez les poulets et les poissons zèbres, des sous-populations d'angioblastes exprimant le corécepteur du VEGF-A, la NRP-1 et l'éphrine B2 (EFNB2), associées au phénotype artériel et des angioblastes positifs pour la NRP-2 et le récepteur 4 de l'éphrine de type B (EPHB4), associés au phénotype veineux, ont été observés même avant la formation du plexus extra-embryonnaire (Herzog et al., 2005; Zhong et al., 2001). Dans ces spécifications, les voies de signalisation Notch et du VEGF-A jouent un rôle décisif. Des études *in vivo* chez le poisson-zèbre (Lawson et al., 2002) et la souris (Stalmans et al., 2002) et *in vitro*, à partir des CE, des cellules cardiaques murines (Mukouyama et al., 2005; Visconti et al., 2002) et des CSP murines et humaines (Lanner et al., 2007; Rosa et al., 2019), ont révélé que la présence du VEGF est suffisante pour induire un phénotype artériel. Cette induction, néanmoins, est dépendante de la concentration de ce facteur de croissance : à fortes doses (≈ 50 ng/ml), la différenciation artérielle est favorisée, tandis qu'à faibles doses ($\approx 2-10$ ng/ μ l), c'est la différenciation veineuse qui prévaut (Lanner et al., 2007; Rosa et al., 2019). La liaison du VEGF-A au VEGFR-2 induit l'expression des gènes artériels *EFNB2* et *NRP-1* (Mukouyama et al., 2005) et des protéines de la voie Notch telles que DLL4 (de l'anglais « *delta-like protein 4* ») HEY2 (de l'anglais « *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2* »), Notch1 et Notch4 (Hayashi and Kume, 2008; Seo et al., 2006). Cette activation se fait grâce à la mobilisation des facteurs de transcription FOXC1 et FOXC2 dans le noyau des CE (Hayashi and Kume, 2008; Seo et al., 2006). Le phénotype artériel est maintenu par Notch qui induit l'expression d'*EFNB2* et de la NRP-1 qui augmente l'affinité du VEGFR-2 au VEGF-A (Hayashi and Kume, 2008; Krebs et al., 2004; Seo et al., 2006).

Dans le cas des CE destinées à recouvrir l'intérieur des veines, le facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet (COUP-TFII de l'anglais « *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II* »), membre de la sous-famille des récepteurs nucléaires 2F, joue un rôle essentiel (You et al., 2005). Une fois activé, le COUP-TFII (aussi appelé NR2F2), inhibe la voie Notch et par conséquent, l'expression des marqueurs artériels, favorisant alors l'expression des marqueurs veineux EPHB4 et NRP-2 (You et al., 2005). Le facteur de transcription homeobox HOXA13

(de l'anglais « *homeobox A cluster* » (Shaut et al., 2008) et ceux appartenant à la famille SOX-F, SOX7 et SOX18 (Herpers et al., 2008; Pendeville et al., 2008), ont été également identifiés comme régulateurs du phénotype veineux. La surexpression de ces derniers augmente l'expression des marqueurs veineux FLT4 (VEGFR-4) et DAB2 (de l'anglais « *disabled homolog 2* ») et réduit l'expression des marqueurs artériels Notch3, EFNB2 et DLL4 chez le poisson zèbre (Herpers et al., 2008; Pendeville et al., 2008). Enfin, l'expression de l'éphrine B2 par les CE artérielles et de son récepteur EPHB4 dans les CE veineuses suggère une interaction entre les cellules artérielles et veineuses naissantes et l'implication de l'interaction ephrin B2-EPHB4 dans le maintien de leurs phénotypes respectifs (Wang et al., 1998). Dans ce sens, des expériences chez la souris ont démontré que les CE de la veine cave primitive ont leur origine dans une sous-population des cellules de l'aorte dorsale. De plus, le développement de cette population endothéliale veineuse et leur migration sont régulés par la voie de signalisation ephrin B2-EPHB4 (Lindskog et al., 2014).

Bien que les phénotypes artériel et veineux soient tous les deux déterminés au stade angioblaste, des greffes artério-veineux chez le poulet suggèrent que la spécification de l'endothélium peut être modifiée au cours des premiers stades du développement embryonnaire (Moyon et al., 2001), notamment par les forces hémodynamiques générées par la circulation sanguine (le Noble et al., 2004). Cette plasticité pourrait, néanmoins, diminuer au cours du développement (Moyon et al., 2001). Chez l'homme, les implants veineux destinés à remplacer des régions de l'artère réussissent à s'adapter en augmentant, par exemple, l'épaisseur de la paroi du vaisseau sanguin et en inhibant l'expression d'EPHB4, mais ils ne parviennent pas à induire l'expression du marqueur artériel EFNB2 (Nunes et al., 2011). En revanche, les PEC pourraient assurer la réparation de l'endothélium artériel et veineux en se différenciant en l'un ou l'autre type endothélial (Egorova et al., 2012; Kutikhin et al., 2020).

2.4.1.3. Lymphangiogenèse

La formation du système lymphatique, aussi appelé lymphangiogenèse, débute autour du E9 et E9,5 chez la souris et entre la 6ème et la 7ème semaine du développement embryonnaire chez l'homme, une fois que les principaux vaisseaux sanguins sont établis. Un sous-groupe des CE exprimant le facteur de transcription SOX18 dans la veine cardinale et dans les vaisseaux intersomatiques bourgeonnent vers l'extérieur du vaisseau sanguin et se différencient en CE lymphatiques (Yang et al., 2012). Cette transition est médiée par le facteur de transcription lymphatique PROX-1 activé, à la fois, par le facteur SOX18 (François et al., 2008; Wigle et al., 2002). Les CE PROX-1⁺ migrent de la veine cardinale pour former les sacs lymphatiques et puis, les vaisseaux lymphatiques. PROX-1 induit l'expression du récepteur du FGF-2, le FGFR-3 (récepteur de type 3 des FGF, de l'anglais « *fibroblast growth factor receptor 3* »), qui à son tour, permet la prolifération des

CE et induit l'expression du récepteur du VEGF-C et du VEGF-D, le VEGFR-3 (Shin et al., 2006; Wigle et al., 2002). Les CE diminuent l'expression des marqueurs veineux tels que HOXA3 et expriment les marqueurs lymphatiques tels que le récepteur de l'acide hyaluronique des vaisseaux lymphatiques (LYVE-1) (Banerji et al., 1999) et la podoplanine (Pan et al., 2014; Schacht et al., 2003). Cette dernière avec l'intégrine plaquettaire $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ permet la séparation définitive des vaisseaux lymphatiques des vaisseaux sanguins (Uhrin et al., 2006). Le facteur de transcription COUP-TFII, mentionné ci-dessus dans l'acquisition du phénotype veineux, joue également un rôle fondamental dans la différenciation des CE vers le phénotype lymphatique, en activant le facteur de transcription PROX-1 et en travaillant en synergie avec lui pour activer les gènes lymphatiques (Lee et al., 2009).

2.4.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'expansion de l'arbre vasculaire s'effectue soit par bourgeonnement (en anglais « *sprouting angiogenesis* ») de nouvelles branches vasculaires, soit par intussusception ou division des vaisseaux sanguins (en anglais « *intussusceptive angiogenesis* » or « *splitting angiogenesis* ») (Risau, 1997).

L'angiogenèse par bourgeonnement est caractérisée par la migration des CE présentes dans la paroi des vaisseaux sanguins préexistants vers les tissus voisins en réponse à des facteurs pro-angiogéniques, principalement le VEGF. Cette réponse est initiée avec la dégradation protéolytique de l'ECM de la membrane basale et des tissus voisins, suivie d'une migration par chimiotactisme des CE activées, puis de l'élongation du nouveau vaisseau sanguin et de la formation d'une lumière par

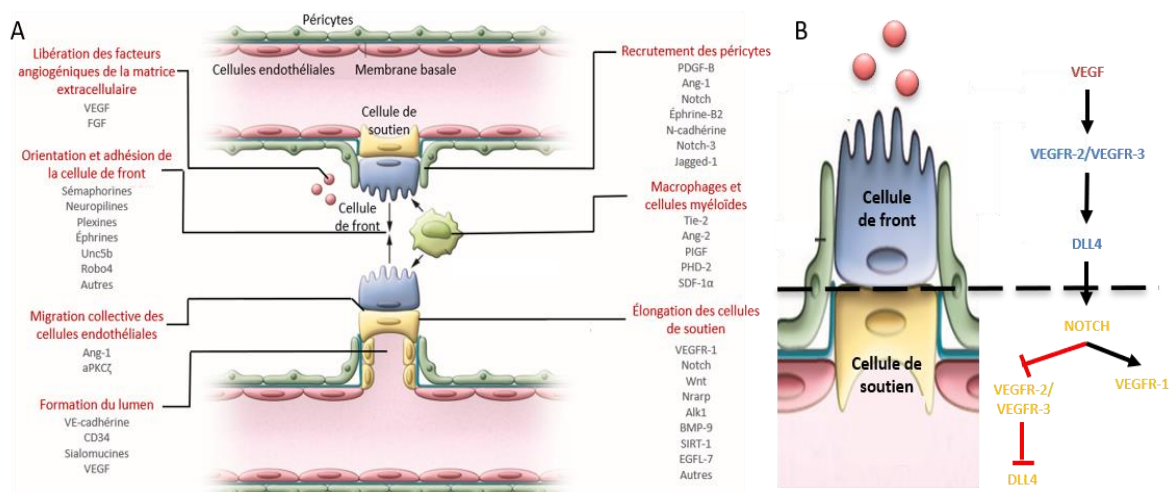


Figure 10. Schéma des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. A. Cytokines, facteurs de croissance et/ou récepteurs qui participent à la libération des facteurs angiogéniques de l'ECM, à l'orientation et l'adhésion de la cellule de front, à la migration des CE, à l'élongation des cellules de soutien, à la formation du lumen et au recrutement des péricytes. B. Détermination du phénotype de cellule de front ou cellule de soutien par la voie du VEGF/VEGFR et la voie Notch. *Figure adaptée et traduite de Welte et al. 2013.*

prolifération et réorganisation des CE (Figure 10). Enfin, la formation du nouveau vaisseau finit avec l'anastomose de celui-ci avec un capillaire voisin et la stabilisation de la lumière par recrutement de péricytes (Risau, 1997). Les CE impliquées dans ce processus nécessitent l'activation de leur cycle cellulaire et se spécialisent en cellules de front (en anglais « *tip cell* ») ou en cellules de soutien (en anglais « *stalk cells* »). Les cellules de front ont des projections cytoplasmiques longues et dynamiques, les filopodes, qui leur confèrent une capacité migratoire (Chen et al., 2019). De plus, ces cellules possèdent des protéases qui dégradent l'ECM en leur permettant le remodelage du tissu environnant et leur migration, ainsi que des récepteurs membranaires qui détectent des facteurs pro-angiogéniques et qui établissent la direction de formation du nouveau vaisseau (Figure 10). En revanche, les cellules de soutien contiennent moins de filopodes, sont très prolifératives et établissent des jonctions adhérentes et étanches entre elles, ce qui favorise l'élongation et la stabilisation de nouveaux vaisseaux sanguins (Chen et al., 2019). Aujourd'hui, il est connu que les phénotypes des cellules de front et des cellules de soutien sont transitoires et échangeables, c'est-à-dire, les cellules de soutien peuvent acquérir le phénotype des cellules de front et viceversa (Hellström et al., 2007). Toutefois, ce processus est fortement contrôlé par les voies de signalisation du VEGF et de ses récepteurs (VEGF-R) et par la voie Notch (Hellström et al., 2007; Suchting et al., 2007). Le VEGF extracellulaire se lie aux récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 des futures cellules de front où il induit l'expression du DLL4 qui interagit avec les récepteurs Notch des CE adjacentes. L'activation de la voie Notch augmente l'expression du VEGFR-1 et inhibe l'expression du VEGFR-2 et du VEGFR-3 dans les futures cellules de soutien et, par conséquent, du DLL4, ce qui rend impossible l'activation de la voie Notch dans les cellules de front (Figure 10) (Hellström et al., 2007; Suchting et al., 2007). Les cellules qui ne sont pas adjacentes aux cellules de front ne sont pas inhibées latéralement, elles sont, alors, sensibles à la présence du VEGF et peuvent devenir compétitrices des cellules du front. Une fois le nouveau vaisseau formé, les cellules de front et les cellules de soutien entrent en état de quiescence avec un phénotype mature, comme le reste des CE des vaisseaux sanguins.

Alors que l'angiogenèse par bourgeonnement est un processus abluminal, facilement observable au microscope conventionnel dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, **l'angiogenèse par intussusception** est un phénomène luminal qui a lieu à l'intérieur des vaisseaux sanguins, ce qui limite son étude (Mentzer and Konerding, 2014). Les connaissances actuelles sur ce processus trouvent leur origine dans l'étude des capillaires sanguins présents dans les alvéoles pulmonaires. La perfusion de résines qui se polymérisent à l'intérieur de la microvasculature permet d'obtenir des moules de la lumière de ces vaisseaux sanguins observables au microscope électronique. Grâce à ces techniques, des structures appelées piliers intravasculaires ont été identifiés (Burri and Tarek, 1990;

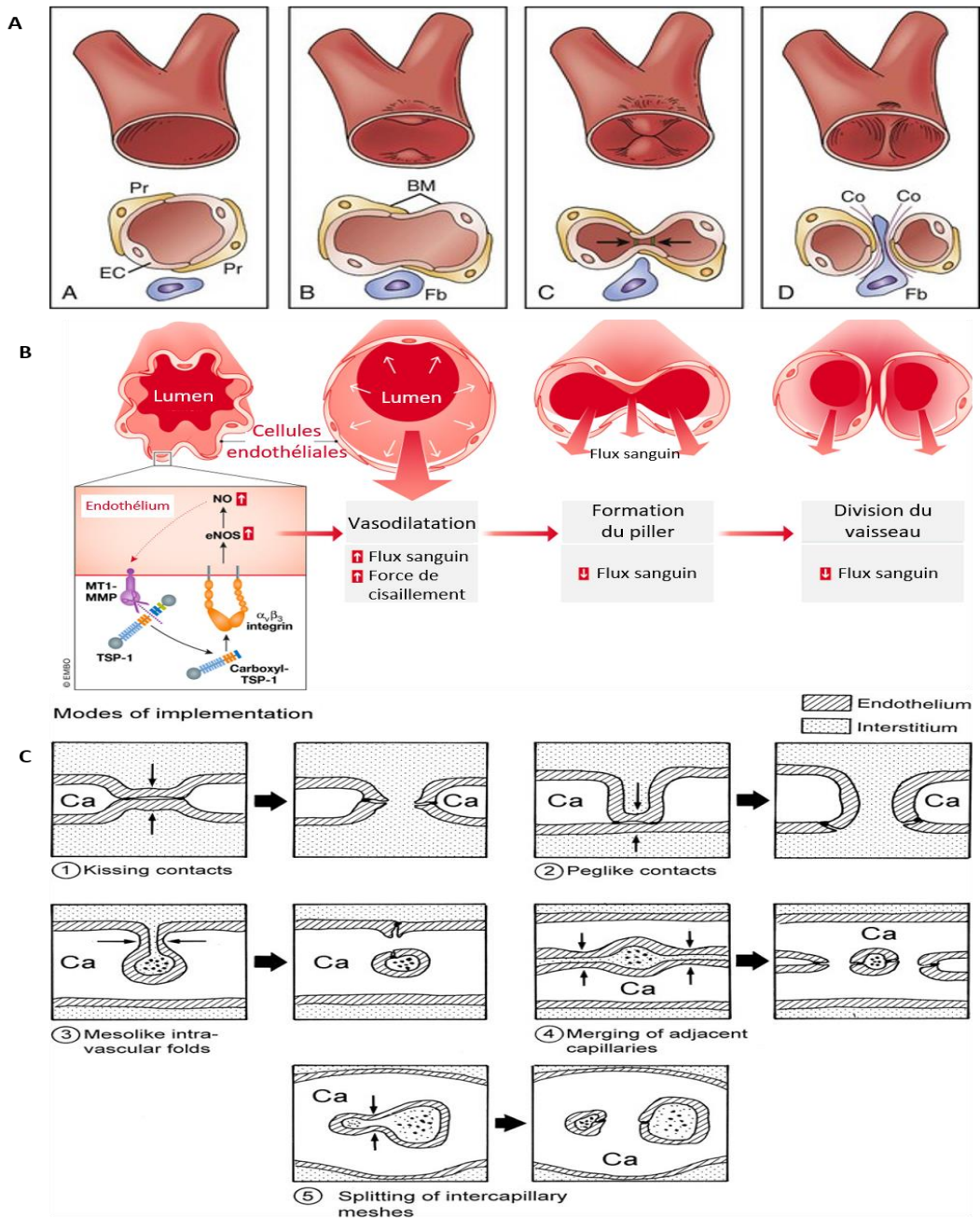


Figure 11. Angiogenèse par intussusception. **A.** Schéma représentatif des étapes conduisant à la formation d'un capillaire sanguin par intussusception. Le processus débute avec l'invagination symétrique de l'endothélium vers l'intérieur du capillaire. Les cellules endothéliales (EC) des deux cotées opposés du vaisseau se rencontrent dans le lumen pour former le pilier qui sera, ensuite, stabilisé par des protéines de la membrane basale (BM) dont le collagène (Co) et des cellules telles que les péricytes (Pr) et les fibroblastes (Fb). *ToraxiKey.com* **B.** L'angiogenèse par intussusception pourrait être déclenchée par une augmentation du flux sanguin à l'intérieur du capillaire et par conséquent, par la contrainte de cisaillement. Cette modification du flux sanguin favoriserait la production d'oxyde nitrique (NO) et la régulation de métalloprotéases dans les CE favorisant le remodelage de la membrane basale (BM) et la migration des CE. *Traduit de Esteban et al 2020.* **C.** Les différents mécanismes proposés pour la formation des piliers dont le plus connu est le « *kissing contacts* ». Il s'agit d'une invagination de l'endothélium symétrique des deux côtés opposés du capillaire sanguin (Ca). Si cette invagination est asymétrique, provenant d'un seul côté du vaisseau, il s'agit, alors, d'un pilier formé par « *peglike contacts* ». La division des vaisseaux sanguins peut aussi se produire de manière transversale à partir de l'invagination de la paroi du capillaire pour former un pilier central sans aucune connexion avec la paroi du vaisseau (« *mesolike intra-vascular folds* »). Ce pilier transversal peut être également généré par la fusion discontinue de deux capillaires adjacents (« *merging par adjacent capillaries* ») ou par l'expansion et la division de piliers préexistants (« *splitting of intercapillary meshes* »). *Burri et al. 2004.*

Burri et al., 2004; Caduff et al., 1986; Mentzer and Konerding, 2014). Ces structures sont constituées principalement par des CE avec un centre de fibres de collagène. Dans certains cas, ces structures peuvent contenir des péricytes et/ou des myofibroblastes (Burri and Tarek, 1990). On sait aujourd'hui que la formation de ces piliers requiert le bourgeonnement de CE vers l'intérieur du vaisseau sanguin. Cependant, contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement, les CE n'ont pas besoin de dégrader la matrice extracellulaire, leur migration est déficitaire par le flux sanguin et l'absence apparente de gradient de facteurs angiogéniques à l'intérieur du vaisseau (Burri et al., 2004; Mentzer and Konerding, 2014). Des études récentes suggèrent que le flux sanguin et en particulier la contrainte par cisaillement (de l'anglais « *shear stress* »), peut induire une migration intraluminaire des CE et la formation de piliers (Filipovic et al., 2009). En ce sens, le NO pourrait jouer un rôle déterminant dans l'équilibre entre l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception (Esteban et al., 2020). Différents mécanismes de migration intraluminaire et de formation de piliers ont été proposés et sont résumés dans la Figure 11 (Burri et al., 2004). L'un des modèles les plus récurrents dans la littérature explique que les CE des parois opposées d'un vaisseau sanguin bourgeonnent dans la lumière jusqu'à se rencontrer et former un pont transluminal. Une fois sur place, les CE forment une double couche cellulaire à laquelle les péricytes et/ou les myofibroblastes se fixeront, contribuant à la production de l'ECM et à la stabilisation des nouveaux capillaires. L'expansion du pilier intravasculaire ne nécessite pas la prolifération des CE, contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement (Burri and Tarek, 1990). Toutefois, les mécanismes de ce processus restent encore inconnus. Certaines hypothèses suggèrent que l'expansion de l'ECM et/ou le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants dans le sang pourrait contribuer à ce processus (O'Neal et al., 1964). En tout cas, loin d'être un événement rare, l'angiogenèse par intussusception a été identifiée dans plusieurs organes et tissus et est responsable aussi de la césure des vaisseaux sanguins, de la modification de l'angle de ramification de l'arbre vasculaire et de sa compartimentation (Patan et al., 1992). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins par ce processus permet de multiplier rapidement le nombre de vaisseaux sanguins par rapport à l'angiogenèse par bourgeonnement et elle est plus efficace sur le plan énergétique car il implique une prolifération cellulaire réduite, voire nulle. Les études de l'influence du VEGF sur la formation des piliers sont hétérogènes et dans certains cas contradictoires, ce qui suggère une régulation complexe qui dépend à la fois de la dose et du gradient de ce facteur de croissance, ainsi que des interactions avec d'autres voies de signalisation telles que la voie Notch, la voie des angiopoïétines I et II, des éphrines B2 et B4 ou des facteurs d'hypoxie (Baum et al., 2010; Gianni-Barrera et al., 2011; Hlushchuk et al., 2011, 2017; De Spiegelaere et al., 2012; Winnik et al., 2009).

Enfin, dans les deux types d'angiogenèse, l'incorporation de péricytes et/ou de myofibroblastes est essentielle pour la stabilisation des nouveaux vaisseaux sanguins. Les CE recrutent ces cellules périvasculaires en sécrétant le facteur de croissance dérivé des plaquettes B (PDGF-B) (Lindahl et al., 1999). Les péricytes et/ou les myofibroblastes contribuent à la formation de l'ECM, participent au contrôle du tonus vasomoteur et préviennent l'effondrement des vaisseaux sanguins (Risau, 1997).

2.5. Rôles de l'endothélium dans l'organisme

2.5.1. Le transport de molécules à travers de l'endothélium

L'endothélium forme une barrière physique entre la circulation sanguine et les tissus qui l'entourent et il contrôle leurs échanges des molécules et des cellules de manière active. Les connexions entre les CE laissent un peu moins de 4 nm en moyenne dans l'endothélium continu (entre 1,4 et 1,8 nm à la barrière hématoencéphalique) pour le libre passage de petites molécules polaires dans des conditions physiologiques (Bundgaard, 1984; Yazdani et al., 2019). Les plus grosses molécules nécessitent une interaction avec les CE pour induire leur passage, soit par la voie transcellulaire liée aux transporteurs et/ou vésicules intracellulaires, soit par la voie extracellulaire qui entraîne la réorganisation et ouverture des jonctions intercellulaires pour modifier la perméabilité de l'endothélium (Yazdani et al., 2019).

La voie transcellulaire est la principale voie de transport pour les grandes molécules, notamment l'albumine, les lipides et les hormones et peut être ou non médiée par des récepteurs membranaires (Genders et al., 2013; Havekes et al., 1985; Vogel et al., 2001). La formation de cavéoles sur la face apicale des CE permet la capture et l'internalisation de ces molécules (Frank et al., 2003; Oh et al., 1998). Les cavéoles sont des invaginations membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides recouverts, du côté cytoplasmique, par la protéine calvéoline-1 qui, une fois activée, permet la formation d'une vésicule autour de la molécule à internaliser (endocytose) à travers laquelle elle transmigre vers le côté basal de la cellule, où la vésicule se fusionne à nouveau avec la membrane et libère la charge (exocytose) (Frank et al., 2003). Ainsi, par exemple, l'internalisation de l'albumine dépend du récepteur GP60 et celle de la lipoprotéine de basse densité (LDL, un transporteur de cholestérol), du récepteur éboueur (ou « *scavenger* » en anglais) classe B type 1 (SRB1), tous les deux associés aux cavéoles (Armstrong et al., 2015; Genders et al., 2013). Bien que la transcytose médiée par les cavéoles soit la plus commune dans les CE, le transport des LDL et d'autres molécules telles que l'insuline a également été associée à l'endocytose médiée par la clathrine (Azizi et al., 2015). En revanche, l'internalisation cellulaire du glucose est associée à des transporteurs tels que GLUT1, GLUT2 et GLUT3 (de l'anglais « *GLU*ucose transporter ») (Goldstein et al., 1977).

Dans le cas du transport paracellulaire, plusieurs études ont décrit qu'en présence de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine (Andriopoulou et al., 1999a; Leach et al., 1995), la thrombine (Rabiet et al., 1996) ou le facteur d'agrégation plaquettaire (PAF) (Sirois et al., 1988), des cytokines et/ou des facteurs de croissance comme le VEGF (Chen et al., 2012b), l'endothélium augmente sa perméabilité vasculaire. Cette réponse est médiée principalement par l'incrément de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire qui réduit les liaisons intercellulaires des jonctions adhérentes et étanches et augmente l'espace intercellulaire en favorisant le passage des cellules et des métabolites à travers l'endothélium (Chen et al., 2012b; Sandoval et al., 2001; Yazdani et al., 2019).

2.5.2. Contrôle du tonus vasculaire

L'échange de substances par l'endothélium dépend, entre autres, du flux sanguin dans les vaisseaux sanguins (Tarbell, 2010). Les vaisseaux sanguins ont la capacité de se dilater ou de se contracter en réponse à des stimuli neuronaux, hormonaux et locaux, pour assurer une perfusion stable des tissus (Salzmann et al., 2019). Bien que les propriétés de contraction et de relaxation des vaisseaux sanguins (notamment, des artères et des artérioles) résident dans le muscle lisse qui les entoure, les CE, en contact direct avec le sang, sont impliquées dans la détection et la transmission de signaux circulants du sang au muscle (Salzmann et al., 2019). Le flux de sang dans les vaisseaux sanguins génère une force de friction contre l'endothélium appelée contrainte de cisaillement (en anglais « *shear stress* »). Les modifications du flux sanguin augmentent ou diminuent la contrainte de cisaillement et induisent des changements structurales des CE, tels que l'ouverture de canaux ioniques ou des modifications des protéines d'adhésion (Tarbell, 2010). En plus de la contrainte de cisaillement, d'autres molécules telles que l'acétylcholine, l'histamine, la thrombine ou la saturation en oxygène de l'hémoglobine des globules rouges circulants peuvent induire la vasoconstriction ou à la vasodilatation à travers les CE (Michiels, 2003; Salzmann et al., 2019).

La vasodilatation médiée par les CE est principalement exercée à travers la sécrétion des trois facteurs de vasodilatateurs : le NO, la prostacycline ou prostaglandine I₂ (PGI₂) et les facteurs d'hyperpolarisation. L'acétylcholine (Furchgott and Zawadzki, 1980), la bradykinine (Zhu et al., 1997), la sérotonine (Cocks and Angus, 1983), l'ATP libéré par les globules rouges pauvres en oxygène (Ellsworth et al., 2009) ou l'augmentation de la contrainte de cisaillement activent l'eNOS (Davis et al., 2001). Cette activation est induite grâce à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ou par sa phosphorylation. L'activation de l'eNOS permet la synthèse du NO à partir de la L-arginine (Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987), qui sera, ensuite, sécrétée dans l'espace abluminal. Le NO se lie alors à l'enzyme guanylyl cyclase sur les cellules du muscle lisse et induit la diminution des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires à travers la production du guanosine

monophosphate cyclique (cGMP), permettant la relaxation du muscle et, par conséquent, la dilatation des vaisseaux sanguins (Blatter and Wier, 1994). Les CE synthétisent et sécrètent également la PGI₂ (Weksler et al., 1977) qui se lie au récepteur de la prostacycline (PI) des cellules musculaires lisses et induit la relaxation musculaire par l'adényl monophosphate cyclique (cAMP) (Mitchell et al., 2008). Enfin, le troisième groupe de vasodilatateurs connus sous le nom de facteurs d'hyperpolarisation fait référence à un ou plusieurs facteurs de relaxation vasculaire, outre que le NO et la PGI₂ (Scotland et al., 2005), qui induit une modification du potentiel membranaire des cellules musculaires lisses, probablement due à un efflux des ions potassium (Edwards and Weston, 2004; Luksha et al., 2009). Cette modification du potentiel membranaire réduit le Ca²⁺ intracellulaire et entraîne une relaxation du vaisseau sanguin (Edwards and Weston, 2004). Aujourd'hui, certains de ces facteurs ont été identifiés, dont les acides époxyeicosatriénoïques dérivés de l'acide arachidonique, mais beaucoup d'autres restent inconnus ainsi que les voies de signalisation impliquées (Campbell et al., 1996; Petersson et al., 1997) (Figure 12).

D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines ou le TNF- α (Marsden and Brenner, 1992), les hormones telles que l'insuline (en conditions pathologiques) (Hu et al., 1993), les lipoprotéines de basse densité (Sakurai et al., 2004) ou la faible contrainte de cisaillement (Wang et al., 2002) augmentent la synthèse de molécules vasoconstrictrices telles que l'endothéline (ET) ou le thromboxane A₂ (TxA₂) par les CE. Parmi les trois types d'ET existants (ET-1, ET-2 et ET-3), les CE ne produisent que l'ET-1 (Yanagisawa et al., 1988) qui se lie aux récepteurs ET_A et ET_{B2} présents dans le muscle lisse et induit l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire dans la cellule, provoquant la contraction du muscle lisse et, par conséquent, la constriction des vaisseaux sanguins (Davenport et al., 2016). Les CE expriment également le récepteur ET_{B1}, permettant une boucle négative où l'interaction ET-1/ET_{B1} induit l'expression de molécules vasodilatatrices (NO et PGI₂) (Cardillo et al., 2000). Tel que la PGI₂, le TxA₂ est dérivé de l'acide arachidonique et se lie aux récepteurs de thromboxane-prostanoïde présents sur les plaquettes et les cellules musculaires lisses (Ramadan et al., 1990). Comme l'ET-1, il joue un rôle de médiateur dans la vasoconstriction en augmentant le Ca²⁺ intracellulaire dans le muscle lisse (Ellinworth et al., 2014) (Figure 12).

Les CE participent également au contrôle de la pression sanguine en tant qu'actrices principales du système rénine-angiotensine (RAS) (Sampaio and Souza dos Santos, 2018). La rénine est sécrétée par le rein en réponse à la baisse de la pression artérielle et catalyse la production d'angiotensine I dans le foie, qui est, ensuite, libérée dans le sang (Sampaio and Souza dos Santos, 2018). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE de l'anglais « *angiotensin converting enzyme* »

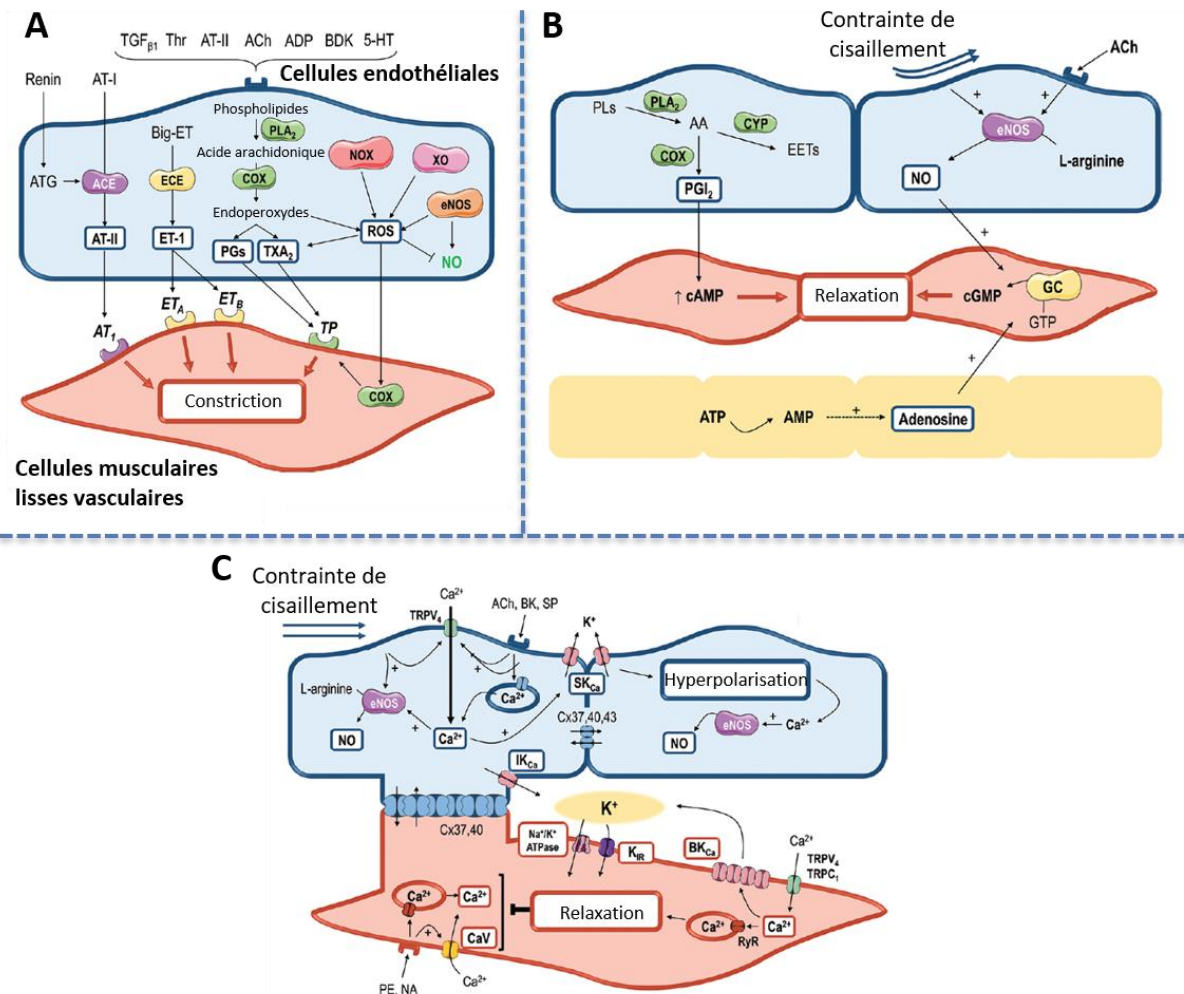


Figure 12. Contrôle du tonus vasculaire par les cellules endothéliales. Les CE induisent la contraction ou la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires des artères et artérioles à travers la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs, respectivement. **A.** Parmi les vasoconstricteurs sécrétés par les CE on retrouve l'angiotensine II (AT-II), l'endothéline (ET-1) et le thromboxane A2 (TXA₂). **B.** L'oxyde nitrique (NO), la prostaglandine I₂ (PGI₂) et **C.** Les facteurs de polarisation participent à la vasodilatation. *Traduit de Fonseca et al. 2016.*

ou CD143) présente à la surface des CE, notamment dans les vaisseaux sanguins pulmonaires, catalyse la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, un vasoconstricteur connu, et inactive la bradykinine, qui est un vasodilatateur (Caldwell et al., 1976). Finalement, l'action vasoconstrictrice du RAS est régulée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2) exprimée par les CE et les cellules musculaires lisses, entre autres (Sampaio and Souza dos Santos, 2018). L'action de l'ACE2 permet la transformation de l'angiotensine II en angiotensine (1-7), un peptide vasodilatateur (Sampaio et al., 2007).

2.5.3. Capacités épuratrices des cellules endothéliales

Bien que pendant de nombreuses années les macrophages aient été considérés comme les seules cellules responsables de la capture et de l'élimination des déchets conséquents au

métabolisme cellulaire et à régénération des tissus (van Furth et al., 1972), aujourd'hui une sous-population de CE a été aussi reconnue comme épuratrice de l'organisme : les CE épuratrices (SEC, de l'anglais « *scavenger endothelial cells* ») (Knook et al., 1977; Sørensen et al., 2012). Chez les mammifères, ces cellules se retrouvent principalement dans le foie et se caractérisent par leur grande capacité à endocyter et à dégrader via les lysosomes (Knook et al., 1977; Laakso and Smedsrød, 1987). Contrairement aux macrophages, les SEC n'ont aucune activité phagocytaire, mais internalisent les petites particules et les colloïdes de moins de 200 nm par pinocytose (un type d'endocytose de molécules de petite taille, principalement, en suspension) (Laakso and Smedsrød, 1987; Sørensen et al., 2012). Pour cela, les SEC disposent d'un panel de récepteurs classifiés en trois familles, qui leur permettent de capter et d'internaliser spécifiquement une grande variété de molécules: les récepteurs éboueurs (*SR de l'anglais « scavenger receptors »*), les récepteurs du mannose et les récepteurs du Fc des Immunoglobulines G (FcγRIIb2) (Sørensen et al., 2012). Sur les huit classes de récepteurs éboueurs décrits à ce jour, trois sont exprimées par des SEC (SR-A, SR-B et SR-H), étant la Stabiline 2 (STAB2) (de la classe SR-H) la plus étudiée puisqu'elle intervient dans l'absorption d'un grand panel de molécules dont l'hyaluronane, le LDL, les macromolécules de l'ECM et les produits protéiques de la régénération tissulaire (Hansen et al., 2005; McCourt et al., 1999). Les récepteurs du mannose reconnaissent une variété de glycoprotéines microbiennes et endogènes, dont l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), la myéloperoxydase produite par les neutrophiles et des fragments de collagène dénaturés (Elvevold et al., 2008; Magnusson and Berg, 1993; Malovic et al., 2007; Sørensen et al., 2012). Enfin, les récepteurs FcγRIIb2 permettent l'endocytose de petits complexes immuns d'immunoglobuline G circulant dans le sang (Johansson et al., 1996; Lovdal and Berg, 2001; Mousavi et al., 2007).

Dans les trois cas, dès lors que le ligand se lie au récepteur, l'endocytose de ces molécules se fait principalement par des manteaux de clathrine. La plupart des molécules endocytées sont dégradées par les enzymes du lysosome, tandis que d'autres, comme les complexes immunitaires et les récepteurs endocytaires, sont partiellement recyclées vers la membrane (Hansen et al., 2005; Mousavi et al., 2007; Sørensen et al., 2012).

2.5.4. L'endothélium et l'inflammation

L'inflammation est la première réponse de l'organisme face à une lésion ou à la destruction d'un tissu (y compris le tissu vasculaire). Il permet la mise en place d'une réponse immunitaire rapide visant à l'élimination de l'agent à l'origine de la lésion pour, ensuite, favoriser la réparation du tissu (Medzhitov, 2008). Cette réponse nécessite une augmentation locale du flux sanguin et la

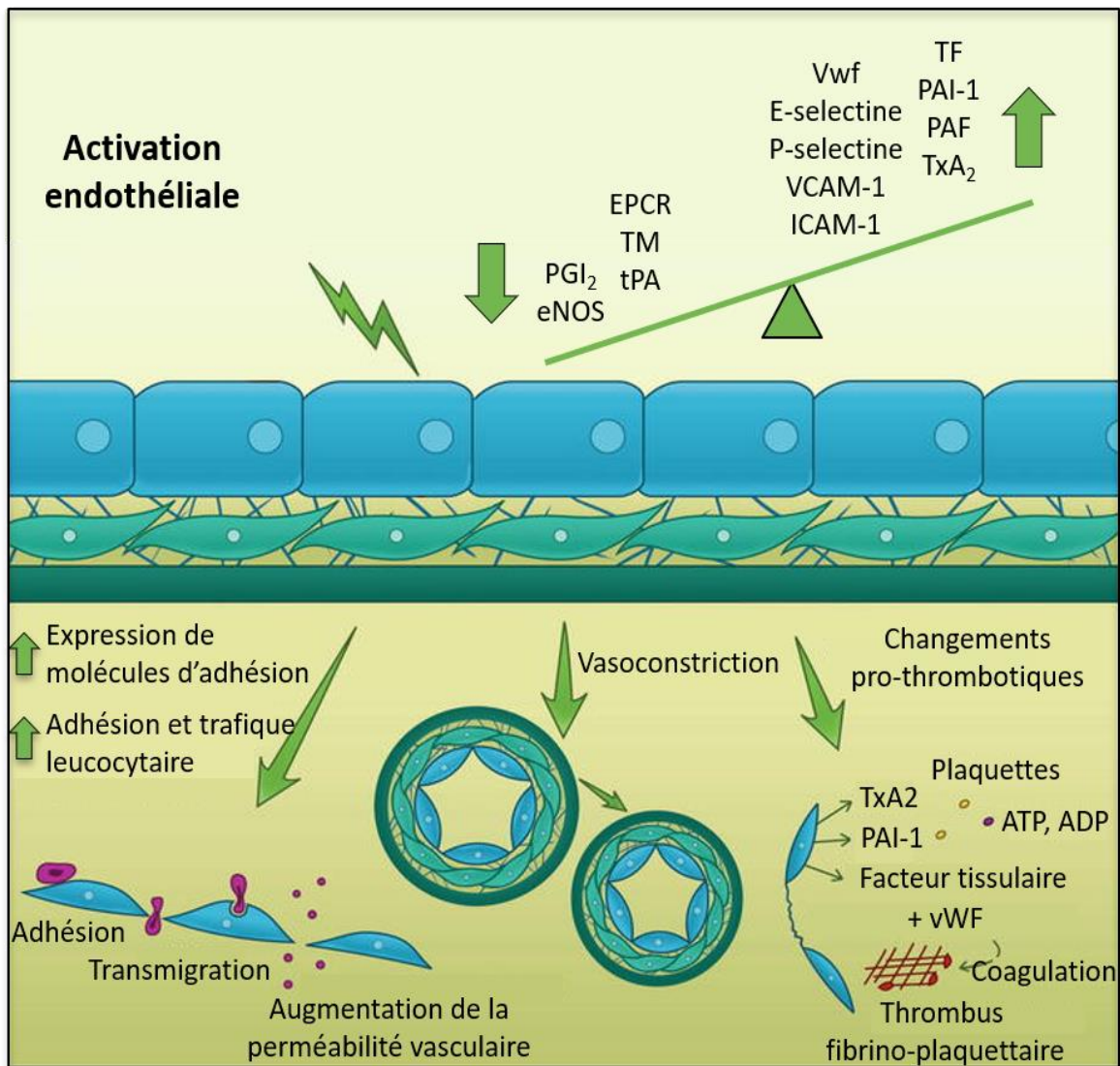


Figure 13. Schéma de la réponse inflammatoire des cellules endothéliales. Les CE peuvent être activées par des molécules pro-inflammatoires induisant l'expression de molécules d'adhésion, la sécrétion du contenu des corps de Weibel-Palade, dont le factor du von Willebrand (vWF) et des facteurs pro-thrombotiques tel que le facteur tissulaire (TF) ou le thromboxane A₂ (TxA₂). Ces changements favorisent l'adhésion et transmigration de leucocytes, augmentent la perméabilité vasculaire et induisent l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus fibrino-plaquettaire. EPCR : Récepteur endothélial de la protéine C réactive ; PAI-1 : Inhibiteur 1 de l'activateur tissulaire du plasminogène ; PAF : facteur d'activation plaquettaire ; VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1 ; ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire ; TM : thrombomoduline ; t-PA : l'activateur tissulaire du plasminogène. *Adapté et traduit de Sutton et al. 2014.*

perméabilité vasculaire pour favoriser l'arrivée des protéines plasmatiques et la migration des leucocytes du flux sanguin vers la zone enflammée (Medzhitov, 2008). Lorsque le tissu endommagé est l'endothélium, la première étape de l'inflammation vise à la contention du saignement dans un processus appelé hémostasie (O'Donnell et al., 2019). L'hémostasie requiert l'activation et l'agrégation des plaquettes au site de la plaie (hémostasie primaire) pour ensuite, former un caillot ou thrombus rouge grâce à l'action de la fibrine (hémostasie secondaire). Une fois le caillot formé, l'hémostasie laisse place à l'arrivée de leucocytes (e.g. les neutrophiles et les macrophages) pour nettoyer la plaie,

et aux cellules propres du tissu pour sa régénération (O'Donnell et al., 2019). Pour ce faire, la fibrine est dégradée et le caillot dissout, ce qui permet une reprise de la perfusion normale du vaisseau sanguin (O'Donnell et al., 2019).

Les CE jouent un rôle très important dans le contrôle et l'exécution de la réponse inflammatoire de deux manières possibles : la première, par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, cytokines et chimiokines, qui induisent le remodelage du vaisseau sanguin et attirent les leucocytes et les plaquettes vers le site de l'inflammation ; la seconde, par l'expression de protéines membranaires qui participent au recrutement et à l'extravasation des leucocytes (de Martin, 2019; Michiels, 2003).

Dans des conditions physiologiques, les CE sont couvertes par des chaînes des glycosaminoglycanes (GAG) telles que l'héparane sulfate ou le dermatane-sulfate qui leur confèrent des propriétés anticoagulantes (grâce à une liaison avec l'antithrombine) (Kitamura et al., 1996; Opal et al., 2002). De plus, les GAGs ayant des charges négatives, ainsi que le NO et la prostaglandine I₂ (PGI₂) sécrétés par les CE, empêchent l'agrégation des plaquettes à l'endothélium (Cines et al., 1998; Opal et al., 2002). De cette façon, la perfusion de tous les vaisseaux sanguins est assurée et la formation spontanée de thrombus limitée. Lors d'une lésion vasculaire, l'augmentation locale des signaux pro-inflammatoires, notamment la thrombine, l'histamine, le TNF- α ou l'interleukine 1 β (IL-1 β), activent les CE (Andriopoulou et al., 1999b; Bevilacqua et al., 1986; García-Vallejo et al., 2006; Levin et al., 1984; Scholz et al., 1996). Cette activation induit l'expression du facteur PAF (facteur d'activation plaquettaire) (Zimmerman et al., 1990), du facteur tissulaire (Parry and Mackman, 1995), et la fusion des corps de Weibel Palade à la membrane de la CE libérant son contenu dans l'espace extracellulaire (van Mourik et al., 2002), notamment le vWF, la P-sélectine, l'endothéline et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Le vWF favorise l'agrégation plaquettaire et stabilise le facteur VIII de coagulation (FVIII) (Dubois et al., 2007), la P-sélectine participe au recrutement des leucocytes (André, 2004), l'endothéline-1 et le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène, de l'anglais « *tissue plasminogen activator* ») sont impliqués, respectivement, dans la vasoconstriction et la fibrinolyse (nécessaires à la dissolution des caillots) (Levin et al., 1984). De plus, les CE principalement du foie, synthétisent le FVIII nécessaire à la formation du caillot (Do et al., 1999; Fahs et al., 2014).

L'endothélium possède également une épaisse couche de glycocalyx qui retient les chimiokines produites par elles-mêmes et par les cellules périvasculaires (IL-8, MCP-1, protéine chimio attractive des monocytes, de l'anglais « *monocyte chemoattractant protein 1* » appelée aussi CCL2) et qui attirent les cellules immunitaires (Sica et al., 1990b, 1990a; Tanaka et al., 1993). Celles-ci, ainsi que l'expression des sélectines E et P et du PAF exprimés par les CE activées, leur permettent une

première interaction réversible avec les leucocytes et les lymphocytes, malgré les conditions du flux sanguin (Prescott et al., 2001; Tedder et al., 1995; Zimmerman et al., 1990). Ainsi, les cellules immunitaires ralentissent leur circulation, roulent sur les parois du vaisseau, tout en interagissant avec les cytokines locales (Pober and Sessa, 2007). Pendant ce mouvement de roulement, les CE et les cellules immunitaires régulent l'expression des immunoglobulines et des intégrines membranaires respectivement, ce qui facilitera une adhésion plus forte de ces deux types cellulaires. Les intégrines LFA-1 (α L β 2 antigène associé à la fonction lymphocytaire 1) et Mac-1 (α M β 2 antigène macrophage-1) des lymphocytes et des leucocytes se lient à la glycoprotéine ICAM-1 des CE, tandis que l'intégrine VLA4 (antigène très tardif, α 4 β 1, de l'anglais « *very late antigen-4* ») reconnaît la glycoprotéine endothéliale VCAM-1 (Luscinskas and Lawler, 1994; Pober and Cotran, 1990; Scholz et al., 1996). Enfin, cette interaction induit une contraction des CE (médiée par la kinase des chaînes légères de la myosine MLCK, de l'anglais « *myosin light-chain kinase* ») et la perte des liaisons d'adhésion intercellulaires (*i.e.* VE-cad) favorisant la perméabilité vasculaire et permettant le passage des leucocytes et des lymphocytes à travers les jonctions inter-endothéliales (Allport et al., 2000; Huang et al., 1993; Weber and Springer, 1998). Pendant ce processus, la glycoprotéine endothéliale PECAM-1, située aux jonctions inter-endothéliales, se lie à d'autres PECAM-1 et intégrines α v β 3 de la surface des cellules immunitaires pour les guider lors de l'extravasation (Muller and Randolph, 1999; Newman et al., 1990).

2.5.5. L'endothélium et l'organogénèse

Bien que le système cardiovasculaire soit le premier organe fonctionnel formé chez les mammifères, pendant des années, son implication dans l'organogénèse a été considérée limitée à son apport de nutriments et à l'élimination des déchets issus du métabolisme cellulaire. En 2001, les études de Lammert et al. (Lammert et al., 2001) et de Matsumoto et al. (Matsumoto et al., 2001) ont suggéré, pour la première fois, que les CE pouvaient participer activement à la formation des organes, notamment du pancréas et du foie. Dans le cas du pancréas, la culture *ex vivo* d'explants de l'endoderme murin avec des tissus de différentes origines a montré que l'endothélium aortique était le seul tissu à augmenter la production d'insuline dans les cellules dérivées de l'explant (Lammert et al., 2001). *In vivo*, l'hypervascularisation de l'épithélium de l'estomac par l'expression ectopique du VEGF a entraîné l'apparition de cellules pancréatiques productrices d'insuline (cellules bêta). Quelques années plus tard, des études *in vivo* sur des embryons de souris dépourvus de vaisseaux sanguins (*Vegfr-2*^{-/-}) ont confirmé le rôle des CE dans la maturation du bourgeon pancréatique dorsal (Yoshitomi and Zaret, 2004). Les souris témoins et les souris *Vegfr-2*^{-/-} ont toutes les deux développées un bourgeon dorsal avec des progéniteurs pancréatiques, néanmoins, chez les souris *Vegfr-2*^{-/-} ces progéniteurs n'ont pas réussi à se différencier en cellules productrices d'insuline ou de

glucagon (Yoshitomi and Zaret, 2004). À la différence du bourgeon dorsale, le bourgeon pancréatique ventral a suivi un développement équivalent à celui des souris témoins, soulignant que le rôle des CE dans la maturation du pancréas est probablement limité au bourgeon dorsal.

Dans le cas du foie, des études *in vivo* ont montré que les CE présentes dans le *septum transversum* sont en contact direct avec les cellules hépatiques naissantes. En fait, la culture *ex vivo* de l'endoderme hépatique de souris *Vegfr-2^{-/-}* a montré que ces CE sont nécessaires pour la migration des progéniteurs hépatiques et pour leur prolifération dans le tissu mésenchymateux qui les entoure (Matsumoto et al., 2001). L'endothélium peut également jouer un rôle important dans la formation des voies biliaires matures, ce qui est suggéré par la formation des voies biliaires tout au long de la veine porte, du centre à la périphérie des lobules hépatiques, bien que ces interactions entre les CE et les cholangiocytes (les cellules épithéliales qui recouvrent les voies biliaires) restent inconnues (Ober and Lemaigre, 2018).

Dans le néocortex, l'endothélium cérébral participe à la neurogenèse embryonnaire en favorisant la différenciation des progéniteurs en neurones (Lange et al., 2016) et en synthétisant l'ECM qui permet la migration des neurones (Segarra et al., 2018). Les CE pourraient également exercer une fonction de niche pour le maintien et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales, embryonnaires et adultes, notamment dans les zones sous-ventriculaires et sous-granulaires (Karakatsani et al., 2019), grâce à la sécrétion de facteurs solubles (*e.g.* le facteur neurotrophique issu du cerveau, BDNF, de l'anglais « *brain-derived neurotrophic factor* ») (Louissaint Jr. et al., 2002) et de l'ECM (Rosa et al., 2016), aux interactions entre cellules et au transport des facteurs de croissance provenant du flux sanguin (Shingo et al., 2003).

Finalement, l'un des rôles les plus étudiés des CE lors du développement embryonnaire d'autres tissus et organes est celui de l'endothélium hémogénique, un endothélium spécialisé présent dans la zone aorte-gonades-mésonephros, qui donne naissance aux CSH et aux progéniteurs de cellules sanguines. Dans le prochain chapitre sur les cellules hématopoïétiques, nous décrirons plus en détail cette population spécialisée de CE.

2.6. Pathologies associées au dysfonctionnement des cellules endothéliales

La CE est considérée comme dysfonctionnelle lorsqu'elle est incapable de remplir les fonctions endothéliales physiologiques mentionnées dans les sections précédentes de ce chapitre. Notamment, la CE dysfonctionnelle a une capacité réduite de vasodilatation et reste dans un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique (Hsu et al., 2019). Le dysfonctionnement de l'endothélium est lié à diverses conditions tel que l'âge, l'obésité ou le diabète, probablement à cause d'une augmentation des radicaux libres d'oxygène qui engendre une réduction des niveaux de NO produits

par la CE (Avogaro et al., 2011; Casino et al., 1994; Celermajer et al., 1993; Lobato et al., 2012; Matz and Andriantsitohaina, 2003; PJ et al., 1992; Rubanyi and Vanhoutte, 1986). Cette condition précède les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose ou les maladies vasculaires périphériques, et elle est impliquée dans le développement des processus pathologiques de maladies telles que le diabète, l'insuffisance rénale chronique ou même la croissance de tumeurs et de métastases cancéreuses (Cyr et al., 2020; Poredos and Jezovnik; Rajendran et al., 2013).

Dans le cas de l'athérosclérose, l'absence de NO dans l'endothélium artériel favorise l'agrégation des plaquettes à l'intérieur des vaisseaux sanguins et induit une réponse inflammatoire. Cet environnement pro-inflammatoire augmente la perméabilité de l'endothélium aux molécules telles que les LDL et aux cellules immunitaires telles que les monocytes. Sur la face abluminale de la tunique interne, les radicaux d'oxygène libérés par l'endothélium et les muscles lisses oxydent le LDL

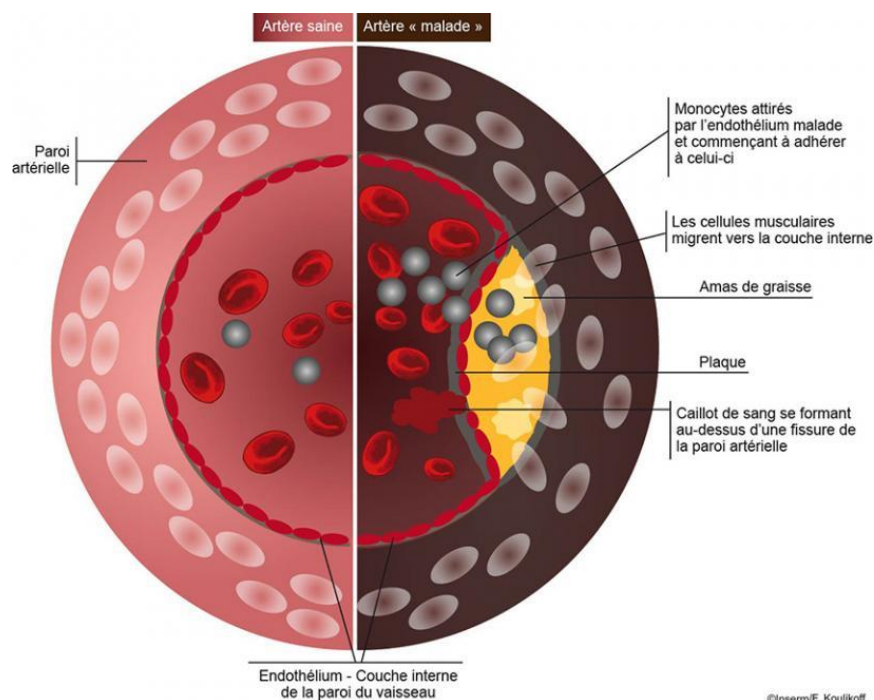


Figure 14. Représentation d'une artère saine versus une artère d'un patient atteint d'athérosclérose. Frédérique Koulikoff dans dossier d'information de l'INSERM.

qui est, ensuite, phagocyté par les macrophages. Les macrophages deviennent, alors, des cellules spumeuses qui déclenchent la formation de la plaque d'athérome (composées de lipides, de calcium et d'autres substances) et induisent la migration et la prolifération des muscles lisses vasculaires sous l'endothélium. Les cellules du muscle lisse participent également à la calcification de la plaque et à la vasoconstriction du vaisseau sanguin (Figure 14). La rupture de la plaque entraîne la formation du thrombus et par conséquent, l'effondrement de l'artère. L'obstruction d'une artère génère une

ischémie ou un manque d'apport sanguin au tissu, mettant ainsi en danger sa survie. Lorsque ce phénomène se produit dans les grandes artères comme la carotide ou les artères coronaires, l'issue peut être fatale en raison d'un accident vasculaire cérébral ou d'un infarctus du myocarde, respectivement. Dans les artères des membres inférieurs, elle peut déclencher une nécrose des tissus et entraîner une amputation. S'il est vrai que, dans les conditions ischémiques, les progéniteurs endothéliaux peuvent être mobilisés pour la création de nouveaux vaisseaux sanguins et la récupération de la perfusion tissulaire, différentes études suggèrent que les patients atteints de maladies cardiovasculaires ou de pathologies métaboliques telles que le diabète ou l'obésité ont un nombre réduit de PEC (Mayer and Binder, 2019).

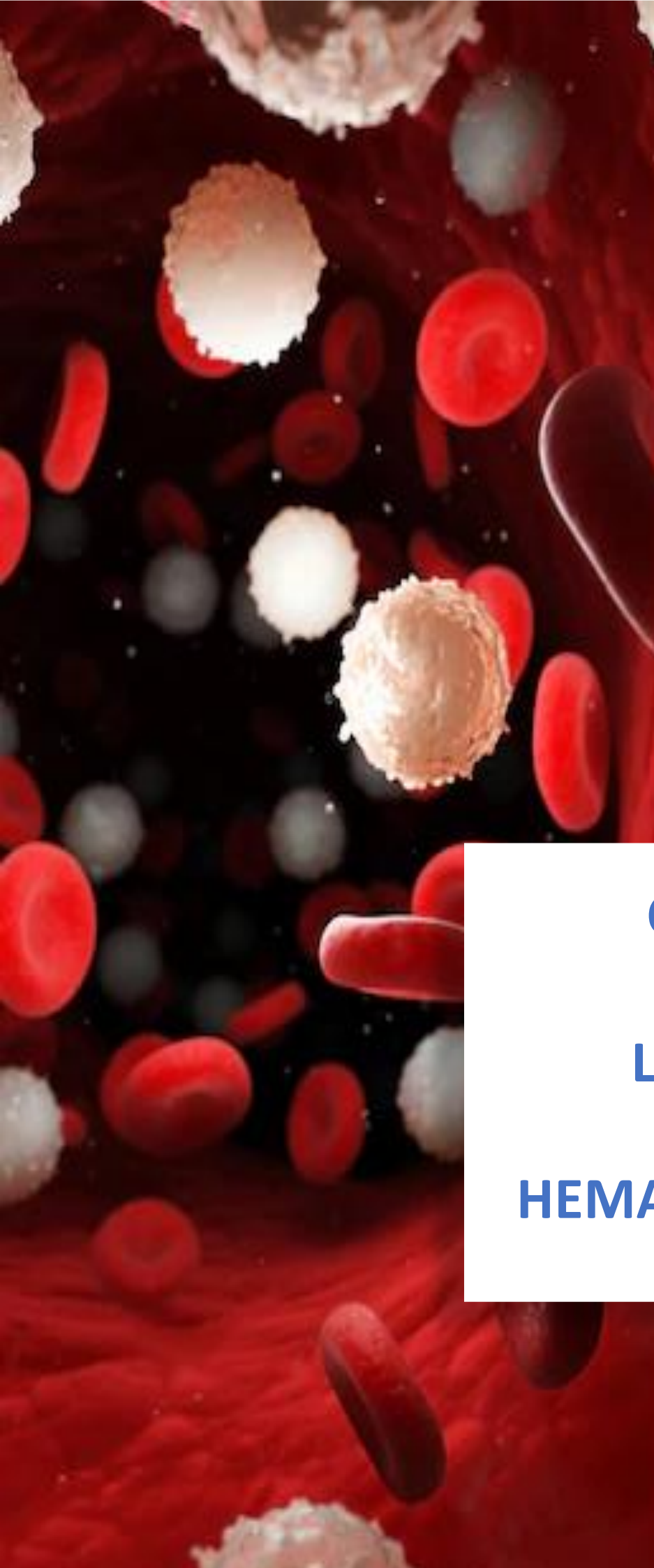
Un dysfonctionnement de l'endothélium dans les veines peut également contribuer à l'obstruction de ces vaisseaux sanguins en raison de la formation de thrombus par l'activité hypercoagulante de l'endothélium, donnant lieu à ce que l'on appelle une thrombose veineuse profonde. Bien que celle-ci se produit principalement dans les membres inférieurs, parmi les complications fatales de cette maladie figure l'embolie pulmonaire, causée par le détachement du caillot et son parcours vers l'artère pulmonaire, où abouti à une obstruction du vaisseau (Gary, 2019).

L'athérosclérose et la thrombose veineuse profonde sont traitées avant l'obstruction totale du vaisseau sanguin avec, par exemple, des anticoagulants ou des inhibiteurs de l'ACE, ce dernier pour réduire la pression sanguine (diminution de la vasoconstriction) dans le cas de l'athérosclérose. Cependant, dans les cas plus avancés de la maladie, la seule solution est l'intervention chirurgicale pour enlever les gros caillots ou nettoyer et rouvrir les artères bouchées (Gary, 2019; Mayer and Binder, 2019). Malgré les traitements existants, les maladies cardiovasculaires restent l'une des principales causes de décès dans les pays développés (WHO, 2013). La thérapie cellulaire, à partir de CE dérivées des CSpH ou des PEC, pourrait être une alternative pour la régénération de l'endothélium dysfonctionnel (Keighron et al., 2018; Palladino et al., 2019; Reed et al., 2013, voir chapitre IV).

D'autre part, les CE jouent un rôle important dans la croissance des tumeurs et les métastases du cancer. Comme n'importe quel tissu, les tumeurs dépendent de l'apport de l'oxygène et des nutriments pour leur survie. La métastase nécessite également la présence de vaisseaux sanguins pour la propagation des cellules cancéreuses dans l'organisme. Ainsi, les cellules cancéreuses libèrent des facteurs angiogéniques pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur. La thérapie anti-angiogénique cherche à limiter la création de nouveaux vaisseaux en bloquant principalement l'action angiogénique du VEGF sur les CE. Toutefois, les résultats obtenus jusqu'à présent ne sont pas entièrement satisfaisants. Certaines études suggèrent que l'état de l'endothélium de la tumeur pourrait avoir un effet sur la malignité de celle-ci. En fait, la présence de CE dysfonctionnelles au sein de la tumeur peut avoir un effet positif sur la malignité de la tumeur

notamment par la sécrétion de protéines pro-inflammatoires. Les futures études qui élucideront le rôle des CE dysfonctionnelles dans différentes conditions inflammatoires, y compris le cancer, seront fondamentales pour concevoir de nouvelles thérapies contre ces maladies (Franses et al., 2013; Hsu et al., 2019).

Enfin, la pandémie actuelle causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2, de l'anglais « *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* »), qui a causé plus d'un million de décès dans le monde (Octobre 2020 selon l'Organisation Mondiale de la Santé), a mis en lumière les CE et leur implication dans l'issue fatale de cette maladie. Bien que ce virus affecte principalement le système respiratoire, selon les données fournies par l'Istituto Superiore di Sanità en Italie, 68,3% des patients décédés à cause du virus souffraient d'hypertension, 28,2% de cardiopathie ischémique et 22,5% de fibrillation auriculaire (Froldi and Dorigo, 2020). Ceci, ajouté au fait que le virus est internalisé dans les cellules grâce à l'union avec l'enzyme ACE2 présente à la surface de l'endothélium (Hafiane, 2020), suggère que le dysfonctionnement endothélial, par le virus lui-même et par les conditions pathologiques qui l'ont précédé, peut être un point clé dans le développement et par conséquent, dans le traitement de la maladie (Green, 2020; Hafiane, 2020; Martel et al., 2020).



CHAPITRE III

LES CELLULES

HEMATOPOÏTIQUES

Chapitre III : Les cellules hématopoïétiques

3.1. Introduction

Le sang n'est pas une entité inerte qui ne fait que transporter l'oxygène et les nutriments dans tout l'organisme, mais un système complexe. Environ 45% du volume sanguin est composé d'éléments cellulaires qui participent activement au transport de l'oxygène, à la réponse immunitaire contre les agents exogènes et à l'hémostase pour prévenir le saignement en cas de lésions vasculaires. Les cellules sanguines, aussi dites cellules hématopoïétiques, comprennent plus de dix types cellulaires différents. Si certaines d'entre elles ont une durée de vie de plusieurs mois ou même de plusieurs années, beaucoup d'autres ne survivent que quelques heures ou quelques jours. Pour répondre à la demande continue de ces cellules, l'organisme est pourvu de CSH, cellules multipotentes qui assurent la régénération de ce lignage tout au long de la vie adulte. Comme nous le verrons tout au long de ce chapitre, le stock de CSH dans les organismes adultes est généré au cours des premières semaines du développement embryonnaire à partir d'un endothélium spécialisé, l'endothélium hémogénique. Les CSH sont amplifiées dans le foie du fœtus et stockées dans la moelle osseuse jusqu'à ce qu'elles soient requises par l'organisme. Depuis des années, les CSH et leur descendance sont le modèle privilégié pour étudier les mécanismes responsables de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire, ainsi qu'entre la quiescence et l'activation du cycle cellulaire dans les cellules souches. Aujourd'hui, les CSH sont utilisés en clinique pour le traitement des affections hématologiques telles que les leucémies, les lymphomes, les problèmes du système immunitaire ou les syndromes de déficience de la moelle osseuse. Dans ce chapitre, nous approfondirons le développement embryonnaire des cellules hématopoïétiques, en accordant une attention particulière à leur relation avec les CE. Nous aborderons aussi les caractéristiques des principales cellules hématopoïétiques et des CSH adultes.

3.2. Classification des cellules hématopoïétiques

Les cellules hématopoïétiques constituent un groupe hétérogène de plus de dix types cellulaires, toutes dérivées des CSH. Une première classification des cellules hématopoïétiques distingue les globules rouges, qui représentent le 44% du sang, les globules blancs et les plaquettes qui représentent autour du 1% du sang total (Tableau 8). Une deuxième classification, plus précise, prend également en considération l'ontogénie de chaque type de cellules hématopoïétiques (Figure 15). Selon cette classification, il existe deux grands lignages hématopoïétiques : les cellules myéloïdes, dérivées du progéniteur commun myéloïde (CMP de l'anglais « *common myeloid progenitor* ») et les cellules lymphoïdes, dérivées du progéniteur commun lymphoïde (CLP de l'anglais « *common lymphoid*

progenitor »). Les cellules myéloïdes sont divisées en deux autres progéniteurs, le progéniteur commun mégacaryocytaire-érythroïde (MEP de l'anglais « *megakaryocyte erythroid progenitor* ») qui donne lieu aux mégacaryocytes et érythrocytes et le progéniteur commun granulocytaire-monocytaire (GMP de l'anglais « *granulocyte-monocyte progenitor* ») qui donne lieu aux granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), monocytes et cellules dendritiques myéloïdes. Les cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes B et T ainsi que les lymphocytes cytotoxiques naturels (aussi dits lymphocytes NK de l'anglais « *natural killer* ») et les cellules dendritiques lymphoïdes, tous dérivées du progéniteur commun lymphoïde (Hoffman et al., 2017).

Tableau 8. Caractéristiques des principales cellules hématopoïétiques présentes dans le sang. Traduit de Kerr 2010.

	Éryth	Plaq.	Neutrop.	Éosinop.	Basop.	Monoc.	Lymphoc.
Taille, μm	7	2-3	9-15	12-17	10-14	15-20	7-16
Durée de vie en circulation	4 mois	10 jours	1-2 jours	1-2 jours	heures-jours	3-jours	3 jours-20 années
Distribution dans le sang	99%	1%					
Pourcentage du total des leucocytes	-	-	60%	1-3%	0-1%	4-10%	20-30%
N° per μL du sang	5×10^6	3×10^5	7×10^3				

Éryth : érythrocytes ; Plaq : plaquettes, Neutrop : neutrophiles ; Éosinop : éosinophiles ; Basop : Basophils ; Monoc : monocytes ; Lymphoc : lymphocytes.

3.2.1. Érythrocytes ou globules rouges

Les érythrocytes ou globules rouges ne sont pas de vraies cellules étant donné l'absence de noyau et d'organites. Les protéines qui composent leur cytosquelette et leur membrane plasmique leur confèrent une forme biconcave et une grande souplesse qui leur permet de circuler à l'intérieur de petits capillaires sanguins et de traverser les fenestrations des capillaires de la rate ($<3 \mu\text{m}$). À l'intérieur des érythrocytes, l'hémoglobine permet le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus de l'organisme et du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons. La durée de vie moyenne d'un globule rouge en circulation est de 4 mois, au-delà de ce temps, les globules rouges sont détruits par les macrophages de la rate, du foie, de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques et leurs composants sont dégradés (e.g. l'hémoglobine), recyclés (e.g. le fer qui compose l'hémoglobine) ou

éliminés de l'organisme (e.g. la porphyrine de l'hémoglobine). Pour compenser cette perte, environ 10 billions de globules rouges sont produits chaque heure chez l'homme adulte dans un processus dénommé érythropoïèse. Dans la moelle osseuse, les progéniteurs érythroïdes appelés BFU-E (de l'anglais « *burst-forming unit erythroid* ») dérivés des CMPs se différencient en CFU-E (pour unités de formation de colonies érythroïdes, de l'anglais « *colony forming unit-erythroid* » voir 3.3.2), et celles-ci donnent naissance aux populations des

proérythroblastes qui mûrissent progressivement en érythroblastes dans les îlots érythroïdes de la moelle osseuse pour aboutir à la formation de réticulocytes et d'érythrocytes matures dans le sang circulant (Figure 15). Ce processus de différenciation finale est régulé principalement par la cytokine érythropoïétine (EPO) produite par les reins (Kerr, 2010).

3.2.2. Plaquettes ou thrombocytes

Tout comme les érythrocytes, les plaquettes ou thrombocytes ne sont pas de vraies cellules puisqu'elles correspondent aux fractions anucléées du cytoplasme des mégacaryocytes. Elles ont une forme discoïde et un cytosquelette organisé contenant des granules sécrétoires. Les plaquettes sont les principales actrices de l'hémostase du fait qu'elles participent activement à la coagulation du sang. Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent à l'endothélium en formant des agrégats qui empêchent le saignement et sécrètent le contenu de leurs granules pour promouvoir la coagulation. Leur durée de vie dans la circulation sanguine est d'environ 10 jours. Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse à la fin de la thrombopoïèse. Les CMPs appelées aussi CFU-GEMM (pour CFU de granulocytes, érythrocytes, macrophages et mégacaryocytes) se différencient en MEP et celui-ci, à son tour, en mégacaryoblastes et puis, en mégacaryocytes. Les mégacaryocytes sont des cellules de grande taille ($\approx 60 \mu\text{m}$) avec un noyau multilobé qui peut contenir entre 4 et 30 copies d'ADN. Leur cytoplasme granulaire est fragmenté en milliers de portions de 2 à 3 μm , les plaquettes, qui sont délivrées dans la circulation sanguine par les capillaires sinusoidales de la moelle osseuse. À la fin de ce processus, les mégacaryocytes sont éliminés par les macrophages. La différenciation finale des mégacaryocytes et la

L'hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine à l'intérieur des globules rouges qui transporte l'oxygène (oxyhémoglobine) et le dioxyde de carbone (désoxyhémoglobine) dans le sang. Sa structure est un tétramère formé par deux sous-unités de globine α et deux sous-unités de globine β . Chaque sous-unité possède un groupe hème composé d'un ion ferreux (Fe^{2+}) au sein d'un hétérocycle organique, la porphyrine. Les chaînes qui composent l'hémoglobine sont spécifiques du stade de développement des érythrocytes qui les contiennent. La sous-unité α de l'hémoglobine peut être constituée par les globines ζ ou α , chez la souris et l'homme. La sous-unité β peut être composée des globines $\epsilon\gamma$, βH1 , $\beta 1$ et $\beta 2$, chez la souris et des globines ϵ , γ et β chez l'homme.

production de plaquettes est contrôlée principalement par la thrombopoïétine (TPO) synthétisée par le foie et les reins (Kerr, 2010).

3.2.3. Granulocytes : neutrophiles, éosinophiles et basophiles

Les granulocytes constituent la grande majorité des leucocytes du sang (≈65%). D'origine myéloïde, ils sont caractérisés par la présence de granules dans leur cytoplasme, dont le contenu varie selon le type de granulocytes. Ils possèdent un noyau segmenté en lobes (Figure 15). Les granulocytes les plus abondants dans le sang sont les neutrophiles (Tableau 8). Contrairement aux autres granulocytes à noyau bilobé (éosinophiles et basophiles), leur noyau contient plusieurs segments reliés par de fins filaments nucléaires, d'où leur nom de polynucléaires. Les neutrophiles font partie du système immunitaire inné, ils phagocytent et détruisent les bactéries et les cellules infectées ou mortes. En effet, leurs granules cytoplasmiques correspondent aux lysosomes composés de protéases, d'hydrolases et de lysozymes qui se fusionnent avec les phagosomes pour dégrader les agents microbiens et les cellules phagocytées. Le deuxième type de granulocytes, les éosinophiles, possèdent également des capacités phagocytaires, bien que beaucoup plus limitées. Les granules des éosinophiles contiennent des protéines cytotoxiques dirigées contre les parasites et les protozoaires. Ces cellules hématopoïétiques sont également impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire (*e.g.* les allergies) puisqu'elles sécrètent des facteurs qui inactivent l'histamine et les leucotriènes provenant des basophiles et des mastocytes. Enfin, les basophiles sont les granulocytes les moins abondants dans la circulation sanguine. Leurs granules contiennent principalement de l'histamine, un agent vasodilatateur et de l'héparine, un anticoagulant. Une fois activés, les basophiles sécrètent ces protéines ainsi que des leucotriènes pro-inflammatoires et d'autres cytokines (*e.g.* l'interleukine-4). Ainsi, les basophiles sont responsables des réactions allergiques telles que la rhinite, l'asthme ou l'urticaire (Kerr, 2010). Les granulocytes sont attirés par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les tissus et les vaisseaux sanguins et ils doivent traverser ces derniers pour accéder aux tissus (voir chapitre 2). Ils ont une courte durée de vie dans le sang qui varie entre quelques heures et quelques jours (Tableau 8). La granulocytopoïèse, ou formation de granulocytes, débute par la différenciation dans la moelle osseuse du progéniteur GMP en granulocytes et monocytes. Les CFU-GM (pour CFU granulo-monocytaires) génèrent des progéniteurs prolifératifs tels que les myéloblastes, les promyélocytes et des myélocytes, suivie d'une étape de maturation non proliférative donnant des métamyélocytes et des granulocytes matures (neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Les facteurs de stimulation qui régulent la différenciation finale de la granulopoïèse sont principalement le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF de l'anglais « *granulocyte colony-stimulating factor* »), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et monocytes (GM-CSF de l'anglais

« *granulocyte monocyte colony-stimulating factor* ») et les interleukines 1, 3 et 6 (IL-1, IL-3 et IL-6) (Kerr, 2010).

3.2.4. *Monocytes et macrophages*

Les monocytes sont les plus gros leucocytes du sang (15-20 μm) avec un noyau central en forme de haricot et un cytoplasme avec de petites vacuoles et granules. Ils appartiennent à la lignée myéloïde et sont dérivés du progéniteur GMP ou CFU-GM. Les monocytes traversent les vaisseaux sanguins pour pénétrer les tissus du corps humain où ils se différencient en macrophages. Comme les neutrophiles, les macrophages ont des capacités phagocytaires et forment le système réticulo-endothélial en charge de l'élimination de déchets et des agents microbiens de l'organisme. L'ingestion de ces substances peut être médiée par des anticorps ou par des récepteurs de reconnaissance à motifs moléculaires (PRR de l'anglais « *pattern recognition receptor* »). D'autre part, les macrophages déclenchent la réponse adaptative du système immunitaire étant donné leur rôle des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T. Finalement, une sous-population des monocytes a été décrite comme sécrétrice de grandes quantités de protéines pro-inflammatoires telles qu'IL-12 ou le TNF- α .

Les monocytes ont une courte durée de vie dans le sang d'environ 3 jours. En revanche, les macrophages peuvent survivre plusieurs années dans les tissus. Dans la moelle osseuse, les CFU-GM se différencient en populations intermédiaires de monoblastes, puis en promonocytes et finalement, en monocytes qui seront incorporés dans la circulation sanguine (Figure 15). Comme pour la granulopoïèse, la monocytopoïèse est régulée par le GM-CSF, l'IL-1, l'IL-3, l'IL-6 et le facteur de stimulation des colonies de macrophages M-CSF (de l'anglais « *macrophage colony-stimulating factor* ») dans la différenciation terminale.

3.2.5. *Lymphocytes B et T*

Les lymphocytes représentent un tiers du total des leucocytes, ils dérivent du progéniteur CLP. Les lymphocytes sont de petites cellules (7-16 μm) avec un gros noyau composé d'une hétérochromatine dense avec un rapport nucléocytoplasmique élevé (Figure 15). Leur développement débute dans la moelle osseuse sous le contrôle de l'IL7, principalement. Certains progéniteurs lymphoïdes migrent dès la moelle osseuse vers le thymus où ils se différencient en progéniteurs des lymphocytes T. D'autres progéniteurs restent dans la moelle osseuse pour se différencier en lymphocytes B. Les lymphocytes B et T assurent l'immunité adaptative qui répond à des antigènes spécifiques des agents externes à l'organisme (Kerr, 2010). Cette reconnaissance est médiée par des récepteurs des antigènes présents dans les deux types de lymphocytes (TCR et BCR de l'anglais « *T cell receptor* » et « *B cell receptor* », respectivement). Au cours de leur développement, une première étape de différenciation requiert la recombinaison des gènes codant les chaînes de ces récepteurs pour générer un large panel des cellules

exprimant entre 2×10^7 TCR et 5×10^{13} BCR différents. Cependant, la réponse immunitaire de ces deux types de cellules est très différente. Une fois que les cellules B acquièrent les BCR, elles migrent vers les organes lymphoïdes périphériques (*e.g.* ganglions lymphatiques ou la rate) où elles restent à un stade de quiescence. Lors de la stimulation par un antigène (médié par les lymphocytes T), certains lymphocytes B sont activés et se différencient, soit en cellules sécrétrices des anticorps (plasmocytes) soit en cellules B mémoire. Leurs anticorps permettent de neutraliser et de cibler les agents externes à l'organisme pour leur élimination par d'autres cellules du système immunitaire (Cano and Lopera,

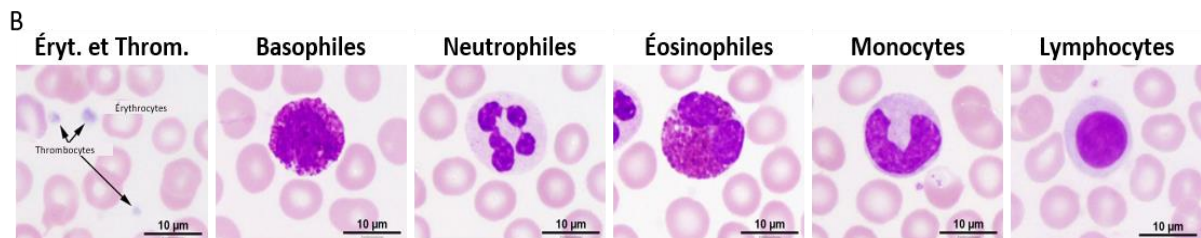
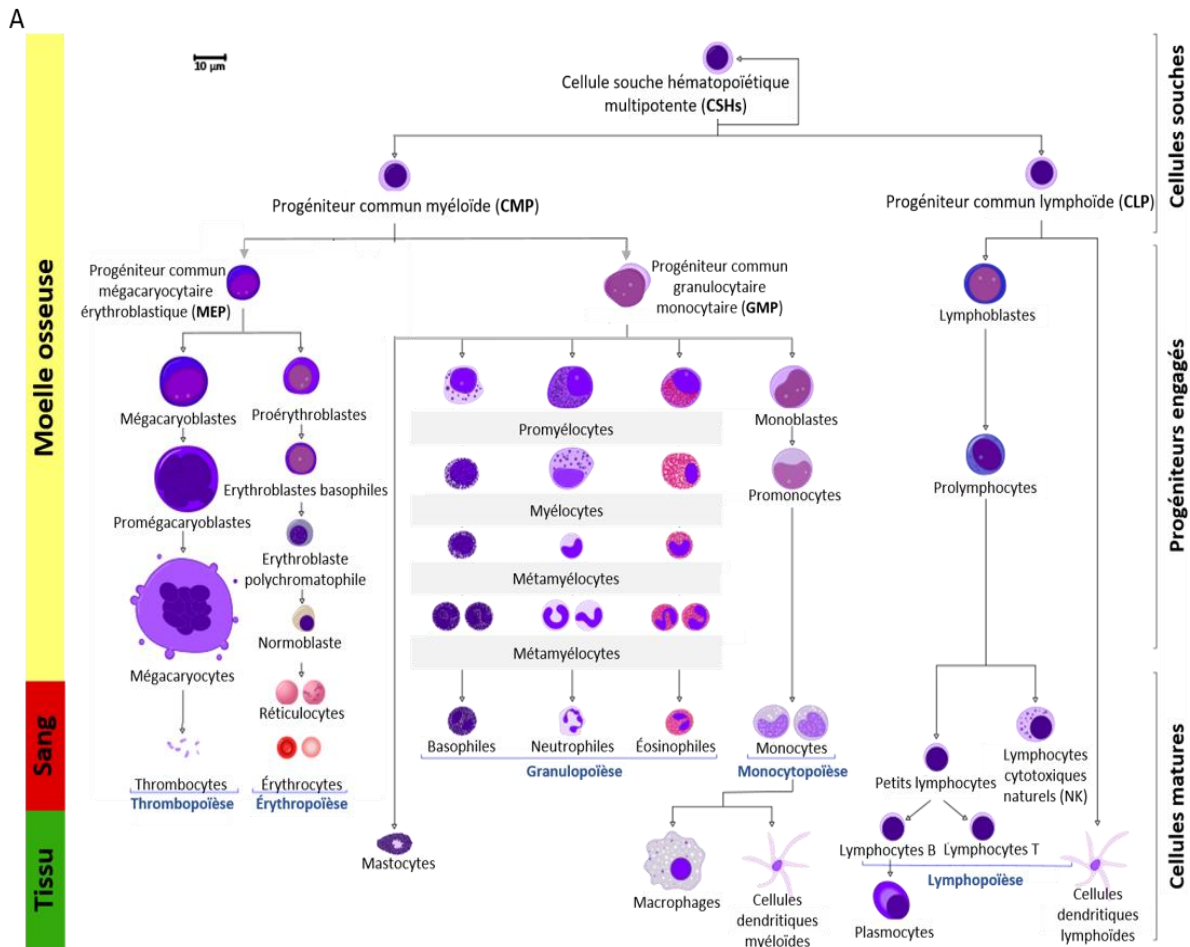


Figure 15. Classification des principales cellules hématopoïétiques. **A.** Schéma représentatif des différentes cellules hématopoïétiques présentes dans le sang et dans les tissus de mammifères et la hiérarchie des progéniteurs à leur origine présents dans la moelle osseuse. *Image traduite et modifiée de Mikael Häggström.* **B.** Images au microscope des principales cellules hématopoïétiques présentes dans le sang périphérique des mammifères après coloration par la tache Leishman pour les érythrocytes et thrombocytes ou après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine pour les autres cellules. *Images obtenues de Hill, M.A. 2020. Embryology.*

2013).

D'autre part, lors de la recombinaison des gènes codant les chaînes des TCR, les précurseurs des lymphocytes T subissent une sélection positive et négative dans le thymus. Seuls les lymphocytes dont leur TCR interagissent faiblement avec les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) I ou II survivent (les cellules qui n'interagissent pas ou qui interagissent très fortement avec le CMH meurent par apoptose). A ce stade de maturation, deux grands groupes des lymphocytes T sont générés : les lymphocytes CD4⁺ qui se lient au CMH II et les lymphocytes CD8⁺ qui se lient au CMH I. Tous les deux sont libérés dans la circulation sanguine et vont migrer vers les tissus lymphoïdes. Lors de leur activation par un antigène, les lymphocytes prolifèrent et se différencient en lymphocytes T matures effecteurs (lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ ou lymphocytes auxiliaires/régulateurs CD4⁺) ou à mémoire. Ces derniers, comme les lymphocytes B à mémoire, peuvent survivre jusqu'à 20 ans dans l'organisme (Scadden and Aster, 2011).

3.2.6. Les lymphocytes cytotoxiques naturels ou natural killer

Au sein du lignage lymphoïde, et contrairement aux lymphocytes B et T, les lymphocytes cytotoxiques naturels ou NK, sont des grandes cellules caractérisées par le fait qu'ils contiennent des granules dans le cytoplasme. Ils dérivent des CLP de la moelle osseuse et leur lymphopoïèse est régulée par l'IL-15. Leur principale fonction est d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales ou dans les cellules affectées par des agents étrangers tels que les virus. A cette fin, ils sécrètent des molécules cytotoxiques telles que des granzymes et des perforines qui induisent la lyse de bactéries, de champignons ou de cellules tumorales. Les NK agissent également sur les cellules eucaryotes étrangères à l'organisme, hétérologues ou xénogéniques et jouent un rôle important dans le rejet du greffon allogéniques. De même, une sous-population de ces lymphocytes sécrète des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Monserrat Sanz et al., 2013; Scadden and Aster, 2011).

3.2.7. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont un groupe hétérogène de cellules présentatrices d'antigènes. Avec les macrophages, ces cellules ont la capacité de capturer des antigènes associés à des molécules externes à l'organisme et de les présenter aux lymphocytes T pour induire la réponse immunitaire adaptative. Bien que leur ontogenèse ait fait l'objet d'un grand débat, certaines études suggèrent que les cellules dendritiques peuvent provenir à la fois des lignées lymphoïdes et myéloïdes. Du côté myéloïde, les cellules dendritiques dites conventionnelles seraient issues des CFU-GM. Du côté lymphoïde, les cellules dendritiques plasmacytoïdes seraient dérivées des CLP. Toutefois, ces dernières ne semblent pas avoir une activité de présentation d'antigènes et sécrètent des interférons et des cytokines inflammatoires en réponse aux agents pathogènes (Dress et al., 2019).

Tableau 9. Marqueurs, les plus utilisés, pour l'identification des principaux types cellulaires hématopoïétiques matures. Traduit de Biolegend.com

Cellules hématopoïétiques	Marqueurs	Cellules hématopoïétiques	Marqueurs
<i>Lymphocytes B</i>	CD19	<i>Macrophages</i>	CD11b, CD68, CD163
<i>Lymphocytes T</i>	CD3, CD56(-)	<i>Monocytes</i>	CD14, CD16*, CD64
<i>Lymphocytes T activés</i>	CD25, CD69	<i>Erythrocytes</i>	CD235a
<i>Cellules dendritiques conventionnelles</i>	CD1c, CD83, CD141, CD209, MCHII	<i>Neutrophiles</i>	CD15, CD16, CD49d (-)
<i>Cellules dendritiques plasmacytoïdes</i>	CD123, CD303, CD304	<i>Basophiles</i>	2D7 antigène, CD117 (-), CD123, CD203c, FcεRIα
<i>Plaquettes</i>	CD42b	<i>Eosinophiles</i>	CD11b, CD193, EMR1, Siglec-8
<i>Plaquettes activées</i>	CD62P		

*L'expression de ce marqueur est variable et peut identifier des sous-classes cellulaires.

3.3. Les cellules souches hématopoïétiques

3.3.1. Caractérisation phénotypique

Tous les types cellulaires décrits précédemment ont à leur origine les CSH (Figure 15). Bien que les CSH soient sans aucun doute l'une des cellules souches adultes les plus étudiées chez la souris et l'homme, leur caractérisation a été difficile en raison de leur rareté dans la moelle osseuse (les CSH représentent environ le 0,01% du total des cellules de la moelle osseuse). Aujourd'hui, grâce à la cytométrie en flux, les CSH de souris sont définies par l'absence de marqueurs de lignages hématopoïétiques matures (Lin^-) et de la molécule de signalisation de l'activation lymphocytaire 2 (SLAM de l'anglais « *signaling lymphocyte activation molecule* » ou CD48), ainsi que par l'expression de l'antigène des cellules souches 1 (SCA-1 de l'anglais « *stem cell antigen 1* » ou Ly6A/E), c-KIT (de l'anglais « *proto-oncogene c-Kit, tyrosine-protein kinase* » ou CD117) et SLAMF1 (CD150). Cependant, cette population $Lin^-SCA-1^{high}c-KIT^{high}CD150^+CD48^-$ est hétérogène comme le démontrent les études *in vivo* où seulement 50% des cellules reconstituent l'hématopoïèse à long terme chez des souris irradiées (Kiel et al., 2005). De plus, l'absence de CD34 (Wilson et al., 2008) ou l'ajout d'autres marqueurs de la famille SLAM peut distinguer différentes sous-populations de progéniteurs parmi lesquelles les cellules $Lin^-SCA-1^{high}c-KIT^{high}CD150^+CD48^-CD229^-(SLAMF3)^-CD244^-(SLAMF4)^-$ avec une capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme plus élevée (Oguro et al., 2013). Chez l'homme, les CSH ont été isolées, à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique des patients

traités par le G-CSF pour mobiliser les CSH vers le sang et du SCO (Arcangeli et al., 2015). Au sein de la population Lin⁻ (Tableau 9), les niveaux de reconstitution les plus élevés (~20%) sont ceux générés par les cellules Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90 (Thy-1)⁺CD45RA⁻CD49f (intégrine $\alpha 6$)⁺ (Notta et al., 2011). Cependant et malgré le fait que le marqueur CD34 soit utilisé en routine pour isoler les CSH humaines, certaines études suggèrent que le compartiment CD34⁺Lin⁻ correspondraient à des CSH *bona fide*, au sommet de la hiérarchie hématopoïétique, avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme, même si les fréquences de reconstitution sont faibles (Anjos-Afonso et al., 2013; Bhatia et al., 1998). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules sont en quiescence et requièrent plus de temps pour activer leur cycle cellulaire et proliférer (voir ci-dessous le concept de quiescence). Une discrimination supplémentaire de la population souche a pu être établie à travers leur résistance intrinsèque à certains colorants (*e.g.* Hoescht ou Rhodamine) ou médicaments (drogues, antibiotiques) induite par l'expression des transporteurs ou pompes ABC (« *ATP binding cassette* »). La capacité à effluer ces molécules a permis de distinguer les CSH, qui retiennent peu de colorant dans leur cytoplasme, des progéniteurs et des cellules matures, qui le maintiennent à l'intérieur de la cellule (Goodell et al., 1997; Kim et al., 1998; McKenzie et al., 2007).

3.3.2. Caractérisation fonctionnelle

L'identification des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques requiert des tests qui révèlent les deux caractéristiques fondamentales des cellules souches : leur potentiel d'auto-renouvellement et leur capacité de différenciation (Figure 16). Les tests *in vitro* sont généralement utilisés pour révéler le potentiel de différenciation des CSH, bien que certains d'entre eux permettent aussi de déterminer les capacités de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. La culture cellulaire dans un milieu semi-solide de méthylcellulose, enrichie avec des facteurs de croissance hématopoïétiques, favorise la formation de colonies érythroïdes et myéloïdes. Ce test, connu sous le nom de test des cellules formant colonies (CFC de l'anglais « *colony-forming cell* »), est un test qui permet de connaître la composition de la population cellulaire initiale seulement à *posteriori*. Comme il s'agit d'un test clonal, c'est-à-dire que chaque colonie provient d'un progéniteur CFU, le nombre total de colonies et leur identité permet de connaître la fréquence des progéniteurs et leur nature (multipotent ou unipotent) (Arcangeli et al., 2015; Rossmann et al., 2017). Pour vérifier le potentiel lymphoïde, une version modifiée du test CFC en présence de SCF (facteur des cellules souches, de l'anglais « *stem cell* »

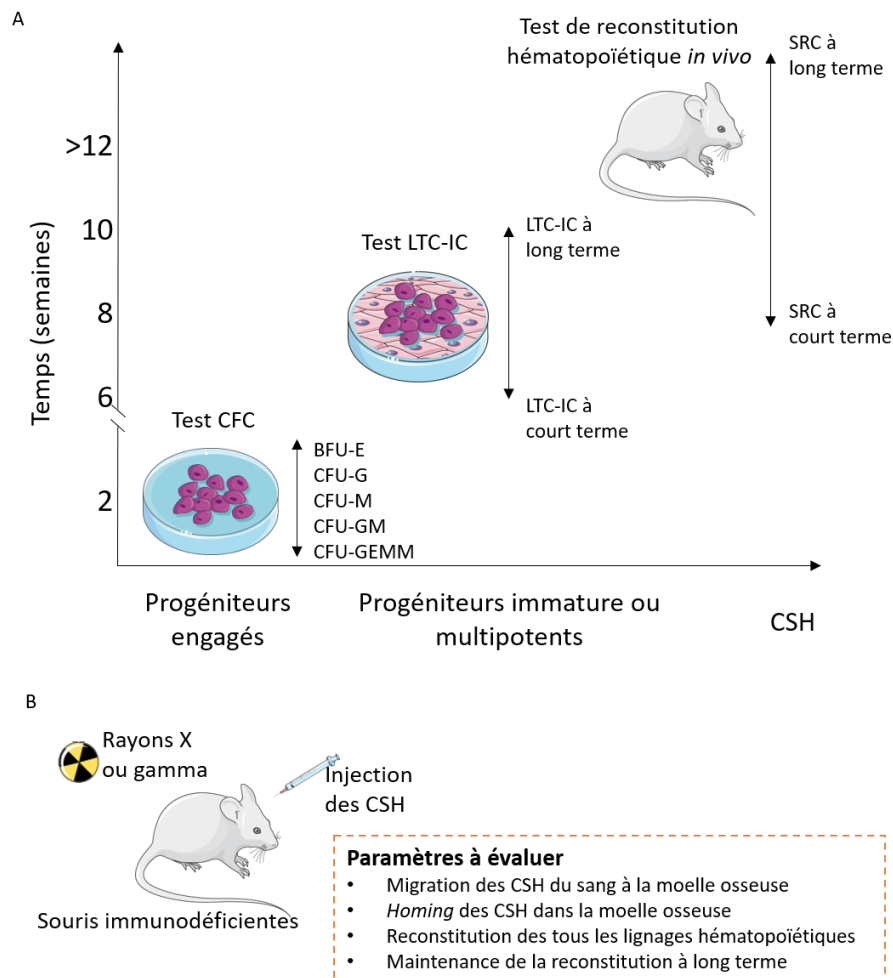


Figure 16. Test fonctionnels des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. **A.** Schéma représentatif des trois tests fonctionnels principaux pour déterminer le potentiel souche hématopoïétique d'une population *in vitro* et *in vivo*. Leurs caractéristiques en termes de durée de l'expérience et des populations hématopoïétiques identifiées par ces méthodes sont illustrées dans les axes X et Y, respectivement. CFC: *colony-forming cell*; LTC-IC: *long term culture-initiating cell*; SRC: *SCID mouse repopulating cells*. **B.** Test de reconstitution hématopoïétique des populations cellulaires humaines chez des souris immunodéficientes irradiées avec des rayons X ou gamma et paramètres possibles à évaluer avec ce modèle. Traduit et modifié de Arcangeli et al. 2014.

factor ») et d'IL-7 favorise la formation de lymphocytes B à partir de progéniteurs chez la souris (Paige et al., 1984). Chez l'homme, l'un des systèmes les plus utilisés est la coculture de CSH ou de progéniteurs hématopoïétiques avec des lignées stromales (*e.g.* MS5 ou OP9) génétiquement modifiées pour exprimer le ligand de la voie Notch, DLL (de l'anglais « *delta-like protein* ») 1 ou 4 et en présence de facteurs de croissance hématopoïétiques qui permettent la production de lymphocytes B et T (Calvo et al., 2012; Mohtashami et al., 2010; La Motte-Mohs et al., 2005). Enfin, la détection des cellules quiescentes, qui ont besoin d'une longue période de temps pour proliférer et se différencier, se fait par le test de cellule initiant une culture à long terme (LTC-IC de l'anglais « *long term culture-initiating cell* »). Comme le test précédent, le test LTC-IC nécessite la coculture de CSH avec des cellules stromales, généralement d'origine murine (*e.g.* M2-10B4), pendant 5 à 12 semaines (Gartner and

Kaplan, 1980; Rossmann et al., 2017). Lors de la coculture, les cellules adhèrent et acquièrent une morphologie caractéristique en forme de brique. Au bout de 5 semaines, les cellules peuvent être récupérées et cultivées en méthylcellulose pour déterminer leur potentiel de différenciation. Les dilutions limites de la population initiale permettent également d'établir la fréquence des progéniteurs dans la population étudiée (Arcangeli et al., 2015; Sutherland et al., 1990).

Bien que les tests *in vitro* permettent une caractérisation rapide d'une population, l'existence des CSH *bona fide* ne peut être déterminée qu'*in vivo* avec les tests de compétitivité de reconstitution hématopoïétique. Dans le cas des CSH de souris, les expériences *in vivo* requièrent la myéloablation des souris receveuses pour l'élimination des cellules prolifératives de la moelle osseuse. À cette fin, les souris sont généralement irradiées avec des rayons gamma ou des rayons X ou traitées au busulfan suivi de l'injection des cellules à greffer 24 à 48 heures plus tard. Les CSH peuvent être injectées par voie intraveineuse pour déterminer leur potentiel de migration ou directement dans la moelle osseuse du fémur ou du tibia de la souris. Afin d'identifier les CSH du donneur chez la souris receveuse, les souris donneuses et receveuses sont choisies par rapport à l'expression des allèles du marqueur hématopoïétique CD45. Ainsi, par exemple, la souris donneuse sera CD45.1 alors que la souris receveuse sera CD45.2. L'identification des cellules greffées est effectuée entre 4 à 12 semaines après l'injection pour estimer une reconstitution à court terme et après 16 semaines pour le potentiel de reconstitution à long terme. La présence de cellules du donneur peut être détectée à partir d'échantillon du sang périphérique ou de la moelle osseuse (*post-mortem*) (Arcangeli et al., 2015; Beyer and Muench, 2017; Rossmann et al., 2017). Des greffes secondaires ou tertiaires des cellules de souris receveuses confirment la présence de CSH *bona fide* (Frisch and Calvi, 2014). Dans le cas des cellules humaines, étant donné l'impossibilité de réaliser ces expériences sur des êtres humains, on utilise couramment des souris immunodéprimées comme receveuses. Ainsi, afin de minimiser le rejet des CSH humaines, différentes souches de souris ont été génétiquement modifiées pour éliminer l'expression des CMH (*e.g.* la souche NOD, de l'anglais « non-obese *diabetic* ») et l'activité des lymphocytes B, T et NK (*e.g.* NOD-SCID, de l'anglais « *severe combined immunodeficiency* »). Récemment, des souris "humanisées" exprimant le CMH I et/ou II humain ont été générées. Toutes ces modifications ont permis d'améliorer la transplantation des CSH, de démontrer les capacités de reconstitution hématopoïétique des différentes populations des CSH humaines et d'étudier les interactions avec les cellules de la niche (Arcangeli et al., 2015 ; Beyer et Muench, 2017).

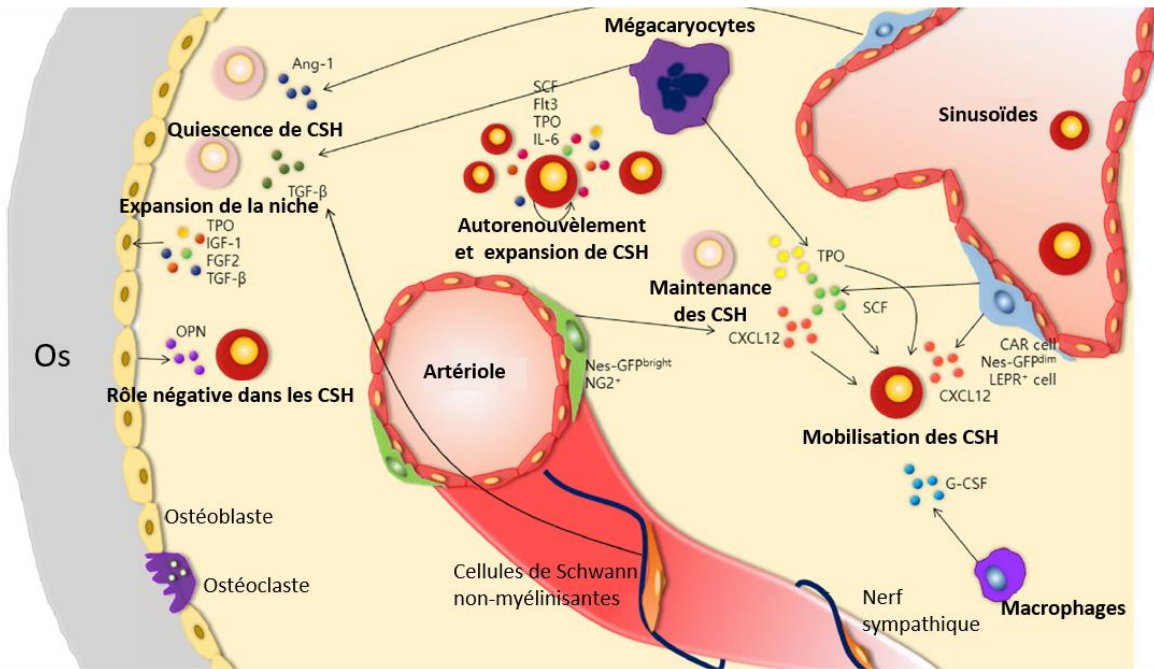
3.3.3. Quiescence, prolifération et différenciation des CSHs

Les CSH ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en tous les lignages hématopoïétiques décrits précédemment, raison pour lesquelles elles sont considérées comme des

cellules souches multipotentes. Tel qu'il sera illustré dans les sections suivantes, les CSH adultes ont leur origine dans les premiers stades du développement embryonnaire et grâce à leur capacité de prolifération, elles assurent le stock de cellules hématopoïétiques tout au long de la vie d'un individu. Cependant, la prolifération de ces cellules est strictement contrôlée et un dysfonctionnement de leur cycle cellulaire peut provoquer l'apparition de complications hématologiques (*e.g.* leucémies, myélomes). Il convient de souligner que l'étude des mécanismes qui contrôlent l'équilibre entre la quiescence, la prolifération et la différenciation des CSH a permis d'accumuler de vastes connaissances sur ces cellules. Cependant, étant donné que ce sujet est loin des objectifs de cette thèse, nous nous concentrerons dans cette section sur les informations les plus pertinentes qui peuvent éclairer les résultats obtenus pendant mon travail doctoral.

Le cycle cellulaire peut être résumé par une phase initiale G1 de préparation de la cellule, suivie de la phase de duplication de l'ADN ou phase S, ensuite d'une phase G2 pour le contrôle des erreurs dans la duplication de l'ADN et enfin, la mitose ou division cellulaire. Dans la phase G1, avant le début effectif de la division cellulaire, il existe un point de restriction qui, selon l'état de la cellule, peut empêcher la poursuite vers la phase S (Nakamura-Ishizu et al., 2014). Dans ce dernier cas, les cellules sont arrêtées dans la dénommée phase G0. La phase G0 ou état de quiescence est un état extérieur au cycle cellulaire qui, dans le cas des cellules souches, protège les cellules contre une prolifération excessive et l'accumulation de mutations liées à la prolifération cellulaire (Nakamura-Ishizu et al., 2014). Chez la souris, environ 70% des CSH sont quiescentes ou dormantes (Wilson et al., 2008). La quiescence des CSH est liée à un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme (Nakamura-Ishizu et al., 2014). La niche ou le microenvironnement qui les entoure dans la moelle osseuse, composés de différents types de cellules et de protéines de l'ECM, génère des signaux nécessaires au maintien des cellules en phase G0. Lors d'une lésion de la moelle osseuse ou d'une stimulation exogène (par exemple par le G-CSF), les CSH dormantes rentrent dans le cycle cellulaire pour s'auto-renouveler ou se différencier (Nakamura-Ishizu et al., 2014; Wilson et al., 2008) (Figure 17). Deux niches différentes ont été décrites dans la moelle osseuse : la niche ostéoblastique (ou endostéale) et la niche vasculaire (ou sinusoidale) (Lee et al., 2020). Selon diverses études, la niche endostéale favoriserait principalement la quiescence et le maintien de la population des CSH dans cet état, tandis que la niche vasculaire induirait la mobilisation, la prolifération et la différenciation

A



B

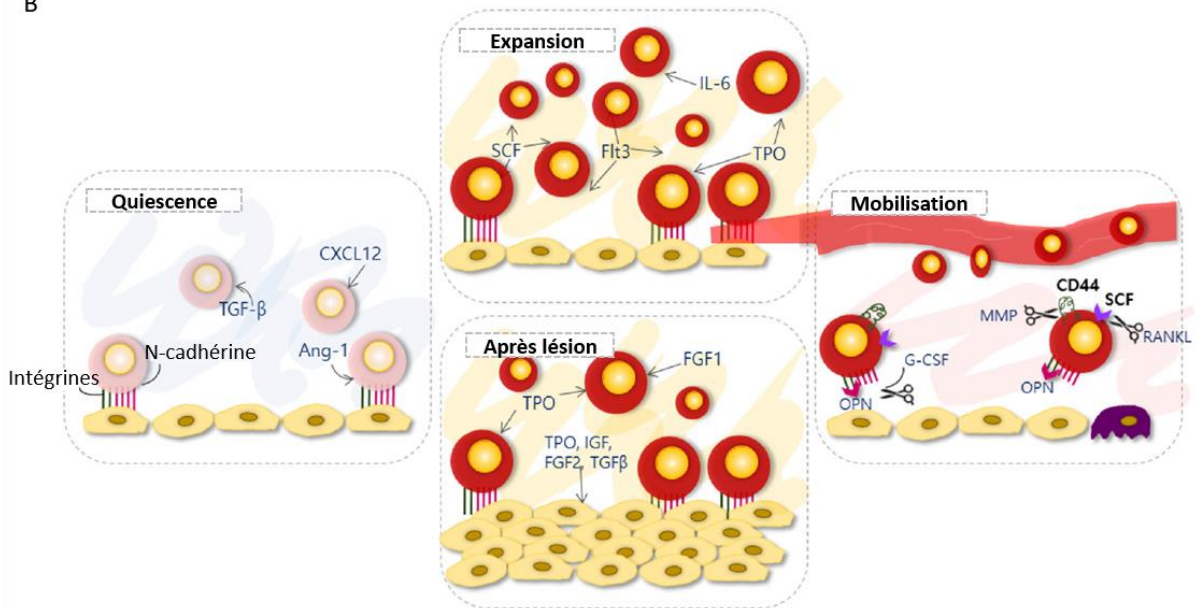


Figure 17. Rôle de la niche des CSH de la moelle osseuse dans le maintien des propriétés caractéristiques des CSH adultes. A. Représentation des différentes molécules secrétées par les cellules de la moelle osseuse et leurs rôles dans la quiescence, expansion et mobilisation des CSH. Deux niches des CSH sont identifiées dans la moelle osseuse : la niche ostéoblastique et la niche vasculaire autour des capillaires sinusoidales. B. Evolution des CSH dans la moelle osseuse : les CSH restent en état quiescent ou dormant jusqu'à qu'elles soient requises pour augmenter le stock des CSH et pour générer des progéniteurs hématopoïétiques. Entre les signaux qui induisent l'expansion des CSH, la lésion de la niche, par exemple, par des molécules chimiques ou des radiations, induit la prolifération des ostéoblastes pour réparer la niche. Finalement, les CSH peuvent être mobilisées pour se différencier en cellules hématopoïétiques matures. *Traduit et adapté de Lee et al. 2020.*

des CSH (Galán-Díez and Kousteni, 2017; Lee et al., 2020) grâce à la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance et de l'ECM (Figure 17). L'un de ces signaux est médié par la chimiokine 12 de motif

(CXCL12 de l'anglais « *C-X-C motif chemokine ligand 12* ») ou le facteur dérivé des cellules stromales 1 (SDF1 de l'anglais « *stromal cell-derived factor 1* ») sécrété par les CE, périvasculaires, réticulaires et ostéoblastiques et dont le récepteur CXCR4 est exprimé par les CSH humaines et murines. L'interaction entre cette chimiokine et son récepteur est impliquée dans la mobilisation des CSH vers ou depuis la moelle osseuse (Peled et al., 1999) et dans le maintien de la quiescence des CSH (Nie et al., 2008; Sugiyama et al., 2006; Tzeng et al., 2011) bien que son mode d'action sur le cycle cellulaire soit encore inconnu. Le facteur des cellules souches SCF sécrété principalement par les CE et les cellules périvasculaires (Ding et al., 2012) et son récepteur c-KIT participent également au contrôle de l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH (Thorén et al., 2008). Le rôle de cette voie de signalisation dans ces processus pourrait être dépendant de la dose, car chez la souris, les CSH présentant des niveaux élevés de c-KIT prolifèrent davantage par rapport à celles présentant de faibles niveaux de ce récepteur (Shin et al., 2014). De plus, le SCF favorise les interactions entre les CSH et la niche grâce à la régulation de l'expression des intégrines $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 et $\alpha 5\beta 1$ ou VLA-5 (Kovach et al., 1995). En effet, les intégrines jouent un rôle très important dans le *homing* des CSH dans la moelle osseuse grâce à leurs interactions avec la VCAM-1, la fibronectine matricielle et l'ostéopontine exprimées par les cellules stromales de la moelle osseuse (Peled et al., 2000). Le blocage de l'intégrine VLA-4 et VLA-5 par des anticorps induit la mobilisation des CSH (Peled et al., 2000).

L'un des facteurs les plus étudiés dans le maintien de la quiescence des CSH est le TGF- β (Blank and Karlsson, 2011). *In vitro*, les inhibiteurs de cette voie déclenchent l'entrée des CSH dans le cycle cellulaire chez l'homme (Hatzfeld et al., 1991) et chez la souris (Soma et al., 1996). Le TGF- β est principalement produit par les CSH elles-mêmes (Lee et al., 2020; Yamazaki et al., 2011) ainsi que par les cellules de Schwann non myélinisantes des nerfs (Yamazaki et al., 2011) et les mégacaryocytes de la moelle osseuse (Zhao et al., 2014). Le TGF- β induit l'expression de la protéine cycline dépendante p57, appartenant à la famille des inhibiteurs de kinases, dans les CSH CD34⁺ humaines (Scandura et al., 2004) et dans les CD34⁺Lin⁻SCA-1^{high}c-KIT^{high} de souris (Yamazaki et al., 2011). En accord avec ces résultats, la p57 a été décrite comme l'une des protéines fondamentales dans l'inhibition du cycle cellulaire dans les cellules hématopoïétiques (Matsumoto et al., 2011). Enfin, l'angiopoïétine-1 (Ang-1) a été décrite comme un autre régulateur de la quiescence des CSH exprimant le récepteur de cette cytokine, TIE2 (Arai et al., 2004). L'interaction de l'Ang-1 produite par les ostéoblastes avec la TIE-2 des CSH favorise l'adhésion des CSH aux cellules stromales, induisant la quiescence des cellules hématopoïétiques. Bien que les détails de cette induction restent inconnus, une fonction similaire de l'Ang-1 a été décrite dans les CE qui, par la voie de la phosphatidylinositol 3 kinase et de la protéine kinase B (PI3K/AKT), régulent les protéines liées au cycle cellulaire telles que la survivine ou la caspase 9 (Augustin et al., 2009).

Tableau 10. Facteurs de transcription qui participent au contrôle de la quiescence et de la prolifération des CSH. Traduit de Wang et Ema 2016.

Facteur de transcription	Modèle de souris	Effet sur les CSH	Références
<i>SCL</i>	<i>SCL</i> ^{-/-}	Maintien en phase G0	Lacombe et al., 2009
<i>PBX</i>	Knock-out conditionnel	Auto-renouvellement	Ficara et al., 2008
<i>ERG-1</i>	<i>ERG1</i> ^{-/-}	Maintien en phase G0	Min et al., 2008
<i>GFI-1</i>	<i>GFI1</i> ^{-/-}	Maintien en phase G0	Hock et al., 2004
<i>EVI-1</i>	Knock-out conditionnel	Auto-renouvellement	Goyama et al., 2008
<i>PU.1</i>	Knock-out conditionnel	Maintien en phase G0	Staber et al., 2013
<i>FOXO</i>	Knock-out conditionnel	Maintien en phase G0	Miyamoto et al., 2007
<i>MEF</i>	<i>MEF</i> ^{-/-}	Entrée dans le cycle cellulaire	Lacorazza et al., 2006
<i>P53</i>	<i>P53</i> ^{-/-}	Maintien en phase G0	Liu et al., 2009

D'autre part, plusieurs facteurs de croissance ont été décrits comme des activateurs du cycle cellulaire des CSH. Notamment le SCF, le ligand du récepteur de tyrosine kinase 3 du type FMS (FLT3-L, de l'anglais « *fms-like tyrosine kinase-3 ligand* »), la TPO, les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline 1 et 2 (IGF-1 et IGF-2 de l'anglais « *insulin-like growth factor-1* »), le FGF et l'IL-6 qui sont souvent utilisés dans les cocktails de cytokines pour l'expansion des CSH *in vitro* (Lee et al., 2020; Ueda et al., 2000). Chez la souris, l'absence de FLT-3L affecte l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques à exception des lignages mégacaryocytaires et érythroïdes (McKenna et al., 2000). Cependant, le FLT-3L joue des rôles différents dans le maintien et la différenciation des CSH en synergie avec d'autres cytokines. Plus précisément, avec le SCF, le FLT-3L régule l'expansion des CSH chez l'homme (Gabbianelli et al., 1995) et chez la souris (Jacobsen et al., 1995; Mackarehtschian et al., 1995). Tel que pour le SCF, la TPO et son récepteur MPL (protéine de la leucémie myéloproliférative, de l'anglais « *myeloproliferative leukemia protein* » ou CD110) ont été décrits à la fois dans le maintien de la quiescence (Qian et al., 2007) et dans l'autorenouvellement des CSH (Borge et al., 1996; Kimura et al.,

1998). Les CSH de souris déficientes en TPO ont une expression réduite des inhibiteurs du cycle cellulaire p57 et p19 (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007). D'autres études suggèrent que l'induction de la quiescence ou de la prolifération des CSH par la TPO pourrait dépendre de la protéine adaptative LNK (Buza-Vidas et al., 2006) en plus d'agir en synergie avec d'autres protéines pour favoriser la prolifération des CSH (Sitnicka et al., 1996). L'axe TPO/MPL contribuerait également à l'interaction entre les CSH et les ostéoblastes grâce à la régulation de TIE-2 et de l'intégrine $\beta 1$ (Yoshihara et al., 2007). Finalement, d'autres protéines n'agissent pas seulement sur les CSH mais aussi sur les cellules stromales favorisant le maintien de la niche de la moelle osseuse. C'est le cas de l'IGF-1, qui favorise la prolifération des ostéoblastes de la moelle osseuse (Caselli et al., 2013) et du FGF-2 (Yeoh et al., 2006; Yoon et al., 2017) (Figure 17).

Enfin, plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés dans le contrôle de la quiescence et de l'expansion des CSH et sont résumés dans le Tableau 10. L'un des facteurs de transcription le plus étudié est le facteur HOXB4 dont la surexpression dans les CSH de souris a conduit à 40 fois plus de CSH *in vitro* sans modification apparente de leurs potentiels de différenciation (Antonchuk et al., 2002). Étant donné que les CSH sont actuellement utilisées chez l'homme comme traitement des hémopathies malignes, l'expansion des CSH *in vitro* pourrait être d'une grande utilité en clinique. Dans ce contexte, une équipe canadienne a génétiquement modifié une lignée stromale pour favoriser la synthèse et sécrétion de HOXB4, perméable aux CSH lors de leur coculture. Avec cette méthode, ils ont obtenu *in vitro* 20 fois plus de CSH humaines avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme (Antonchuk et al., 2002), démontrant ainsi, que la compréhension des mécanismes qui régulent l'équilibre entre quiescence et prolifération des CSH est essentiel pour améliorer les greffes de CSH.

3.4. Développement embryonnaire des cellules hématopoïétiques

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse des organismes adultes renouvellent constamment le pool de cellules sanguines. Au sommet de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques se trouvent les CSHs qui maintiennent le stock de CSH tout au long de la vie d'un individu. Environ 150 sont sollicitées par jour. Ces cellules ont leur origine dans les premiers stades du développement embryonnaire et sont étroitement liées à un endothélium spécialisé, l'endothélium hémogénique. Il n'est pas surprenant que les vaisseaux sanguins qui transportent le sang se développent en même temps que les composants sanguins qu'ils contiennent. Les premières cellules hématopoïétiques sont observées dès les premiers stades de l'embryon vers la troisième semaine de gestation chez l'homme, et autour de E7,5 chez la souris. Cependant, contrairement à l'hématopoïèse adulte, l'hématopoïèse embryonnaire à ces stades

ne génère pas toutes les lignées hématopoïétiques décrites dans les sections précédentes. En effet, la capacité à produire certains lignages hématopoïétiques a permis de sous-classer l'hématopoïèse embryonnaire en deux vagues successives : l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive (Figure 18).

3.4.1. L'hématopoïèse primitive

Chez la souris, une première vague d'hématopoïèse dite primitive a lieu dans les îlots sanguins du sac vitellin. La couche extérieure des îlots sanguins donne naissance à des angioblastes, tandis qu'à l'intérieur de ceux-ci, des érythrocytes, des mégacaryocytes et des macrophages sont générés. Les érythrocytes de cette première vague hématopoïétique sont dérivés d'un progéniteur érythroïde transitoire appelé EryP-CFC (de l'anglais « *primitive erythroid progenitor* ») entre E7,25 et E9 (Palis et al., 1999). Contrairement aux érythrocytes définitifs, ces cellules sont plus grandes et contiennent un noyau. Cependant, autour du stade E8, des érythrocytes nucléés primitifs entrent dans la circulation sanguine (Ji et al., 2003) et pendant leur maturation, perdent leur noyau entre E12,5 et E16,5 (Kingsley et al., 2004; McGrath et al., 2008). Les érythrocytes se distinguent également de leurs homologues définitifs par l'expression des chaînes de globine qui composent leur hémoglobine. Alors que les érythrocytes primitifs expriment les globines ϵ et γ ($\epsilon\gamma$ et $\beta H1$ chez la souris) et les globines ζ et α ; les érythrocytes définitifs expriment les globines α et γ , dans le cas des érythrocytes fœtaux et les globines α et β dans les érythrocytes adultes ($\beta 1$ et $\beta 2$ chez la souris). Pendant la maturation des érythrocytes primitifs, un changement se produit dans l'expression de l'hémoglobine $\beta H1$ par l'hémoglobine $\epsilon\gamma$ chez les souris (Kingsley et al., 2006) et de l'hémoglobine ζ par l'hémoglobine α chez les humains (Peschle et al., 1985). Ces différences dans la composition de l'hémoglobine pourraient agir sur l'affinité de cette protéine pour l'oxygène (cette affinité est plus grande chez les globines embryonnaires) et donc être une adaptation embryonnaire pour augmenter les échanges gazeux mère-fœtus dans le placenta (Yamane, 2018). Autour d'E8 et E9, des macrophages et des mégacaryocytes sont également générés dans le sac vitellin (Bertrand et al., 2005; Palis et al., 1999; Potts et al., 2014; Tober et al., 2007; Xu et al., 2001b). Tel que pour les érythrocytes primitifs, ces deux lignages présentent des caractéristiques différentes de leurs homologues définitifs générés dans la moelle osseuse. Notamment, les macrophages primitifs arrivent à maturité sans passer par le stade monocyte (Bertrand et al., 2005), tandis que les mégacaryocytes sont diploïdes (au lieu d'être polyploïdes comme les mégacaryocytes définitifs) et génèrent des plaquettes plus grandes en comparaison aux plaquettes définitives (Potts et al., 2014) (Figure 18). Il est intéressant de noter que certains macrophages primitifs subsistent à l'âge adulte dans quelques tissus et donnent naissance à la microglie du cerveau (Ginhoux et al., 2010), dans une moindre mesure, contribuent à la population de macrophages résidents des poumons, de la peau et du foie (Schulz et al., 2012).

3.4.2. L'hématopoïèse définitive

Les cellules hématopoïétiques primitives sont très tôt remplacées par une deuxième vague d'hématopoïèse. À partir d'E9, les progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP de l'anglais « *erythro-myeloid progenitors* ») peuvent être identifiés dans le sac vitellin de la souris (Palis et al., 1999). Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression de c-KIT, CD41 (intégrine α IIb), CD16 (Fc γ RIII) et par l'absence de SCA-1. Ils donnent lieu à une seconde vague de l'hématopoïèse responsable de la production d'érythrocytes, granulocytes, monocytes et mégacaryocytes, tous avec des phénotypes et des fonctionnalités similaires à ceux des cellules adultes (McGrath et al., 2015; Mitjavila-Garcia et al., 2002). Yoshimoto *et al.* ont identifié des progéniteurs lymphoïdes autour d'E9 et E9.5 dans le sac vitellin et dans l'endothélium de la splanchnopleure para-aortique (P-Sp de l'anglais « *para-aortic, splanchnopleural* ») capables de générer des lymphocytes B et T *in vitro* et de reconstituer ces lignages après être greffés chez des souris immunodéficientes (Yoshimoto et al., 2011, 2012). L'étude de ces progéniteurs dans le sac vitellin à E9.5 suggère qu'il s'agit des progéniteurs multipotents engagés vers le lignage lymphoïde (LMPP, de l'anglais « *lymphoid-primed multipotent progenitors* »). Les LMPP coloniseraient le foie de la souris où ils donneraient lieu, non seulement à la lignée lymphoïde, mais aussi à la lignée myéloïde GM (Böiers et al., 2013) (Figure 18). Toutefois, la relation entre les LMPP et les EMP n'est pas encore établie, mais elle pourrait indiquer l'existence d'un progéniteur multipotent commun à ces deux lignées avant l'apparition des CSH.

Bien que cette seconde vague d'hématopoïèse génère des cellules définitives, certaines d'entre elles persistent jusqu'à la vie adulte, elle ne produit pas de CSH. C'est pourquoi de nombreux auteurs la considèrent comme une vague intermédiaire entre la vague primitive et la vague définitive de l'hématopoïèse (Ditadi et al., 2017; Yamane, 2018). Ainsi, l'hématopoïèse définitive est la vague d'hématopoïèse dans laquelle se forment les CSH qui maintiendront toutes les lignées hématopoïétiques tout au long de la vie d'un organisme. Pendant longtemps, le sac vitellin a été considéré comme le site exclusif de production de cellules hématopoïétiques, y compris les CSH. Cependant, à la fin du XXe siècle et au début du XXIe siècle, différentes études ont montré que donc l'hématopoïèse définitive, et la production de CSH, a lieu à l'intérieur de l'embryon chez les poulets

(Dieterlen-Lievre, 1975), les amphibiens (Turpen et al., 1981), les souris

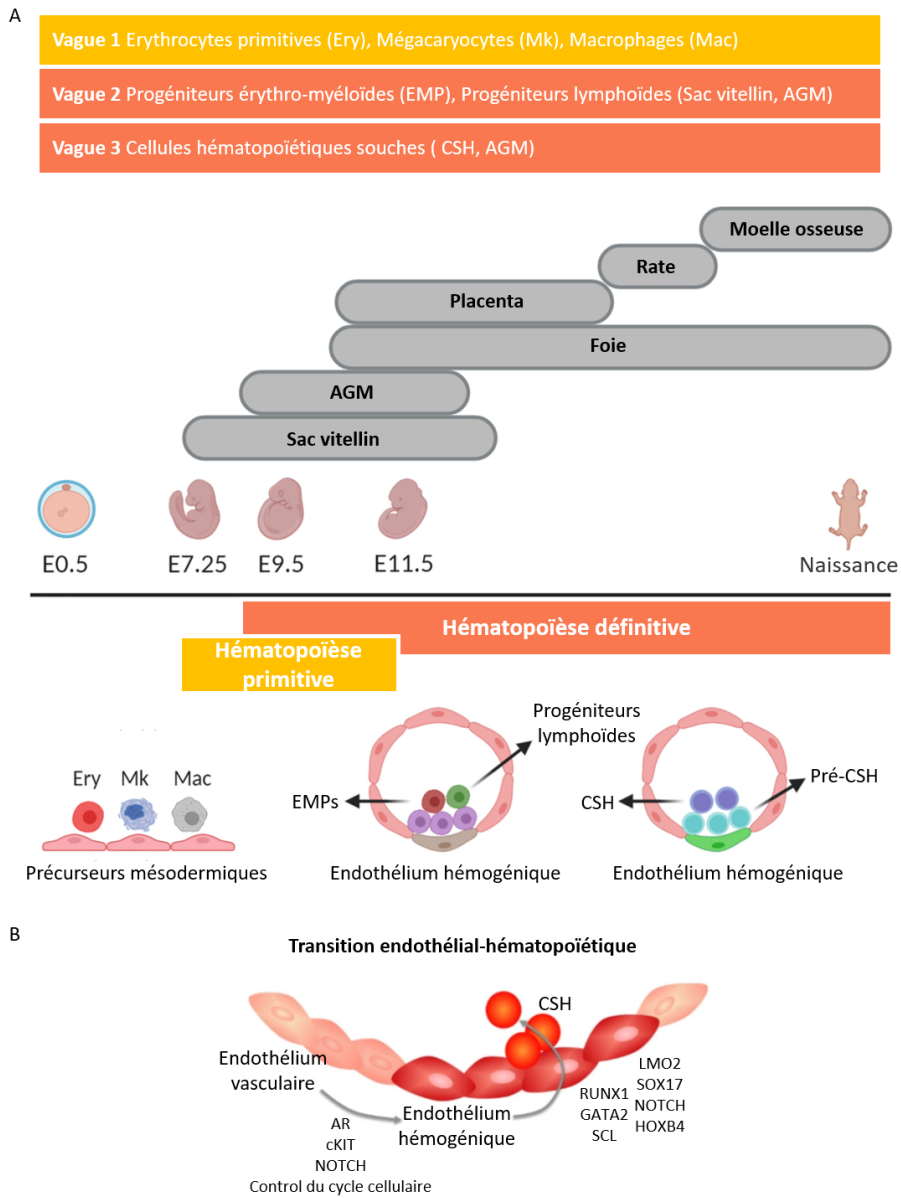


Figure 18. Développement hématopoïétique chez la souris. A. Les premières cellules hématopoïétiques correspondent aux érythrocytes (Ery), macrophages (Mac) et mégacaryocytes (Mk) primitifs générés dans le sac vitellin de la souris. Les lignages définitifs, y-compris les CSH, sont détectés quelques jours plus tard dans l'aorte-gonades-mésonephros (AGM), les artères vitellines et ombilicales et le sac vitellin. Un endothélium spécialisé, l'endothélium hémogénique, est à leur origine. Les progéniteurs hématopoïétiques, les pré-CSH et les CSH sont mobilisées vers le foie où a lieu l'expansion des CSH. Ces CSH vont, ensuite, migrer dans la rate et la moelle osseuse de la souris. Dans cette dernière, elles vont constituer le réservoir des CSH qui assurera l'hématopoïèse adulte. *Traduit et adapté de Demirci et al. 2020.* **B.** Schéma représentatif de l'endothélium hémogénique et de la TEH. Les cytokines, les facteurs de transcription et les voies de signalisation impliquées dans la spécification de cet endothélium sont présentés à gauche et ceux impliqués dans la TEH, sont affichés à la droite de la figure. *Traduit et adapté de Dejana et al. 2017*

(Cumano et al., 1995, 1996; Garcia-Porrero et al., 1995; Godin et al., 1995, 1993; Yoder et al., 1997) et les humains (Oberlin et al., 2002; Tavian and Péault, 2005). Chez la souris, autour de E8,5 et E9 dans la région de la P-Sp, notamment dans la paroi aortique dorsale, il existe une population homogène, qui précède l'apparition des CSH pendant le développement embryonnaire, qui donne naissance aux CSH *in vitro* dans les conditions de culture appropriées (Cumano et al., 2001; Taoudi et al., 2008). *In vivo*, ces cellules sont capables de reconstituer l'hématopoïèse chez des souris nouveau-nées irradiées (Yoder et al., 1997) ou chez des souris adultes, après culture *in vitro* avec des cellules stromales (Cumano et al., 2001). Aujourd'hui, cette population est appelée pré-HSC et elle est caractérisée par l'expression de la protéine endothéliale VE-cadhérine, de la glycoprotéine IIb-IIIa plaquettaire, CD41 et par l'absence du marqueur pan-hématopoïétique CD45. Les pré-CSH de type I, CD144⁺CD41⁺CD45⁻, acquièrent progressivement le phénotype hématopoïétique donnant un deuxième type de pré-CSH, les pré-CSH de type II, avec un phénotype CD144⁺CD45⁺ (Rybtsov et al., 2011; Taoudi et al., 2008). Bien que beaucoup de ces pré-CSH migrent vers le foie fœtal pour acquérir les caractéristiques des CSH matures, comme nous le verrons plus tard, les premières CSH se forment directement dans l'aortogonade mésonéphros (AGM), dérivées de la P-Sp, autour d'E10,5 (De Bruijn et al., 2000; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Müller et al., 1994). En effet, ce processus est transitoire chez l'embryon entre E10,5 et E12 (De Bruijn et al., 2000; Medvinsky and Dzierzak, 1996) et il se produit simultanément dans les artères vitellines et ombilicales (De Bruijn et al., 2000), dans les vaisseaux sanguins du placenta (Rhodes et al., 2008) et dans les artères de la tête de l'embryon des souris (Li et al., 2012). Les CSH et d'autres progéniteurs hématopoïétiques naissants peuvent être observés au microscope dans la partie ventrale de la lumière aortique organisée en clusters chez la souris (Wood et al., 1997) et d'autres vertébrés, y compris l'homme (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981; Oberlin et al., 2010a, Figure 19).

3.4.2.1. Spécification de l'endothélium homogène

L'origine endothéliale des cellules hématopoïétiques définitives a été confirmée à la fin du XXème siècle par l'équipe de Dieterlen-Lièvre chez le poulet grâce à des marquages spécifiques de l'endothélium (dil LDL) *in vivo* qui ont été maintenus dans les cellules hématopoïétiques naissantes (Jaffredo et al., 1998). Chez la souris, en plus des marquages des CE *in vivo* (Oberlin et al., 2010a; Sugiyama et al., 2003; Zovein et al., 2008), la microscopie à intervalles de temps sur des tranches d'embryons de souris a permis de visualiser la transition endothéliale-hématopoïétique (TEH) dans laquelle les CE bourgeonnent de la paroi aortique tout en acquérant un phénotype hématopoïétique caractérisé par l'expression de CD41, c-KIT et SCA-1 (Boisset et al., 2010). Bien qu'aujourd'hui il n'existe aucun doute sur l'origine endothéliale des cellules hématopoïétiques, le moment exact du développement embryonnaire où la spécification de cet endothélium homogène a lieu et les mécanismes qui y conduisent sont inconnus. En effet, toutes les cellules qui tapissent les parois de

l'aorte n'ont pas la capacité à devenir des cellules hématopoïétiques. Seul un sous-ensemble de cet endothélium, situé principalement dans la région ventrale de l'aorte dorsale, subit une TEH entre E10,5 et E12 (Taoudi and Medvinsky, 2007). Pardanaud *et al.* ont démontré, chez le poulet, que l'endothélium aortique avait deux origines différentes. L'endothélium de la paire d'aortes dorsales, dérivé du mésoderme splanchnopleurale, est progressivement remplacé par l'endothélium dérivé du mésoderme somitique lors de la fusion des deux aortes chez le poulet (Pardanaud et al., 1996). L'hématopoïèse définitive coïncide dans le temps avec une aorte d'origine mixte composée d'un endothélium d'origine somitique sur le côté dorsal et latéral et dérivé de la splanchnopleure sur le côté ventral. Il est intéressant de noter que la disparition des clusters hématopoïétiques dans l'aorte se produit en même temps que l'endothélium aortique est remplacé entièrement par les CE d'origine somitique, ce qui suggère qu'au moins chez le poulet, l'endothélium hémogénique serait dérivé du mésoderme-splanchnopleurale (Pardanaud et al., 1996). D'autre part, des expériences menées chez la souris ont mis en évidence le rôle des tissus localisés autour de l'AGM dans l'induction ou l'inhibition de l'hématopoïèse. Ainsi, les signaux provenant des tissus placés du côté dorsal de l'AGM (*e.g.* le tube neural) pourraient inhiber l'hématopoïèse de ce côté de l'aorte, tandis que les signaux provenant des tissus ventraux (*e.g.* l'endoderme gastro-intestinal) favoriseraient l'hématopoïèse sur la paroi ventrale (*e.g.* VEGF, bFGF, TGF- β , BMP4) (Gritz and Hirschi, 2016; Jaffredo et al., 2013; Peeters et al., 2009; Pimanda et al., 2007) .

En tout état de cause, les CE hémogéniques partageraient les premiers stades du développement embryonnaire avec le reste des CE, c'est-à-dire, elles proviennent du mésoderme *Flk1*⁺ et requièrent l'expression du facteur de transcription ETV2 pour l'établissement de l'identité endothéliale, puisque, comme expliqué dans le chapitre précédent, les embryons de souris *Flk1*^{-/-} ou *Etv2*^{-/-} meurent en raison de l'absence de vaisseaux sanguins et de cellules hématopoïétiques (Lee et al., 2008; Shalaby et al., 1995). Cependant, le potentiel hématopoïétique exceptionnel de l'endothélium hémogénique suggère une divergence des autres CE dans leur différenciation, bien que le moment exact de cet événement reste inconnu. Les facteurs de transcription hématopoïétiques SCL et GATA2 sont activés par ETV2 (Kataoka et al., 2011) et sont également exprimés par les CE (Kappel et al., 2000). Les souris mutantes pour *Scl* (Porcher et al., 1996; Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995) ou pour *Gata2* (Tsai et al., 1994) meurent à E9,5 et E10,5, respectivement, en l'absence de cellules hématopoïétiques et avec des malformations vasculaires. Contrairement à GATA2, dont le rôle dans l'hématopoïèse définitive a été établi, comme nous le verrons dans la section suivante, le mode d'action du SCL n'a pas été complètement décrit mais il pourrait agir dans une fenêtre temporelle très courte pendant la spécification hématopoïétique et endothéliale du mésoderme (Drake and Fleming, 2000; Van Handel et al., 2012; Ismailoglu et al., 2008; Porcher et al., 1996). Il convient de mentionner que les souris *Scl*^{-/-}

ainsi que les CSEm portant la même mutation génèrent toutes deux des CE. Cela suggère que le SCL est nécessaire pour la spécification de l'endothélium hémogénique mais il n'est pas indispensable pour la différenciation endothéliale (Robertson et al., 2000; Visvader et al., 1998). De plus, l'élimination du SCL spécifiquement dans les CE *Tie2*⁺ chez les souris n'a pas affecté la production de CSH ayant un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme, bien que les souris meurent entre E13,5 et E14,5 à cause de défauts de différenciation des érythrocytes et de mégacaryocytes (Schlaeger et al., 2005).

Avec SCL, un autre facteur de transcription, HOXB4, a été également décrit dans la spécification de l'endothélium hémogénique peu après la formation du mésoderme. Les souris *HoxB4*^{-/-} ne présentent pas de défauts majeurs de l'hématopoïèse embryonnaire, à l'exception d'une prolifération légèrement réduite des CSH du foie et de la moelle osseuse (Brun et al., 2004). Cependant, d'autres facteurs de transcription HOX pourraient compenser l'absence de ce facteur. En effet, l'élimination simultanée d'HOXB3 et HOXB4 accentue le phénotype *HoxB4*^{-/-} (Björnsson et al., 2003). La différenciation des CSEm dont l'expression d'HOXB4 a été induite en présence du tamoxifène a permis d'établir l'action d'HOXB4 après la formation du mésoderme et avant le début de l'expression du facteur de transcription à domaine Runt 1 (RUNX1 de l'anglais « *runt-related transcription factor 1* »). De plus, l'expression ectopique d'HOXB4 augmente le nombre de CE hémogéniques *in vitro* et régule l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la transition endothéliale-hématopoïétique tels que RUNX1, SCL, GATA2 ou LMO2 (de l'anglais « *LIM domain only 2* ») (Teichweyde et al., 2017, 2018).

D'autre part, des études menées chez des souris dépourvues de l'enzyme rétinaldéhyde déshydrogénase 2 (*Raldh2*), qui synthétise l'acide rétinoïque (AR), suggèrent que l'AR est nécessaire pour la formation de l'endothélium hémogénique et postérieurement pour la TEH (Chanda et al., 2013; Goldie et al., 2008; Marcelo et al., 2013). Les souris *Raldh2*^{-/-} contiennent moins de CE hémogéniques dans le sac vitellin, avec une capacité hématopoïétique inférieure à celle des souris sauvages. Cependant, l'ajout d'AR exogène dans l'utérus permet de restaurer le phénotype sauvage chez les embryons mutants (Goldie et al., 2008). De plus, l'élimination conditionnelle de *Raldh2* dans les CE CD144⁺ inhibe la formation de CSH dans l'AGM (Chanda et al., 2013). Dans ce modèle, la culture *in vitro* des pré-CSH (CD144⁺CD45⁻) *Raldh2*^{-/-} avec des agonistes aux récepteurs RA α (RAR- α pour « *récepteurs de l'acide rétinoïque alpha* ») a restauré le potentiel de reconstitution hématopoïétique de ces cellules (Chanda et al., 2013).

La voie de signalisation Notch joue également un rôle important dans la spécification de l'endothélium hémogénique et serait sous le contrôle de l'AR (Marcelo et al., 2013). Dans le chapitre précédent, la spécification artérielle des CE par la voie Notch a été discutée. Des études comparatives

entre les CE homogéniques de l'AGM et les CE non homogéniques ont révélé un enrichissement du récepteur Notch1 et de ses effecteurs HES1 (de l'anglais « *hairy and enhancer of split-1* ») et HEY1 (de l'anglais « *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1* ») dans les CE homogéniques (Marcelo et al., 2013). Jang *et al.* ont démontré, à travers la différenciation des CSEm génétiquement modifiées, par l'expression du récepteur Notch1 lors de la présence de la doxycycline, que Notch est nécessaire pour la spécification de l'endothélium homogénique et pour la future TEH via l'activation du facteur de transcription FOXC2 (de l'anglais « *forkhead box protein C2* ») (Jang et al., 2015). Dans une autre étude, les CSEm *Notch1*^{-/-} ont été injectées dans le blastocyste de souris WT (souris contrôle, l'anglais « *wild type* »), les cellules *Notch1*^{-/-} et WT ont été récupérées du sac vitellin, du foie et de la moelle osseuse des embryons entre E9,5 et E15,5. *In vitro*, la culture de ces cellules n'a rapporté aucune différence significative sur l'hématopoïèse entre les cellules *Notch1*^{-/-} et WT provenant du sac vitellin avant E11,5. Toutefois, à partir d'E11,5, les cellules *Notch1*^{-/-} ont montré un potentiel hématopoïétique beaucoup plus réduit par rapport aux cellules WT, ce qui suggère que la voie Notch n'est nécessaire que pour le développement d'une hématopoïèse définitive et n'est pas indispensable pour l'hématopoïèse primitive (Hadland et al., 2004). Il est intéressant de noter que l'AR et la voie Notch semblent toutes les deux réguler l'expression de c-KIT, un marqueur de l'endothélium homogénique et récepteur du SCF et de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 (Marcelo et al., 2013). L'implication de ces derniers dans la spécification de l'hématopoïèse suggère que les CE arrêtent leur cycle cellulaire avant la spécification hématopoïétique. Enfin, des études sur des embryons de souris, *in vivo*, et sur des CSEm, *in vitro*, ont permis d'identifier le rôle du facteur SOX17 dans la spécification de l'endothélium hématopoïétique (Clarke et al., 2013; Kim et al., 2007). Notamment, SOX17 régule l'expression de Notch1 dans les CE progénitrices des cellules hématopoïétiques (Clarke et al., 2013; Kim et al., 2007). Fait remarquable, étant donné le rôle de Notch1 et de SOX17 dans la spécification du phénotype artériel des CE (Corada et al., 2013, 2014) et du fait que l'hématopoïèse définitive a été décrite principalement dans les artères (De Bruijn et al., 2000; Li et al., 2012; Rhodes et al., 2008). Ainsi, la spécification artérielle peut être nécessaire à la formation de l'endothélium homogénique (Uenishi et al., 2018).

3.4.2.2. Transition endothélial-hématopoïétique (TEH)

Au cours de l'hématopoïèse définitive, les CE homogéniques bourgeonnent de l'endothélium vers la lumière des vaisseaux sanguins, perdant le phénotype endothélial au bénéfice du phénotype hématopoïétique (Swiers et al., 2013, Figure 18). Bien qu'il soit difficile de distinguer les phénomènes qui font partie de la spécification de l'endothélium homogénique et les événements qui participent directement à la TEH, ce mécanisme a été mieux étudié grâce à la localisation spatio-temporelle précise de l'endothélium homogénique dans l'aorte et à la connaissance des marqueurs de ces cellules

et des cellules hématopoïétiques. Chez la souris, autour de E9,5, juste avant la TEH, le facteur de transcription HOXA3 n'est plus exprimé par les CE de l'AGM (Iacovino *et al.*, 2011). Des expériences menées avec des CSEm transgéniques où l'expression du gène *HoxA3* est induite par la doxycycline, ont permis de déterminer que HOXA3 inhibe la TEH en diminuant l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques RUNX1, GATA1, IKAROS, entre autres (Iacovino *et al.*, 2011). HOXA3 régule également l'expression de SOX17. La perte de fonction de SOX17 dans les CE à E9,5, *in vivo* chez la souris, entraîne une augmentation des facteurs de transcription RUNX1 et GATA2 (Lizama *et al.*, 2015). *In vitro*, les CE de l'AGM, dont le gène *Sox17* a été réprimé juste avant l'apparition de la TEH, génèrent plus de progéniteurs hématopoïétiques que les cellules hétérozygotes qui expriment une seule copie de *Sox17* (Lizama *et al.*, 2015). En revanche, la surexpression de SOX17 dans les explants de l'AGM WT, inhibe l'expression de RUNX1 et GATA2 et, par conséquent, la TEH (Lizama *et al.*, 2015). Tel qu'il a été décrit précédemment, SOX17 régule aussi l'expression de Notch1. En effet, la surexpression de ce récepteur dans des explants de l'AGM dont SOX17 a été réprimé, a permis de récupérer le phénotype WT (niveaux normaux de la TEH). Néanmoins, d'autres études suggèrent que la voie Notch est nécessaire pour l'expression du gène hématopoïétique *Gata2* dans l'AGM par l'intermédiaire de la protéine RBPJ (de l'anglais « *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region* ») (Robert-Moreno *et al.*, 2005).

En effet, le rôle de la voie Notch dans la TEH est complexe et dépend de la dose du signal ainsi que du ligand qui l'active. Les expériences *in vivo* réalisées par Gama-Norton *et al.*, avec des souris transgéniques capables de produire des signaux élevés et faibles de Notch, ont déterminé que la TEH nécessite de faibles niveaux de Notch, alors que des niveaux élevés de cette voie de signalisation maintiennent le phénotype artériel des CE (Gama-Norton *et al.*, 2015). Dans cette régulation de signalisation, deux ligands de Notch ont été identifiés. Bien que DLL4 et Jagged 1 (Jag-1) soient tous deux exprimés par l'endothélium de l'aorte dorsale, l'activation de Notch par Jag-1 est plus faible que celle de DLL4. De plus, ces deux ligands sont en concurrence pour le même récepteur Notch sur les CE et par conséquent, mutuellement exclusifs. Ainsi, c'est Jag-1 et non DLL4 qui est nécessaire pour la TEH, parce que d'une part, il empêche l'activation des gènes artériels par DLL4 et d'autre part, il active les gènes hématopoïétiques *c-KIT*, *CD41*, *Runx1* et *Gata2* (Gama-Norton *et al.*, 2015).

La répression du programme endothélial se produit en même temps que le programme hématopoïétique commence, lorsque les CE font encore partie de la tunique intime de l'aorte dorsale. L'inactivation d'*HoxA3*, de *Sox17* ou l'activation de Notch par Jag-1 induit l'expression de deux facteurs de transcription cruciaux pour l'hématopoïèse : GATA-2 et RUNX1. GATA2 est un facteur de transcription à doigt de zinc qui se lie aux motifs GATA de l'ADN. Les souris *Gata2*^{-/-} meurent à E10,5 en l'absence de cellules hématopoïétiques ou de CSH définitives (Tsai *et al.*, 1994). L'élimination de ce

facteur de transcription spécifiquement dans les CE CD144⁺ avant l'apparition de la TEH et dans les cellules hématopoïétiques a confirmé que GATA2 est nécessaire pour la TEH et pour le maintien des CSH (de Pater et al., 2013). GATA2 est détecté chez la souris à E7,5-E8 dans le mésoderme latéral extra-embryonnaire et le sac vitellin, et à E9,0 dans le P-Sp, l'AGM et les CSH naissants (Minegishi et al., 1999, 2003). Comme mentionné ci-dessus, la voie Notch dans l'endothélium hémogénique active l'expression de GATA2 par la RBPJ (Robert-Moreno et al., 2005). Toutefois, l'effecteur de Notch, Hes, réprime l'expression de GATA2 (Guiu et al., 2013). Ce phénomène connu en anglais sous le nom de « *incoherent feed-forward loops* » permet, probablement de contrôler la dose appropriée de ce facteur de transcription puisque des niveaux élevés de GATA2 génèrent des progéniteurs hématopoïétiques non fonctionnels (Guiu et al., 2013; Persons et al., 1999).

GATA2 participe à son tour à l'activation de RUNX1 en formant un complexe de transcription avec les facteurs de transcription FLI-1 (de l'anglais « *Friend leukemia integration 1* ») et SCL (Nottingham et al., 2007). De même, GATA2 établit un complexe de transcription avec RUNX1, FLI-1, SCL et LMO2 qui permet l'activation des gènes hématopoïétiques impliqués dans la formation des CSH. RUNX1 (également connu sous le nom de protéine 1 de la leucémie myéloïde aiguë, AML1) appartient à la famille des facteurs de transcription de liaison au noyau (CBF de l'anglais « *binding core factor* ») et forme un hétérodimère avec le CBF- β (Wang et al., 1996). Les souris *Runx1*^{-/-} meurent à E12,5 en l'absence d'hématopoïèse définitive mais l'hématopoïèse primitive n'est pas affectée (Okuda et al., 1996). Cependant, RUNX1 est nécessaire pour le développement des EMPs dans le sac vitellin (Chen et al., 2009, 2011b). Les CSEm *Runx1*^{-/-} sont aussi incapables de générer des EMPs et des cellules hématopoïétiques définitives (Okuda et al., 1996). Au cours du développement embryonnaire chez la souris, RUNX1 est exprimé dans le sac vitellin de E7,5 à E11,5, étant essentiel jusqu'à E10,5 pour la génération du EMPs et entre E10,5 et E11,5 pour les CSH. Puisque dans ces études, RUNX1 a été spécifiquement éliminé dans les CE CD144⁺, ces résultats montrent que les EMP ont leur origine dans un endothélium hémogénique (Tober et al., 2013). Dans l'endothélium de l'AGM et des artères vitellines et ombilicales, RUNX1 est exprimé aussi d'E10,5 à E11,5 où il est strictement nécessaire pour la production des progéniteurs hématopoïétiques et des CSH. Ainsi, RUNX1 est considéré comme le marqueur définitif de l'endothélium hémogénique et des pré-HSC (Tober et al., 2013). Chez la souris comme chez l'homme, la transcription du gène *Runx1* est principalement contrôlée par deux promoteurs, P1 (distal) et P2 (proximal), qui donnent lieu à trois isoformes de ce facteur de transcription : les isoformes a et b sont transcrites grâce à l'activation du promoteur P2, tandis que l'isoforme c dépend du promoteur 1 (Fujita et al., 2001; Ghazi et al., 1996; Miyoshi et al., 1995). Bien que le rôle spécifique de ces isoformes dans l'hématopoïèse reste peu étudié, l'expression de RUNX1b dans l'endothélium hémogénique a été décrite dans une période de temps plus large, étant

indispensable pour la TEH chez la souris (Challen and Goodell, 2010; Sroczynska et al., 2009). En revanche, RUNX1c n'est exprimé que dans les CSH peu après la TEH (Challen and Goodell, 2010; Sroczynska et al., 2009). Chez les adultes, bien que RUNX1 soit exprimé en faible quantité dans la moelle osseuse, principalement dans les CSH, les niveaux de RUNX1c sont beaucoup plus élevés dans ces cellules que RUNX1b (Challen and Goodell, 2010). En accord avec le rôle de RUNX1b dans la TEH, l'analyse transcriptomique des différentes populations au cours de la différenciation hématopoïétique des CSEm, a révélé que ce facteur de transcription active les gènes associés à l'adhésion cellulaire (e.g. les gènes des intégrines ITGA3, ITGB3 et ITGB5, IT pour *intégrine alpha et beta*), la migration cellulaire (e.g. EPHB2 de l'anglais « *ephrin type-B receptor 2* ») et l'interaction avec l'ECM (e.g. les métalloprotéases ADAMTS12, ADAMTS4 et ADAMTS7, de l'anglais « *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ») seul ou en association avec d'autres facteurs de transcription hématopoïétiques tels que GATA-2 ou SCL (Lie-A-Ling et al., 2014). Enfin, comme pour la voie Notch, les niveaux de RUNX1 pourraient être cruciaux pour une TEH efficace. Récemment, grâce à la différenciation des CSEm, Lie-A-Ling et al. ont démontré que les faibles niveaux de RUNX1b au début de la TEH facilitent l'acquisition progressive du phénotype pré-HSC et leur maturation. De fortes doses de ce facteur, à ce stade précoce, entraînent une hématopoïèse défectueuse. Contrairement, à des étapes plus tardives de la TEH, des niveaux plus élevés et le début de l'expression de RUNX1c pourraient permettre la maturation du phénotype hématopoïétique (Lie-A-Ling et al., 2014).

Finalement, avec GATA2 et RUNX1, le facteur de transcription SCL participe au contrôle du programme hématopoïétique pendant la TEH. En effet, SCL et GATA2 forment un complexe transcriptionnel, grâce à l'interaction avec la protéine LMO2, qui participe à la régulation des gènes hématopoïétiques. Cependant, l'action du SCL semble pas nécessaire pendant la TEH, puisque l'inactivation du gène *Scl* dans les CE *Tie2*⁺ n'affecte pas le développement des CSH (Schlaeger et al., 2005). HOXB4 pourrait être nécessaire pour la TEH puisqu'il est exprimé par les cellules CD144⁺CD45⁻ et CD144⁺CD45⁺ de l'AGM à travers la régulation de RUNX1, GATA2 et SCL (Hills et al., 2011; Teichweyde et al., 2018). Récemment, des études chez la souris et le poisson-zèbre ont suggéré qu'un environnement hypoxique (signalé par le facteur de transcription inductible par l'hypoxie, HIF- α (de l'anglais « *hypoxia inducible factors* ») et pro-inflammatoire (médié, par exemple, par le TNF- α ou l'interféron γ) pourraient induire la TEH et activer le programme hématopoïétique (Espín-Palazón et al., 2014; Imanirad et al., 2014; Sawamiphak et al., 2014).

3.4.2.3. Colonisation du foie et expansion des CSH

Différentes études avec des embryons de souris suggèrent que l'aorte dorsale ne génère pas plus de 3 CSH (Gekas et al., 2005; Kumaravelu et al., 2002; Müller et al., 1994). Cependant, les souris et les humains adultes disposent d'un stock suffisant de CSH pour assurer l'hématopoïèse tout au long de

leur vie. Cela suggère qu'à un certain moment du développement embryonnaire, une amplification des CSH doit se produire. En fait, cette amplification a été mise en évidence chez les embryons de souris, principalement dans le foie (≈ 1626 CSHs à E16) (Ema and Nakauchi, 2000) et dans une moindre mesure, dans le placenta (≈ 50 CSH à E12.5) (Gekas et al., 2005). La colonisation du foie par les progéniteurs hématopoïétiques commence autour d'E10 et s'étend même jusqu'à 3 jours après la naissance, bien que le pic des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques soit observé autour de E12-E13 (Figure 18). Les cellules hématopoïétiques exprimant le récepteur CXCR4 et c-KIT migrent vers le foie en réponse aux ligands CXCL12 et SCF, respectivement (Christensen et al., 2004). Une fois dans le foie, les progéniteurs hématopoïétiques interagissent avec la niche et avec l'ECM au travers des intégrines (*e.g.* VLA4 et intégrine $\alpha 4\beta 7$) et de molécules d'adhésion (*e.g.* CD144), favorisant l'hébergement et l'amplification ultérieure des CSH (Kim et al., 2016a; Potocnik et al., 2000). Bien que l'AGM donne naissance à certaines CSH, la plupart des cellules qui atteignent le foie sont des pré-CSH CD144⁺CD45⁺. En effet, entre E11,5 et E13,5, le foie est l'organe qui contient la plus grande quantité des pré-CSH chez l'embryon de souris (Kim et al., 2005; Taoudi et al., 2005). La niche des CSH dans le foie est composée de CE sinusoidales (LSEC de l'anglais « *liver sinusoidal endothelial cells* »), de cellules stromales et des hépatoblastes. Les cellules stromales sécrètent des facteurs tels que l'IGF, le SCF, l'ang-3, le ligands WNT et l'EPHB2 (Charbord and Moore, 2005) tandis que les cellules stellaires hépatiques expriment l'oncostatine M, le M-CSF, la TPO, le FLT3-L, l'EPO, l'IGF, le SCF et le CXCL12, ainsi que des protéines de l'ECM impliquées dans l'hébergement des CSH, telles que la fibronectine, la vitronectine ou la laminine (Kubota et al., 2007; Tan et al., 2013). Les CE du foie, en particulier les LSEC périportales, peuvent interagir avec les pré-CSH par l'intermédiaire de la VE-cadhérine, des sélectines ou des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 favorisant l'entrée de ces cellules dans le foie (Schweitzer et al., 1996). De plus, la coculture *in vitro* de LSEC avec des progéniteurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse de souris suggèrent que les LSEC participent au maintien des CSH et à leur différenciation (Cardier and Barberá-Guillem, 1997; Wittig et al., 2010). Enfin, les hépatoblastes, progéniteurs des hépatocytes et des cholangiocytes, expriment l'E-sélectine et, de manière transitoire lors de la colonisation des progéniteurs hématopoïétiques, l'ICAM-1 (Sugiyama et al., 2010), en plus des cytokines EPO, TPO, IL-6, SCF, FLT-3L et des protéines 2 et 3 liées

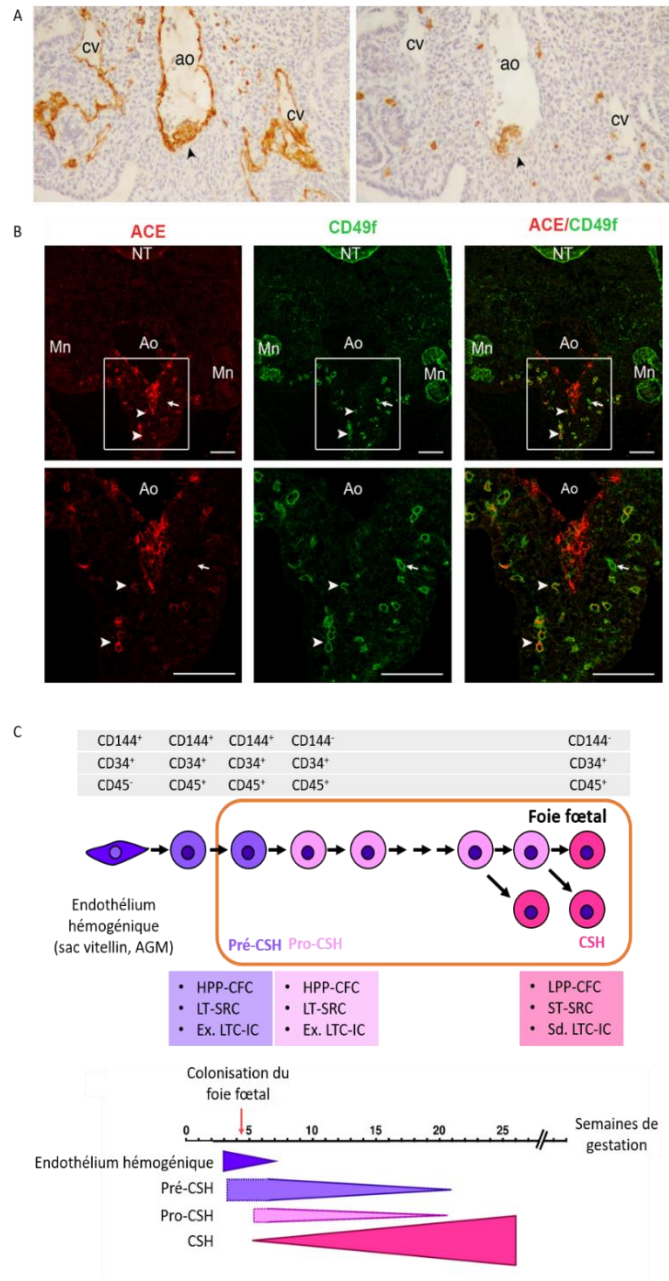


Figure 19. Développement hématopoïétique chez l'homme. **A.** Sections transversales d'un embryon humain de 32 jours de gestation marqués avec les anticorps anti-CD34 et anti-CD45. Les flèches indiquent la présence de clusters hématopoïétiques adhérents au côté ventral de l'aorte dorsale (ao). Aucun cluster n'a été observé à l'intérieur des veines cardinales (cv). *Images de Tavian et Péault 2005.* **B.** Sections transversales de l'AGM d'un embryon humain de 34 jours de gestation marquées avec des anticorps contre l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, rouge) et de l'intégrine $\alpha 6$ (CD49f, vert). Les images à plus fort grossissement (bas) montrent l'expression de la protéine ACE par les CSH à l'intérieur de l'aorte (Ao), par les CE et les cellules mésodermiques. En revanche, le CD49f est exprimé dans certaines cellules mésodermiques, dont certaines coexpriment l'ACE (flèche). Mn : mésonéphros. NT : tube neural. Echelle 10 μ m dans les images du panel du haut et de 100 μ m panel du bas. *Images de Julien et al. 2016.* **C.** Dans l'AGM, l'endothélium homogénéique donne lieu à des cellules CD144⁺CD34⁺CD45⁻ (ou pré-CSH) qui colonisent le foie. Les pré-CSH et leurs descendances CD144⁺CD34⁺CD45⁺ (pro-CSH) possèdent un potentiel majeur de prolifération *in vitro* et de reconstitution *in vivo* par rapport aux CSH matures qui vont migrer vers la moelle osseuse. HPP-CFC: high-proliferative potential colony-forming cells; LPP-CFC: low-proliferative potential CFC; ST-SRC: short-term SCID repopulating cells; LT-SRC: Long-term SCID repopulating cells; Ex. Ou Sd. LTC-IC: extended ou standard long term culture-initiating cell. Traduit et adapté de Oberlin et al.2010.

à l'angiopoïétine (angptl2 et angptl3, respectivement) (Sugiyama et al., 2011). En effet, les souris *Map2k24*^{-/-}, qui ne génèrent pas d'hépatoblastes, présentent des défauts d'hématopoïèse et un nombre réduit de CSH (Sugiyama et al., 2011).

Tableau 11. Molécules exprimées par les CSH du foie fœtal, de la moelle osseuse fœtale et adulte, qui participent à leur migration. Traduit de Ciriza et al. 2013.

Type de molécule	Molécules	Tissu		
		Foie fœtal	Moelle osseuse fœtale	Moelle osseuse adulte
Molécules avec activité chimiotactique	Chimiokines et cytokines	CXCR4	CXCR4	CXCR4
		c-KIT	c-KIT	c-KIT
		-	-	CCR3
		-	-	CCR9
		-	CCL4	CCL4
		-	CCL9	CCL9
	-	IL18	IL18	
Récepteurs couplés aux protéines G	-	CASR	CASR	
Molécules d'adhésion	Molécules de guidage	-	ROBO4	ROBO4
	Cadhérines	CD144	CD144	-
		-	Cadhérine 2	Cadhérine 2
	Intégrines	VLA4	VLA4	VLA4
		VLA5	VLA5	VLA5
		LFA-1	LFA-1	LFA-1
	Sélectines	PSGL1	PSGL1	PSGL1
-		SELL	SELL	
Molécules qui modulent l'ECM	Protéines de l'ECM	-	COL4A1	COL4A1
		-	MMP2	MMP2
		-	-	MMP9
		-	TIMP2	TIMP2
		-	TGFBI	TGFBI
		-	ENTPD1	ENTPD1

Finalement, en plus de l'expansion des CSH, diverses études suggèrent que ces cellules peuvent modifier leur profil d'intégrines favorisant leur mobilisation ultérieure vers la rate, où elles se différencieront, ou vers la moelle osseuse pour établir le réservoir définitif de CSH (Ciriza et al., 2013; Mahony and Bertrand, 2019; Roy and Verfaillie, 1999, Tableau 11)

3.4.3. L'hématopoïèse chez l'homme

Comme chez la souris, une première vague d'hématopoïèse a été décrite dans le sac vitellin des embryons humains vers le 16ème jour de gestation. Les îlots sanguins donnent naissance à des érythrocytes, des macrophages et des mégacaryocytes primitifs qui sont détectés chez l'embryon jusqu'à la 6ème et 7ème semaine de gestation (Bloom and Bartelmez, 1940b; Migliaccio et al.; Tavian et al., 2001). Entre la 4ème et la 5ème semaine de gestation, des progéniteurs hématopoïétiques multipotents sont observés dans le sac vitellin, bien que leur origine intra- ou extra-embryonnaire n'ait pas été confirmé, puisque la circulation sanguine commence vers le 21ème jour de gestation (Huyhn et al., 1995; Migliaccio et al.). Ensuite, les premiers progéniteurs lymphoïdes sont détectés chez l'homme dès le 19ème jour de gestation à l'intérieur de l'embryon (Tavian et al., 2001) et la vague définitive d'hématopoïèse à partir du 28ème jour de gestation à l'AGM (Oberlin et al., 2002; Tavian et al., 1999).

Des amas de cellules hématopoïétiques CD34⁺CD45⁺ sont situés sur la face ventrale de l'aorte dorsale et de l'artère vitelline (Oberlin et al., 2002; Tavian et al., 1996, 1999). Tel que chez la souris, chez l'homme les pré-HSC de l'AGM expriment le marqueur endothélial CD144 ainsi que les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45. De plus, ces cellules sont négatives pour l'ADP-ribose cyclique hydrolase (CD38) et n'expriment pas les marqueurs des lignées hématopoïétiques matures (Lin⁻) (Labastie et al., 1998; Tavian et al., 1999). Oberlin *et al.* ont démontré que les CE CD34⁺CD45⁻ provenant de l'AGM humaine entre les jours 28 et 40 de gestation sont capables de produire des cellules hématopoïétiques *in vitro* lorsqu'elles sont cultivées avec les cellules stromales MS-5 (Oberlin et al., 2002). En revanche, les CE CD34⁺CD45⁻ provenant de tissus non hématopoïétiques, tels que les poumons, le pancréas ou le cordon ombilical (HUVEC), n'ont pas généré de cellules hématopoïétiques, ce qui démontre que cette capacité réside dans l'endothélium hémogénique de l'AGM (Oberlin et al., 2002). D'autres études menées sur des embryons humains et des CSH humaines adultes ont identifié un nouveau marqueur des CSH *bona fide* également exprimé par les pré-HSC, l'ACE ou CD143 (Jokubaitis et al., 2008; Sinka et al., 2012). L'utilisation de ce marqueur sur des cellules de la P-Sp cultivées *in vitro* suggère que les P-Sp CD34⁺CD45⁻ACE⁺ pourraient être des progéniteurs de l'endothélium hémogénique CD34⁺CD45⁻ACE⁺ (Sinka et al., 2012). En plus de l'expression d'ACE, la population P-Sp présente également un autre marqueur des CSH adultes, le CD49f (Notta et al., 2011), suggérant un phénotype ACE⁺CD34⁺CD45⁻CD49f⁺VEGFR2⁺ pour les progéniteurs de l'endothélium hémogénique présents dans la P-Sp humaine (Julien et al., 2016, Figure 19). Enfin, l'analyse transcriptomique de l'endothélium de l'AGM a confirmé l'expression des facteurs impliqués dans la TEH, RUNX1, SCL, GATA2 et SOX17, tel qu'il est décrit également chez la souris (Bos et al., 2015; Labastie et al., 1998).

De plus, la colonisation du foie par les progéniteurs hématopoïétiques et l'expansion des pré-CSH et des CSH pour établir le contingent des CSH dans la moelle osseuse sont des événements mis en évidence également chez l'homme (Popescu et al., 2019). Les premiers progéniteurs érythro-myéloïdes CD45⁺ peuvent être identifiés à partir du 23^{ème} jour de gestation dans le foie humain, ce n'est qu'à partir du 30^{ème} jour que l'on observe des cellules CD34⁺CD45⁺ dans cet organe (Tavian et al., 1999). En plus de cette population, les pré-CSH CD144⁺CD45⁻ sont détectées au même temps dans le foie du fœtus et diminuent jusqu'à disparaître vers la 23^{ème} semaine de gestation (Oberlin et al., 2010b, Figure 19). Contrairement aux CSH, cette population de pré-CSH, qui expriment aussi la prominine-1 (CD133), le CD90, le CD43 et le CD41, possède une capacité plus importante de prolifération et d'auto-renouvellement ainsi qu'un potentiel plus grand de reconstitution hématopoïétique. Toutefois, cette population est transitoire et limitée au stade d'expansion hématopoïétique dans le foie fœtal (Oberlin et al., 2010b).

3.4.3.1. L'hématopoïèse in vitro à partir de CSPH

Contrairement aux modèles animaux utilisés pour étudier le développement embryonnaire, l'accès aux embryons humains dans les premiers stades du développement est difficile pour des raisons éthiques et techniques. Ainsi, dans l'étude de l'hématopoïèse humaine, la différenciation des CSPH, CSEh et CSPih, a permis de compléter les informations provenant des embryons humains et de contraster les événements embryonnaires observés chez d'autres embryons animaux. La différenciation hématopoïétique spontanée des CSH récapitule les différentes vagues de l'hématopoïèse observées chez les embryons humains et murins (Figure 20). En absence de facteurs de croissance, les EB issus de CSEh génèrent des progéniteurs érythro-myéloïdes entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour de différenciation et leurs descendances présentent des caractéristiques propres aux cellules primitives (macrophages et érythroblastes primitifs) (Zambidis et al., 2005). Notamment, les érythrocytes issus de ces progéniteurs expriment des hémoglobines embryonnaires ($\epsilon_2\zeta_2$) et fœtales (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) mais pas des hémoglobines adultes (HbA, $\alpha_2\beta_2$). Dès le jour 12, les EB génèrent des CFU-GEMM, CFU-GM et BFU-E. Ces dernières expriment, en plus des hémoglobines embryonnaires et fœtales, des hémoglobines adultes. La présence de monocytes suggère également que les progéniteurs présents dans les EB à partir du jour 12 de différenciation donnent lieu à des lignées définitives. (Zambidis et al., 2005). Kennedy *et al.* ont démontré que les CSPH pouvaient se différencier en lignages lymphoïdes (lymphocytes T) à partir d'une population aux caractéristiques propres de l'endothélium hémogénique. Ce lignage apparaît quelques jours après les progéniteurs primitifs. Dans cette étude, des cocktails de cytokines ont été employés pour guider la différenciation hématopoïétique dans les EB tels que le TPO, FLT3-L, SCF, IL-3, IL-6, IGF-1, BMP-4 ou VEGF (Kennedy et al., 2012).

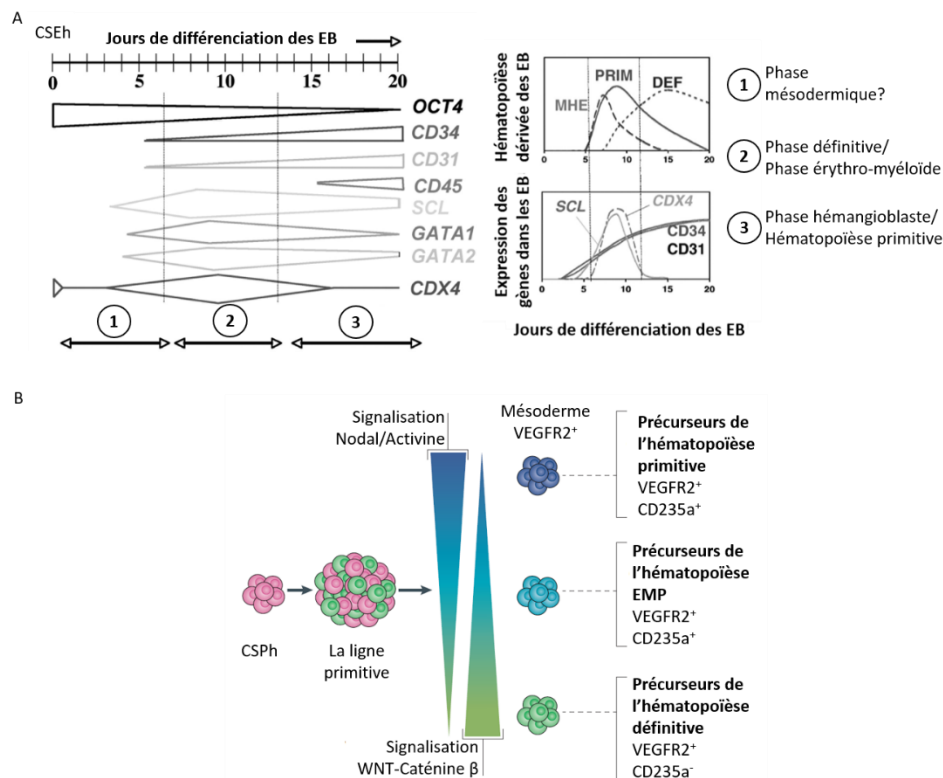


Figure 20. Différenciation hématopoïétique des CSPh. **A.** La différenciation hématopoïétique des CSPh récapitule *in vitro* les vagues de l'hématopoïèse, décrite chez les embryons humains et murins, *via* la différenciation spontanée des corps embryoides (EB). Traduit et adapté de Zambidis et al. 2005. **B.** Ces vagues hématopoïétiques ont différents besoins des voies de signalisation Nodal/Activine et WNT-caténine β et peuvent être identifiées par l'expression du CD235a chez les précurseurs primitifs et par l'absence de ce marqueur chez les précurseurs définitifs. Traduit et adapté de Ditadi et al. 2017.

La différenciation hématopoïétique des CSPh a permis d'étudier en profondeur les différences entre la vague primitive et définitive de l'hématopoïèse et d'identifier la séquence des événements qui conduisent au développement de ce lignage. Deux méthodes principales de différenciation des CSPh ont été utilisées pour étudier l'hématopoïèse embryonnaire : la formation des EB et la différenciation sur des cellules stromales tel que la lignée OP9. Grâce à ces méthodes, il a été possible de déterminer que la divergence de ces deux types d'hématopoïèse semble se produire lors de la spécification du mésoderme. En effet, la présence de BMP-4, de VEGF et de fortes doses d'activine ainsi que de faibles doses de WNT favorisent la différenciation d'une population mésodermique doublement positive pour le récepteur de l'apeline (APLNR) et pour le PDGFR α (Kennedy et al., 2012, Figure 20 et Figure 21). La population mésodermique $APLNR^+PDGFR\alpha^+$ génère des progéniteurs hématopoïétiques primitifs par un intermédiaire endothélial (Lancrin et al., 2009a; Rafii et al., 2013). Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression du VEGFR2, de l'ACE et de la glycopherine A (CD235a) (Choi et al., 2012; Sturgeon et al., 2014; Zambidis et al., 2008, Figure 21). D'autre part, de faibles doses d'activine

additionnées à de fortes doses de WNT, favorisent la différenciation des CSPh vers l'hématopoïèse définitive (Gertow et al., 2013; Kennedy et al., 2012; Ng et al., 2016; Sturgeon et al., 2014). Dans ce cas, c'est le mésoderme $APLNR^+PDGFR\alpha^-$ qui est à l'origine d'un endothélium hémogénique caractérisé par l'expression du CD144 et du c-KIT et par l'absence du CD235a, de l'ecto-5'-nucléotidase (CD73), du CD43 et du CD45 (Choi et al., 2012; Uenishi et al., 2018). Le mésoderme $APLNR^+PDGFR\alpha^-$ génère également deux autres types d'endothélium : la population $CD144^+CD235a^+CD43^{low}$, progénitrice des lignages érythro-myéloïdes et l'endothélium non hémogénique $CD144^+CD73^+CD235a^-$ (Choi et al., 2012). L'expression ou l'absence de CD73 permet de distinguer l'endothélium hémogénique ($CD73^-$) du non hémogénique ($CD73^+$) (Choi et al., 2012, Figure 21).

La participation de la voie WNT dans l'hématopoïèse définitive à partir des CSPh est, cependant, contraire à celle observée dans les embryons murins où la voie WNT est nécessairement exclusive à l'hématopoïèse primitive (Frame et al., 2016; Nostro et al., 2008, Figure 20). Cette observation peut refléter les différences dans le développement hématopoïétique entre les espèces de mammifères ou être produite par les conditions de la différenciation *in vitro*. Toutefois, d'autres voies de signalisation décrites chez la souris jouent un rôle similaire dans la différenciation hématopoïétique des CSPh. Notamment, l'AR endogène (dans les EB) et exogène participe à la différenciation hémato-vasculaire du mésoderme et à la spécification ultérieure des progéniteurs hématopoïétiques (Yu et al., 2010). La voie Notch a été aussi décrite dans la spécification de l'endothélium hémogénique à partir des CSPh et dans la TEH (Ayllón et al., 2015; Uenishi et al., 2018). Ces études ont aussi permis l'identification d'un progéniteur $CD144^+Notch1^+CD73^-CD43^-DLL4^-$ qui, lorsque la voie Notch est activée par son ligand DLL4, génère l'endothélium hémogénique $CD144^+Notch1^{High}CD73^-CD43^-DLL4^+$ (Ayllón et al., 2015; Uenishi et al., 2018). Les facteurs de transcription SCL (Real et al., 2012), GATA2 (Castaño et al., 2019; Kang et al., 2018), RUNX1 (Choi et al., 2012; Kennedy et al., 2012; Ng et al., 2016), SOX17 (Nakajima-Takagi et al., 2013) ou HOXB4 (Jackson et al., 2016; Wang et al., 2005) ont été également identifiés au cours de la différenciation hématopoïétique des CSPh avec des fonctions équivalentes à celles décrites dans les embryons de souris et les CSPm. Quant aux isoformes de RUNX1, certaines équipes rapportent l'expression des isoformes a et b, sans distinction, dans les précurseurs endothéliaux de l'hématopoïèse primitive et définitive, tandis que l'isoforme c serait restreinte aux progéniteurs hématopoïétiques $CD45^+$ comme chez la souris (Ditadi et al., 2015; Ng et al., 2016). Cependant, une équipe américaine a démontré que la surexpression de RUNX1a pendant la différenciation de la CSPh augmente le nombre de progéniteurs hématopoïétiques définitifs $CD31^+CD34^+CD45^-$ et permet la production de cellules $CD34^+CD45^+$ ayant un potentiel de reconstitution hématopoïétique chez les souris immunodéprimées (Ran et al., 2013).

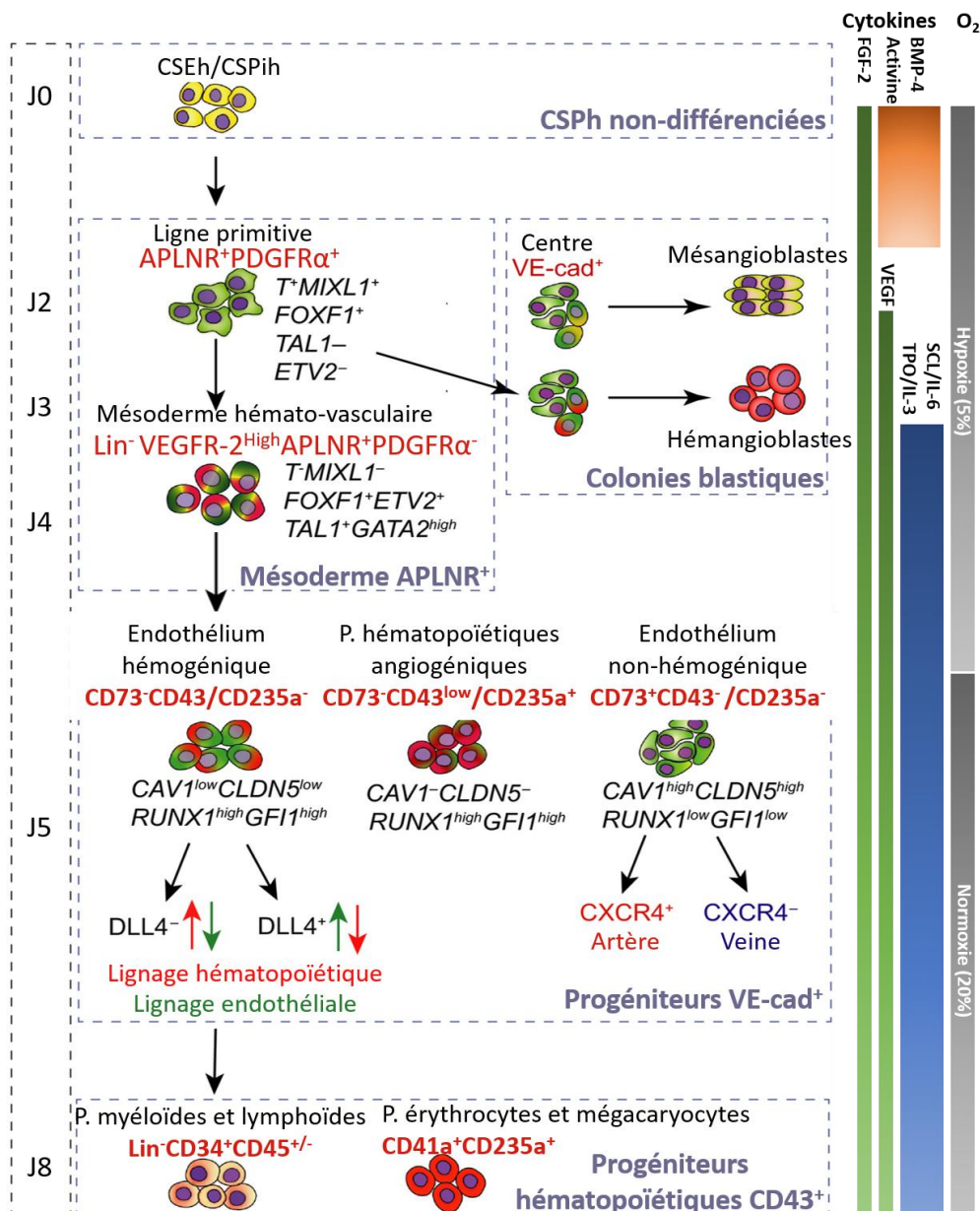


Figure 21. Populations décrites au cours de la différenciation hématopoïétique des CSPh. Hiérarchie des précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux décrits au cours de la différenciation des CSP vers ces lignages. L'expression de CD73 et CD235 permet d'identifier l'endothélium homogénique vs l'endothélium vasculaire et les précurseurs hématopoïétiques primitifs vs les précurseurs définitifs. A droite, les cytokines les plus utilisées pour la différenciation hémato-endothéliale sont indiquées, ainsi que la concentration d'oxygène qui favorise les différentes étapes de la différenciation. Traduit et adapté de Uenishi et al. 2014.

Également pour l'isoforme c, les études de Navarro-Montero *et al.* suggèrent que cette isoforme est produite par l'endothélium homogénique (Navarro-Montero et al., 2017). Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle des isoformes RUNX1 dans l'hématopoïèse humaine.

Enfin, l'utilisation de lignées de CSPh génétiquement modifiées avec des protéines rapporteuses liées aux facteurs de transcription hématopoïétiques, a permis l'isolement de plusieurs populations

intermédiaires pendant la spécification de l'endothélium homogénique. Leurs analyses au niveau transcriptomique se sont révélées utiles pour améliorer la compréhension du mécanisme de spécification de cette population endothéliale en révélant, par exemple, l'importance des facteurs de transcription HOXA (Ng et al., 2016) ou des signaux pro-inflammatoires dans l'hématopoïèse humaine définitive (Navarro-Montero et al., 2017).

3.4.4. L'hémangioblaste

Des études menées sur des embryons de poulet par Sabin en 1920 ont révélé l'étroite relation spatiale et temporelle entre les CE et hématopoïétiques au cours de leur développement embryonnaire, postulant la théorie d'un progéniteur commun aux deux lignages, l'angioblaste (Sabin, 1920). Quelques années plus tard, Murray a suggéré le terme d'hémangioblaste pour décrire un progéniteur bipotent présent dans le sac vitellin des poulets qui générerait des CE et hématopoïétiques (Murray, 1932). Les malformations du système vasculaire et l'absence de cellules hématopoïétiques chez les souris KO pour *Flk1* (Shalaby et al., 1995), *Etv2* (Lee et al., 2008), *Scf* (Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995) ou *Gata2* (Tsai et al., 1994), en plus de l'identification des îlots sanguins dans le sac vitellin chez ces rongeurs (Haar and Ackerman, 1971) ont renforcé l'hypothèse de l'existence également d'hémangioblastes chez les mammifères. A la fin du XXème siècle, avec l'isolement des CSEm et les premiers protocoles de différenciation hématopoïétique, il a été possible de générer et d'isoler *in vitro* pour la première fois un tel progéniteur bipotent (Choi et al., 1998; Doetschman et al., 1985; Kennedy et al., 1997). Grâce à la caractérisation de ces hémangioblastes issus des CSEm, Huber et al. ont réussi à isoler du sac vitellin d'embryons de souris des cellules qui, *ex vivo*, étaient capables de générer, à la fois, les lignées endothéliales et hématopoïétiques (Huber et al., 2004). Chez l'homme, la différenciation des CSEh a également abouti à la caractérisation *in vitro* de progéniteurs bipotents de type hémangioblaste caractérisés par l'expression du VEGFR-2, de l'ACE et du CD34 (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007; Wang et al., 2004; Zambidis et al., 2009). Néanmoins, l'hémangioblaste murin et humain dérivé des CSP a été principalement lié à l'hématopoïèse primitive et à la formation de EMPs (Kennedy et al., 1997, 2007) à l'exception d'une étude qui démontre leur potentiel lymphoïde lors de la coculture avec une lignée stromale (Zambidis et al., 2008).

La confirmation que l'hématopoïèse définitive provient d'un endothélium spécialisé a soulevé des questions sur la relation entre l'hémangioblaste et cette population. Bien que certains auteurs considèrent qu'il s'agit de deux populations indépendantes, d'autres estiment que l'hémangioblaste serait également à l'origine des CE homogéniques (Julien et al., 2016; Lacaud and Kouskoff, 2017; Nishikawa, 2012; Slukvin, 2013, Figure 22). En effet, l'hémangioblaste dérivé des CSPh génère un endothélium intermédiaire avant l'apparition des premières cellules hématopoïétiques

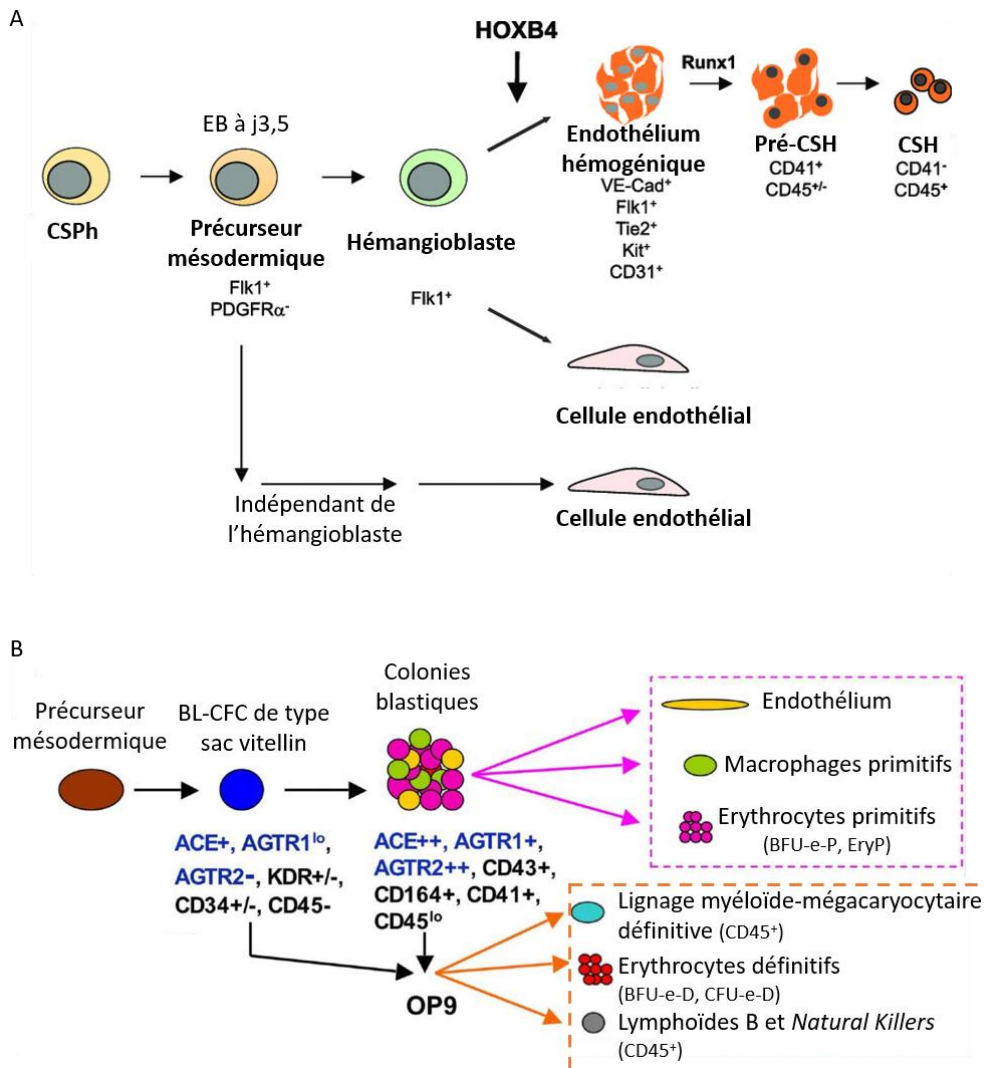


Figure 22. Modèle d'hématopoïèse via l'hémangioblaste à partir des CSP. **A.** Les CSP de souris peuvent générer une population hémangioblastique *in vitro* qui se différencie en CE vasculaires et en CE hémogéniques. La spécification de l'endothélium hémogénique dépend de l'expression du facteur de transcription $HOXB4$ et la transition endothéliale-hématopoïétique de $RUNX1$. *Traduit de Teichweyde et al. 2018.* **B.** Les CSP humaines donnent lieu à un précurseur mésodermique des progéniteurs de blastes et des colonies blastiques *in vitro* qui, selon la méthode de culture, peut générer des CE, des lignages hématopoïétiques primitifs ou, en coculture avec cellules stromales OP9, des lignages hématopoïétiques définitifs. $AGTR$: Récepteurs de l'angiotensine. *Traduit de Zambidis et al. 2008.*

(Lancrin et al., 2009b). Afin d'éclairer ce débat, deux expériences de suivi cellulaire sur des embryons de souris ont été menées avec des conclusions contraires pour l'existence de l'hémangioblaste *in vivo* (Padrón-Barthe et al., 2014; Ueno and Weissman, 2006). Toutefois, en raison des limites des techniques, des approches utilisées et également, de la nature même de l'hémangioblaste à savoir transitoire, migratoire et généré très tôt au cours du développement embryonnaire, le débat continue à être ouvert sur l'existence ou non de ce progéniteur bipotent (Lacaud and Kouskoff, 2017; Nishikawa, 2012). De plus, il est possible que l'hémangioblaste ne puisse générer qu'un ou l'autre des lignages *in vivo* en fonction des restrictions imposées par l'environnement embryonnaire, tandis que leur capacité

bipotente peut être vérifiée *ex vivo* que dans des conditions de culture adéquates qui favorisent sa différenciation endothéliale et hématopoïétique (Lacaud and Kouskoff, 2017; Nishikawa, 2012). Enfin, il est possible que l'endothélium hémogénique soit lui-même un hémangioblaste capable de générer des CE et des cellules hématopoïétiques par l'intermédiaire de la TEH. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'établir des marqueurs de la population qui précède la TEH *in vivo* avant que les cellules aient déjà activé leur programme hématopoïétique.

3.5. Maladies hématopoïétiques

La grande hétérogénéité de la lignée hématopoïétique se reflète également dans la liste des pathologies associées aux cellules sanguines. Généralement, ces pathologies peuvent être liées au dysfonctionnement des cellules matures ou à la dérégulation de l'homéostasie des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Les anémies et les thrombocytopénies sont des exemples du premier type de maladies hématologiques. L'anémie est le résultat d'un faible taux de globules rouges dans le sang et, par conséquent, de la faible capacité du sang à fournir de l'oxygène à l'organisme. Il existe plusieurs causes au développement de cette maladie, notamment des saignements excessifs (perte de plus de 20% du volume total), une érythropoïèse déficiente, soit due à des défauts dans la synthèse de l'hémoglobine (*e.g.* thalassémie ou anémie de Cooley) ou en raison de problèmes de différenciation des progéniteurs érythroïdes (*e.g.* anémie aplasique), ou à cause d'une lyse excessive des globules rouges (hémolyse) à la suite, par exemple, de maladies auto-immunes ou d'une hyperplasie. Selon le type d'anémie, les traitements comprennent des suppléments nutritionnels (fer, vitamine B12 ou acide folique) pour favoriser l'érythropoïèse, des transfusions sanguines, des traitements immunosuppresseurs ou des greffes de CSH de la moelle osseuse (Bunn and Aster, 2011; Kerr, 2010). Tout comme l'anémie, la thrombocytopénie est causée par une réduction du nombre de plaquettes, soit par une thrombopoïèse limitée, soit par une destruction excessive des plaquettes. Les traitements dépendent de la cause de cette maladie et ils incluent des corticostéroïdes, des transfusions de sang et de plaquettes ou, dans les cas les plus graves, une splénectomie (ablation de la rate) (Bunn and Aster, 2011).

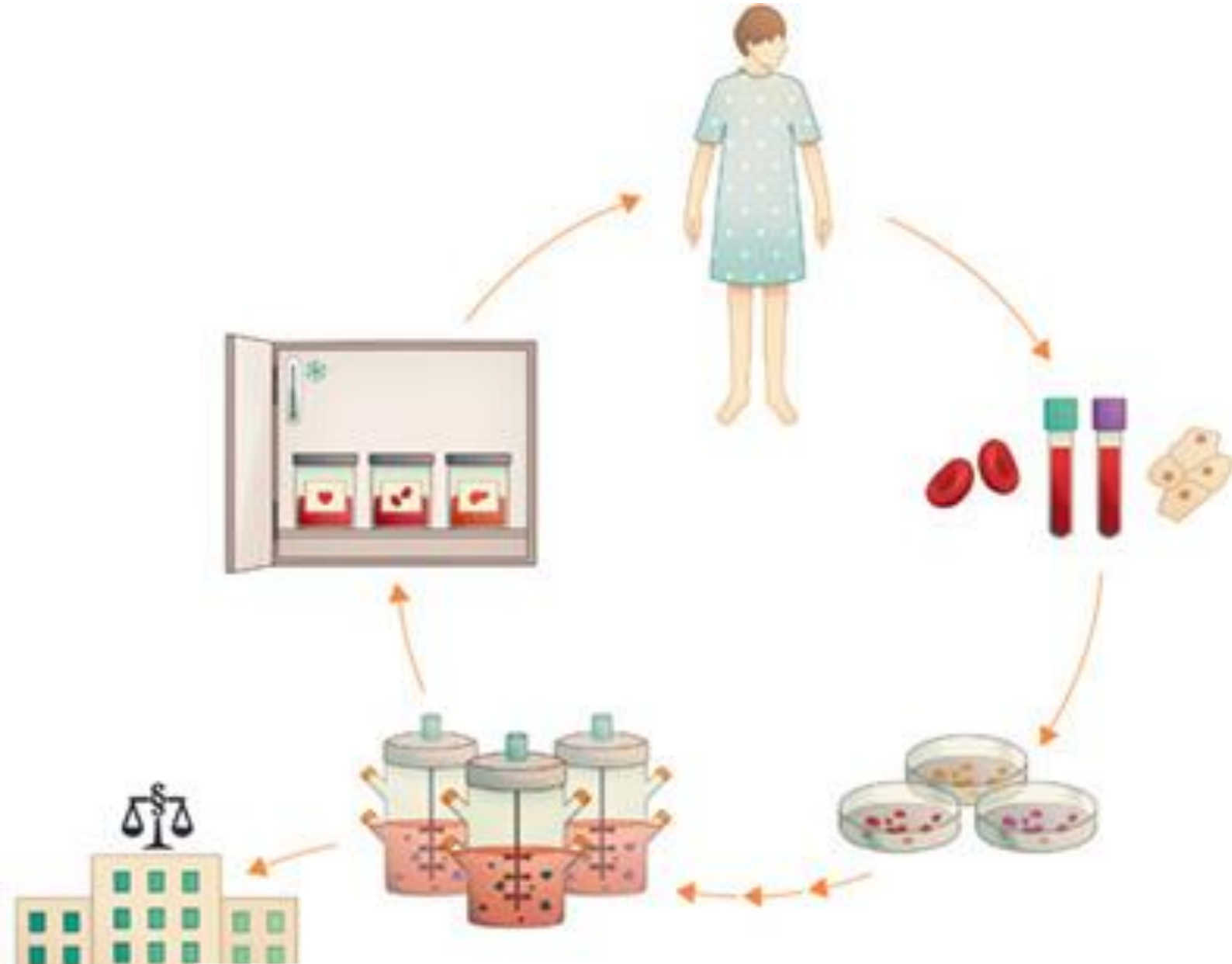
D'autre part, les conditions qui modifient l'équilibre entre la quiescence et la prolifération des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques conduisent à des processus leucémiques. Les leucémies sont classées en fonction de la cellule originale qui a été affectée et sont résumés dans le Tableau 12. Ainsi, les leucémies aiguës sont des tumeurs dans lesquels les progéniteurs (blastés) les plus immatures de la lignée myéloïde (*e.g.* la leucémie myéloïde aiguë) ou lymphoïde (*e.g.* la leucémie lymphoblastique aiguë) prolifèrent de manière incontrôlée, principalement dans la moelle osseuse, au détriment de la différenciation en cellules matures. Contrairement aux leucémies aiguës, dans les tumeurs

myéloprolifératives chroniques, l'hyper-prolifération de CSH ou de progéniteurs hématopoïétiques entraîne une augmentation excessive de certaines cellules hématopoïétiques matures (e.g. la leucémie éosinophile chronique). Les lymphomes et les néoplasmes lymphoïdes, le cancer du sang le plus courant, affectent les lymphocytes B et dans une moindre mesure, les lymphocytes T, les NK et leurs progéniteurs, constituant un groupe très hétérogène. Ils sont à leur tour divisés en lymphomes hodgkiniens ou non hodgkiniens selon la présence ou non, respectivement, de grandes cellules malignes, les cellules Reed-Stenberg, dérivées des lymphocytes B.

Tableau 12. Tableau récapitulatif des principaux néoplasmes hématopoïétiques et les cellules d'origine affectées. Traduit de Bunn and Aster 2011.

Sous-type	Cellule putative d'origine
Néoplasmes myéloïdes	
Leucémie myéloïde aigüe	Progéniteur précoce myéloïde
Syndromes myéloprolifératifs chroniques	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leucémie myéloïde chronique</i> • <i>Maladie de Vaquez</i> • <i>Thrombocytémie essentielle</i> • <i>Leucémie chronique à éosinophiles</i> • <i>Myélofibrose primitive</i> 	CSH et progéniteurs précoces myéloïdes
Syndromes myélodysplasiques	Progéniteurs précoces myéloïdes
Néoplasmes lymphoïdes	
Tumeurs des lymphocytes B matures	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leucémie lymphoïde chronique</i> • <i>Lymphome à cellules du manteau</i> • <i>Lymphome folliculaire</i> • <i>Lymphome de Burkitt</i> • <i>Lymphome diffus à grandes cellules B</i> 	Cellule B d'origine post-centre germinatif Cellule naïve B Cellule B du centre germinatif Cellule B du centre germinatif Cellule B du centre germinatif ou d'origine post-centre germinatif
Tumeurs plasmocytaires et des entités liées	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Myélome multiple</i> • <i>Lymphome lymphoplasmocytaire</i> 	Cellule B d'origine post-centre germinatif Cellule B mature
Tumeurs de lymphocytes T et NK	Cellule T mature ou NK
Lymphome hodgkinien	Cellule B du centre germinatif ou d'origine post-centre germinatif

Les néoplasmes plasmocytaires, où un type de lymphocyte B différencié prolifère, sont également d'origine lymphoïde. La croissance incontrôlée de ce type de cellules peut entraîner une augmentation des immunoglobulines M ou la destruction du tissu osseux. Enfin, les syndromes myélodysplasiques constituent un groupe hétérogène de tumeurs qui affectent la différenciation des progéniteurs myéloïdes et qui, par conséquent, génèrent des cellules matures non fonctionnelles. Selon le type de cancer du sang, différentes stratégies sont utilisées pour leur traitement, parmi lesquelles la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie ou le traitement avec des molécules inhibitrices contre les protéines mutées. Enfin, la thérapie cellulaire avec transplantation de CSH à partir de la moelle osseuse des individus sains est nécessaire pour reconstituer l'hématopoïèse chez les patients dont les CSH ont été détruites par la chimiothérapie. Cependant, comme il s'agit d'une greffe hétérologue, il existe un risque de rejet des cellules transplantées et de développer une GVHD. Cette dernière complication, spécifique aux transplantations de cellules hématopoïétiques, consiste en l'attaque des cellules hôtes par les cellules du donneur. En ce sens, les CSPih représentent une source alternative de CSH lorsqu'elles sont dérivées du même patient (à condition que les cellules ne contiennent pas la mutation à la base du cancer) ou lorsqu'elles sont dérivées de CSPih saines avec des haplotypes compatibles avec l'hôte qui ne génèrent pas de réactions immunitaires (Arber et al., 2016; Bunn and Aster, 2011; Hoffman et al., 2017; Kerr, 2010; Taylor and Abdel-Wahab, 2017).



CHAPITRE IV

LES CELLULES ENDOTHELIALES ET HEMATOPOÏTIQUES DERIVEES DES CSPH

Regulatory A

Chapitre IV : Cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques dérivées des CSPh

4.1. Introduction

Les lignées endothéliales et hématopoïétiques sont toutes deux indispensables à un grand nombre de processus physiologiques décrits dans les chapitres 2 et 3 de ce manuscrit. En effet, le dysfonctionnement des cellules matures ou le déséquilibre entre la quiescence et la prolifération de leurs progéniteurs sont responsables d'un grand nombre de pathologies humaines, dont pour certaines, il n'existe pas de traitement. La thérapie cellulaire est un traitement prometteur dans le cas des maladies cardiovasculaires liées au dysfonctionnement endothélial et est une réalité dans le cas de certaines maladies hématologiques. Toutefois, pour ces dernières, le manque de donneurs disponibles et leur compatibilité avec l'hôte, en plus du faible nombre de cellules disponibles, limitent leur application. Les CSPh ont ouvert la possibilité de générer tous les types cellulaires de l'organisme *in vitro* dont les CE et les cellules hématopoïétiques. De plus, avec l'avènement des nouvelles technologies d'édition du génome, les CSPh ont permis de modéliser des maladies endothéliales ou hématologiques d'origine génétique, de corriger le génotype et d'élucider des traitements possibles. Enfin, le domaine des CSPh évolue vers la création d'entités tissulaires qui récapitulent *in vitro* la complexité des tissus et organes humains, par exemple, les organoïdes. En ce sens, les CE et les cellules hématopoïétiques dérivées des CSPh sont nécessaires pour la vascularisation de ces modèles et l'incorporation d'éléments du système immunitaire inné et adaptatif (*e.g.*, les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes) qui abordent mieux la complexité des systèmes humains *in vitro*. Ainsi, tout au long de ce chapitre, nous nous intéressons à l'état de l'art de la différenciation endothéliale et hématopoïétique des CSPh, ainsi qu'à leurs applications *in vivo* et *in vitro*, en discutant des limites qui restent à surmonter pour sa mise en œuvre.

4.2. Les cellules endothéliales

4.2.1. Sources primaires

Isolées pour la première fois dans les années 1970, les HUVEC sont sans doute les CE humaines les plus utilisées dans la recherche en raison de leur facilité d'obtention et leur potentiel de prolifération, tout en gardant les fonctionnalités caractéristiques endothéliales (Jaffe et al., 1973). Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 de ce manuscrit, l'endothélium représente un groupe hétérogène de cellules adaptées aux besoins de chaque tissu. De nombreux efforts ont donc été déployés pour isoler les CE humaines à partir de biopsies de divers vaisseaux sanguins humains

tels que l'aorte (HAEC de l'anglais « *human aortic endothelial cells* ») (Poursaleh et al., 2019) ou l'artère pulmonaire (HPAEC de l'anglais « *human pulmonary artery endothelial cells* ») (Meyrick et al., 1995) ou de tissus et organes tels que le cerveau (HBMEC de l'anglais « *human brain microvascular endothelial cells* ») (Bernas et al., 2010), le foie (HLSEC de l'anglais « *human liver sinusoidal endothelial cells* ») (Filali et al., 2013) ou le derme (HDMEC de l'anglais « *human dermal microvascular endothelial cells* ») (Supp et al., 2002). L'obtention de biopsies humaines, l'isolement de CE et leur culture peuvent être laborieux et générer de petites quantités de cellules matures, peu prolifératives dans certains cas et avec un phénotype instable *in vitro*. C'est pourquoi, bien que les CE d'origine primaire soient largement utilisées dans la recherche fondamentale, elles ne sont pas toujours considérées comme une source cellulaire pour la thérapie cellulaire.

D'autre part, et comme mentionné au chapitre 2, les PEC présentes dans le sang périphérique des individus adultes sont la source privilégiée de thérapie cellulaire autologue grâce à leurs propriétés angiogéniques, leur potentiel de différenciation en CE spécialisées et la facilité de les obtenir par des méthodes non invasives (Asahara et al., 1997; Keighron et al., 2018; Obi et al., 2009). En fait, ces dernières années, plusieurs essais cliniques ont utilisé ces cellules pour le traitement de maladies telles que l'infarctus aigu du myocarde (Assmus et al., 2002), les cardiopathies (De Rosa et al., 2013), l'ischémie critique des membres inférieurs (Arici et al., 2015; Mutirangura et al., 2009) ou l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (Granton et al., 2015; Wang et al., 2007), démontrant ainsi la sécurité de la thérapie cellulaire avec ces cellules et, dans certains cas, l'amélioration des conditions pathologiques des patients qui suivent ce traitement (Keighron et al., 2018). Cependant, plusieurs études suggèrent que ces progéniteurs endothéliaux sont affectés à la fois en nombre et en fonctionnalité chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires, ce qui rend difficile une possible thérapie autologue (Jarajapu et al., 2014; Valgimigli et al., 2004; Werner et al., 2007). En outre, contrairement aux PEC provenant du SCO, ces progéniteurs ont une capacité de prolifération réduite et leur présence dans le sang est très faible (<0,1 %) (Ferratge et al., 2017b), ce qui limite le nombre de cellules disponibles pour la transplantation. Face à ces limitations, d'autres équipes ont effectué des greffes autologues des PEC isolés de la moelle osseuse de patients atteints des maladies cardiovasculaires dans des essais cliniques (Keighron et al., 2018; De Rosa et al., 2013). Dans des essais précliniques, le SCO, riche en cellules souches et en cellules progénitrices, est la source préférentielle de PEC montrant une capacité de prolifération plus élevée que les PEC adultes et qui participent à la formation des nouveaux vaisseaux *in vivo* (Ferratge et al., 2017b; Kang et al., 2013; Kim et al., 2016b). Toutefois, l'utilisation des PEC du SCO en thérapie cellulaire impliquerait des transplantations allogéniques et par conséquent, le besoin d'assurer la compatibilité donneur-hôte. Récemment, deux études précliniques avec des PEC de type ECFC isolées à partir du SCO ont suggéré

que ces cellules ont un potentiel immunosuppresseur (similaire aux CSM) (Proust et al., 2020). Si c'est le cas, ces cellules se positionneraient comme une source privilégiée pour une éventuelle thérapie cellulaire par rapport aux PEC issus du sang d'individus adultes. Enfin, quelle que soit la source de PEC, l'un des principaux inconvénients à l'utilisation de ces cellules est la caractérisation, souvent vague, de ces progéniteurs. Comme nous l'avons vu dans chapitre 2, il existe une grande hétérogénéité de cellules au sein de ce que l'on appelle PEC, comprenant des cellules avec un potentiel angiogénique et d'autres avec un effet pro-angiogénique par la signalisation paracrine, ces dernières étant d'origine hématopoïétique. L'ambiguïté de ce terme et le manque d'une caractérisation plus fine des cellules par les différentes équipes de recherche (souvent basée sur l'expression d'un seul marqueur, CD34 ou CD133) rendent impossible la comparaison des résultats entre les équipes et génèrent même des contradictions entre les essais précliniques et cliniques. Dans le contexte de la thérapie cellulaire qui cherche à remplacer un endothélium dysfonctionnel, les ECFC, d'origine endothéliale, sont les cellules les plus appropriées pour le traitement des maladies cardiovasculaires.

4.2.2. Les CSPh, une source infinie des cellules endothéliales

Face aux PEC ou aux CE primaires, les CSPh sont une source infinie de CE grâce à leurs deux propriétés intrinsèques : leur auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation. Comme pour les autres types de cellules, la différenciation spontanée des CSEh par la formation d'EB a été la première approche pour la génération de CE *in vitro*. A partir des EB à jour 13, Levenberg *et al.* ont isolé une population cellulaire CD31⁺ (correspondant à 2% des cellules totales) qui, lors de leur culture en conditions adhérentes, a donné lieu à des CE coexprimant le CD144 et le vWF. Ces cellules ont montré aussi une fonctionnalité endothéliale mise en évidence par la formation des réseaux de type vasculaire sur Matrigel et par l'endocytose du LDL acétylé (Levenberg et al., 2002a). Depuis, d'autres auteurs ont rapporté la différenciation endothéliale de CSPh guidée par un cocktail de cytokines. C'est le cas des études menées par Kennedy *et al.* et Lu *et al.* qui ont généré *in vitro* une population équivalente à l'hémangioblaste, les colonies blastiques (BC de l'anglais « *blasts colonies* »). Ces deux équipes ont démontré indépendamment que les BC se différencient en une population mixte de CE et hématopoïétiques (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007). De plus, Lu *et al.* ont mis en évidence le potentiel angiogénique *in vitro* des BC dans la rétine de rats diabétiques ainsi que dans le modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris (Lu et al., 2007). La coculture des CSPh avec cellules stromales s'est avérée aussi utile pour guider efficacement la différenciation endothéliale (Hill et al., 2010; Woll et al., 2008) mais celle-ci requiert le tri cellulaire des progéniteurs endothéliaux afin d'obtenir une population homogène. Par cette méthode, Hill *et al.* ont démontré que les cellules CD34⁺ à l'origine des CE en présence de VEGF, peuvent aussi se différencier en

cellules musculaires lisses en présence de TGF- β 1 et PDGF-B et en l'absence de VEGF (Hill et al., 2010). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du TGF- β (SB431542) à jour 7 de la formation des EB augmente le pourcentage de CE probablement au détriment de la population de cellules musculaires lisses positives pour l'actine du muscle lisse α (α -SMA de l'anglais « *alpha smooth muscle actin* »)

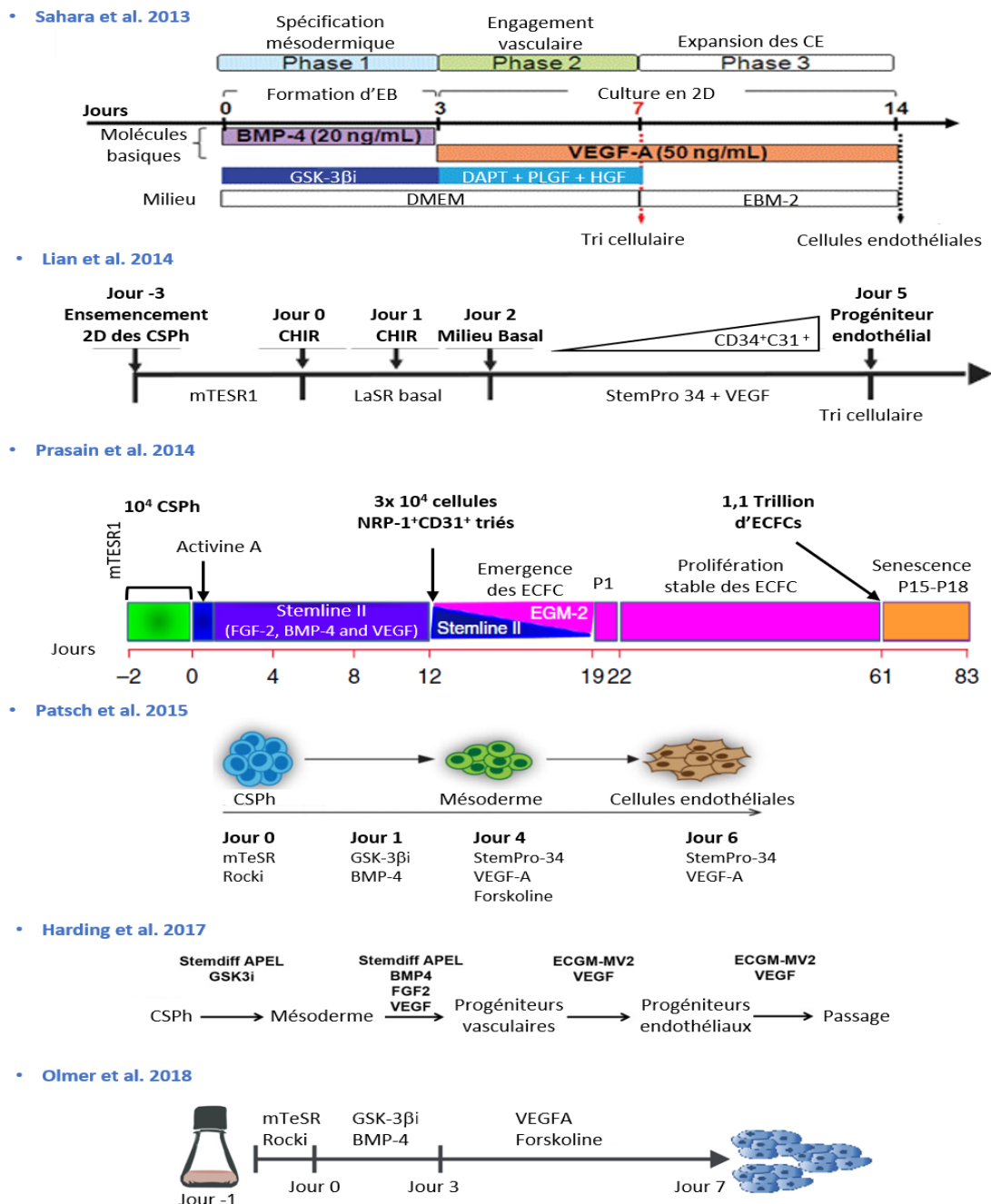


Figure 23. Protocoles de différenciation endothéliale des CSPh. Schémas représentatifs des principaux protocoles de différenciation des CSPh en CE. Les cytokines, molécules et milieux utilisés par les auteurs de ces méthodes sont affichés dans chacune des trois étapes de la différenciation : différenciation des CSPh en mésoderme, spécification vasculaire du mésoderme et expansion des progéniteurs endothéliaux. CE : Cellules endothéliales, *sGSK-3 β i* : inhibiteur de la GSK-3 β , agoniste de la voie WNT ; *Rocki* : Inhibiteur du Rho-Kinase ; *DAPT* : Inhibiteur de la γ -secrétase, antagoniste de la voie Notch.

(James et al., 2010). En l'absence de cellules nourricières, Prasain *et al.* ont différencié les CSPh sur Matrigel et ont isolé à jour 24, une population endothéliale NRP-1⁺CD31⁺ très proliférative. La différenciation de ces progéniteurs endothéliaux ont généré des CE avec un potentiel angiogénique *in vivo* tel qu'il a été démontré par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez des modèles murins d'ischémie de la rétine et des membres inférieurs (Prasain et al., 2014). En utilisant d'autres approches de différenciation dans des cultures adhérentes ou par la formation des EB, Lian *et al.* et Sahara *et al.* ont pu isoler les progéniteurs endothéliaux CD34⁺CD31⁺ ou CD144⁺CD31⁺ au jour 5 ou au jour 7 de la différenciation, respectivement (Lian et al., 2014; Sahara et al., 2014).

Dans tous les protocoles de différenciation décrits précédemment et résumés dans la Figure 23, la différenciation endothéliale des CSPh suit trois étapes principales : une première étape de différenciation en précurseurs mésodermiques VEGFR-2⁺, suivie par une étape de spécification du lignage endothéliale à partir de laquelle, des progéniteurs endothéliaux sont isolés pour, ensuite, suivre une étape d'expansion en culture adhérente. La différenciation du mésoderme est obtenue par l'ajout de la BMP-4 (Goldman et al., 2009), bien que certains auteurs utilisent également l'activine et/ou le FGF-2 (Prasain et al., 2014). Lia *et al.* ont démontré que l'ajout d'un inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3 bêta (GSK-3 β de l'anglais « *glycogen synthase kinase* ») pendant les premières heures de la différenciation induit l'activation de la voie WNT et est suffisant pour la différenciation du mésoderme, sans modifier la différenciation endothéliale ultérieure (Lian et al., 2014). Ensuite, la spécification du mésoderme est induite grâce au VEGF (Lian et al., 2014), bien que l'utilisation en combinaison avec la BMP-4 et le FGF-2 à ce stade a été aussi reporté (Harding et al., 2017; Prasain et al., 2014). L'ajout d'inhibiteurs du TGF- β à cette étape, comme mentionné ci-dessus, favorise l'obtention de la lignée endothéliale (Hill et al., 2010). De plus, Sahara *et al.* ont suggéré que l'inhibition de la voie Notch à ce stade par l'utilisation de l'inhibiteur de γ -Secretase (DAPT), non seulement empêche la différenciation des lignées non endothéliales telles que les lignages cardiogéniques, mais limite également la maturation des progéniteurs endothéliaux et favorise leur amplification (Sahara et al., 2014). Dans ces protocoles, l'isolement des CE par tri cellulaire à la fin de cette étape, est nécessaire pour l'obtention d'une population endothéliale pure (>90%). Pour ce faire, les marqueurs pan-endothéliaux CD144, CD31 ou CD34 sont les plus utilisés. Enfin, les progéniteurs endothéliaux sont cultivés en conditions adhérentes sur des surfaces recouvertes de fibronectine (Hill et al., 2010; Sahara et al., 2014) ou de collagène de type I (Prasain et al., 2014) ou IV (Lian et al., 2014), selon le protocole, avec le milieu de croissance normalement utilisé pour la culture des CE primaires (EGM-2, de l'anglais « *endothelial cell growth medium 2* ») qui contient, entre autres, SVF, VEGF, FGF-2, IGF et EGF (Hill et al., 2010; Lian et al., 2014; Prasain et al., 2014). Bien qu'il a été aussi décrit l'utilisation de la condition sans sérum de l'EGM-2, l'EBM-2 (de l'anglais

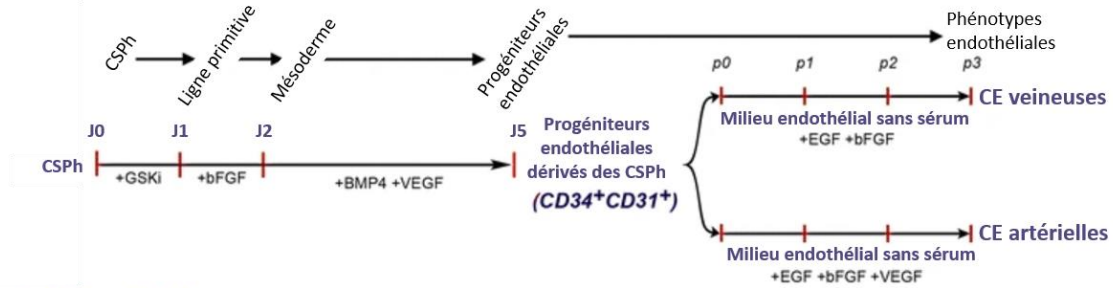
« *endothelial basal medium 2* ») (Sahara et al., 2014), ou d'autres milieux de base (e.g. *Apel, StemPro-34SF*) avec une combinaison de facteurs de croissance à plus faible dose (Harding et al., 2017; Patsch et al., 2015). Récemment, des études menées indépendamment par trois équipes différentes ont montré qu'il est possible de différencier efficacement les CSPh en CE (~70%) sans trier les populations cellulaires (Harding et al., 2017; Olmer et al., 2018; Patsch et al., 2015). Étonnamment, deux de ces protocoles suivent une méthodologie similaire aux protocoles décrits précédemment avec une différenciation des CSPh vers le mésoderme vasculaire sur Matrigel (Figure 23) (Harding et al., 2017; Patsch et al., 2015). Cependant, la méthodologie employée par Harding *et al.* qui expand la population endothéliale en culture adhérente mais en absence de matrice (Harding et al., 2017), tandis que dans celle décrite par Patsch *et al.*, l'utilisation d'un activateur de la protéine kinase A, la forskoline, en plus du VEGF induit la spécification endothéliale du mésoderme (Patsch et al., 2015). La forskoline est également utilisée par Olmer *et al.* bien que dans ce cas la différenciation se fasse à travers la formation des EB à partir d'une suspension unicellulaire de CSPh dans le but d'adapter les protocoles de différenciation endothéliale à des bioréacteurs (Olmer et al., 2018). Il est intéressant de noter que malgré la grande efficacité de la différenciation endothéliale, les auteurs de ces protocoles suggèrent l'enrichissement de ces populations en isolant les populations CD144⁺ ou CD31⁺ (Harding et al., 2017; Olmer et al., 2018; Patsch et al., 2015).

4.2.2.1. Cellules endothéliales spécialisées à partir des CSPh

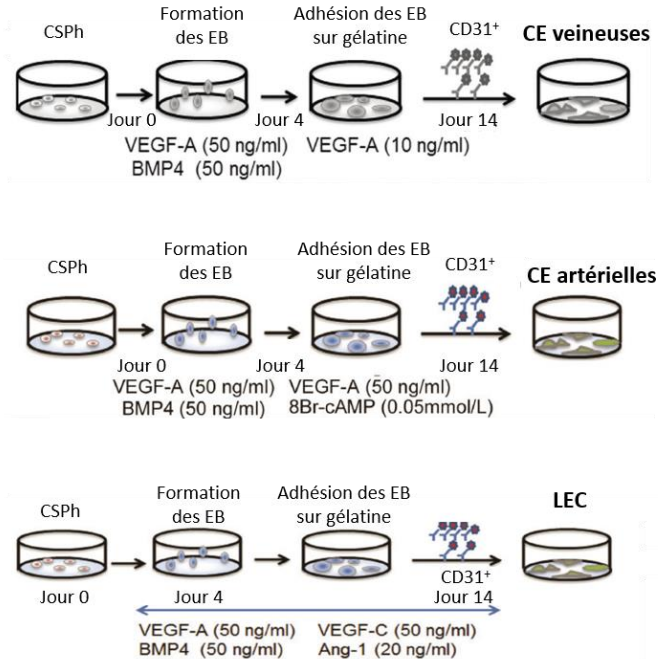
Les protocoles de différenciation endothéliale décrits ci-dessus permettent la génération de CE à partir de CSPh (CE-CSPh) dont les capacités angiogéniques ont été validées *in vitro* et *in vivo*, généralement dans des modèles murins, d'ischémie de la rétine ou des membres inférieurs, afin de confirmer leur potentiel thérapeutique. Cependant, outre leur application en thérapie cellulaire, les CE-CSPh sont nécessaires à l'établissement de modèles *in vitro* de tissus et d'organes vascularisés qui recapitulent la complexité des organes humains, permettant l'étude du développement embryonnaire, des pathologies humaines ou le développement de nouveaux médicaments. Comme nous l'avons vu au chapitre 3, l'endothélium hémogénique, progéniteur des cellules hématopoïétiques, a été différencié *in vitro* à partir des CSPh et est devenu crucial pour l'étude du développement embryonnaire des cellules hématopoïétiques (Choi et al., 2012; Ditadi et al., 2015; Kennedy et al., 2012). De plus, plusieurs équipes se sont investies dans la génération des sous-types de CE à partir CE-CSPh. Ditadi *et al.* ont démontré, grâce aux analyses transcriptomiques, que les populations endothéliales générées à partir de CSPh sont hétérogènes et englobent des cellules artérielles et veineuses qui peuvent être identifiées selon le phénotype CD34⁺CD73^{med}CD184⁺ et CD34⁺CD73⁺CD184⁻, respectivement (Ditadi et al., 2015). D'autres équipes ont mis en évidence que la

modulation de la dose de VEGF-A est suffisante pour induire la différenciation des progéniteurs

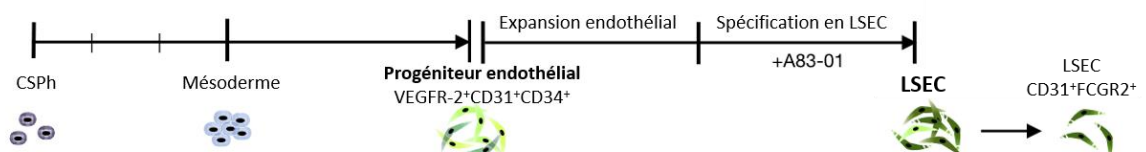
• Sriram et al. 2015



• Rufaihah et al. 2013



• Kouï et al. 2017



• Gage et al. 2020

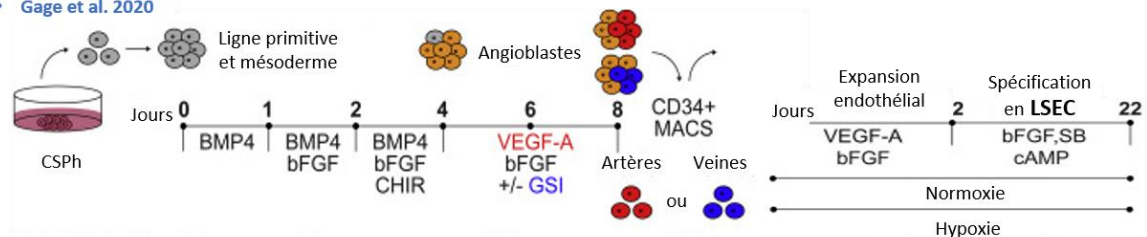


Figure 24. Différenciation des CSpH en CE spécialisées. Schémas représentatifs de la différenciation des CSpH en cellules artérielles, veineuses, lymphatiques (LEC) et sinusoidales du foie (LSEC) et les cytokines et molécules employées pour leur spécification.

endothéliaux en CE artérielles ou veineuses (Rosa et al., 2019; Rufaihah et al., 2013). Les cellules obtenues par ces protocoles, en plus de réguler l'expression des marqueurs artériels et veineux, ont développé des fonctionnalités différentes selon leur phénotype. Ainsi par exemple, les cellules

artérielles ont une morphologie plus allongée sous flux et produisent des niveaux de NO plus élevés par rapport aux cellules veineuses (Rosa et al., 2019). Des résultats similaires ont été obtenus par Sriram *et al.* qui ont différencié des progéniteurs endothéliaux en cellules artérielles en présence d'EGF (de l'anglais « *epidermal growth factor* »), FGF-2 et VEGF et en cellules veineuses seulement avec EGF et bFGF (Sriram et al., 2015) (Figure 24). L'injection de ces cellules intégrées dans des gels de Matrigel chez des souris immunodéprimées, a montré que ces cellules sont capables de former des nouveaux vaisseaux *in vivo* en maintenant leur phénotype (artériel ou veineux) (Sriram et al., 2015). D'autre part, Zhang *et al.* ont démontré que la spécification artérielle guidée par les inhibiteurs du TGF- β et de l'inositol monophosphatase en conjonction avec le resvératrol, le FGF2 et le VEGF-A donnent lieu à une population de CE coronaires ayant une fonctionnalité similaire à celle des CE artérielles coronaires primaires en termes de consommation d'oxygène, d'adhésion des leucocytes, de production de NO et de réponse à la force de cisaillement. Ces cellules ont amélioré aussi la survie des souris atteintes d'un infarctus de myocarde (Zhang et al., 2017).

La différenciation des CE lymphatiques a été moins explorée jusqu'à présent à partir des CSPh. Cependant, Lee *et al.* ont montré que les CSPh peuvent se différencier en ce type endothélial par la formation d'EB, la coculture avec OP9 ou en culture adhérente sans cellules nourricières, bien que dans ces dernières conditions, la différenciation soit moins efficace et les CE qui en résultent sont moins performantes (Lee et al., 2015). Comme chez la souris, le VEGF-C est indispensable pour la spécification de ce type de CE à partir des CSPh (Kono et al., 2006; Rufaihah et al., 2013). L'Ang-1 a été aussi utilisé dans ce but (Rufaihah et al., 2013). *In vivo*, les CE lymphatiques Lyve⁺Podoplanine⁺, dérivées à partir de CSPh par Lee *et al.* ont participé à la formation des vaisseaux lymphatiques et ont amélioré la guérison d'une blessure au niveau de l'oreille chez la souris (Lee et al., 2015).

Beaucoup plus explorée est la différenciation des CSPh en CE de la barrière hémato-encéphalique, HBMEC, qui a bénéficié des connaissances accumulées au fil des ans grâce aux études avec des cellules primaires humaines et des modèles animaux. Il est intéressant de noter qu'à la différence d'autres méthodes de différenciation endothéliale, la plupart des protocoles pour la génération des HBMEC-CSPh ne nécessitent pas de sélection cellulaire (Figure 25). La différenciation des CSPh en HBMEC dépend de l'ajout de l'AR (Lippmann et al., 2014; Stebbins et al., 2018) et de la culture ultérieure sur une matrice mixte de collagène IV et de fibronectine (Lippmann et al., 2012; Neal et al., 2019). Au-delà de l'expression de protéines des jonctions serrées et de transporteurs membranaires, les monocouches de HBMEC-CSPh ont démontré une TEER (résistance électrique transépithéliale/endothéliale, de l'anglais « *trans-endothelial electrical resistance* ») plus élevée (200-8000 Ω cm²) que celle obtenue précédemment avec les lignées cellulaires ou des HBMEC primaires (130-2200 Ω cm²). La TEER est une mesure de la résistance électrique exercée par une couche

cellulaire et elle est lié à l'intégrité et perméabilité de cette couche. De plus, la coculture avec des astrocytes ou des péricytes, retrouvés dans le cerveau autour des capillaires de la barrière hémato-encéphalique, a démontré induire une augmentation de TEER *in vitro* (Jamieson et al., 2017; Lippmann et al., 2012; Neal et al., 2019; Workman and Svendsen, 2020). Grâce à ces caractéristiques, ces CE ont été utilisées dans différents modèles *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique tel que les systèmes de « transwell » (Li et al., 2019; Lippmann et al., 2012) ou les systèmes microfluidiques, démontrant une perméabilité aux médicaments similaire par d'autres méthodes (Faley et al., 2019; Linville et al., 2019). Récemment, les CE ont été incorporées dans des organoïdes cérébraux permettant leur vascularisation et facilitant leur transplantation dans des modèles de souris (Pham et al., 2018; Song et al., 2019; Vargas-Valderrama et al., 2020).

Récemment, deux équipes de recherche ont généré des LSEC à partir de CSPh après une étape d'expansion d'une population endothéliale (CD34⁺ ou VEGFR-2⁺CD31⁺CD34⁺) (Figure 24). Pour ce faire, les CE-CSPh ont été cultivées sur fibronectine (Koui et al., 2017) ou sur Matrigel (Gage et al., 2020) en présence des inhibiteurs de la voie de signalisation TGF- β (Gage et al., 2020; Kouï et al., 2017). De plus, Gage *et al.* ont montré que les LSEC ont leur origine principalement dans les angioblastes à phénotype veineux et que l'hypoxie favorise leur spécification en LSEC *in vitro* (Gage et al., 2020). *In vivo*, la transplantation des angioblastes artériels et veineux et des LSEC provenant de

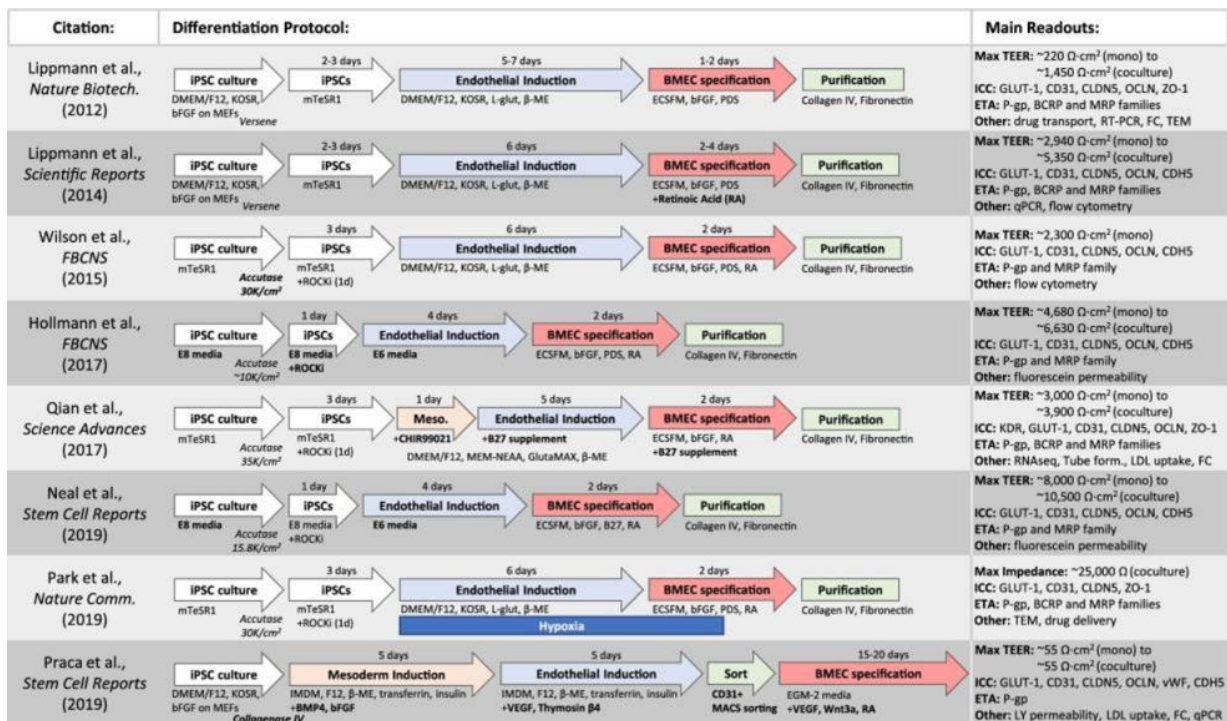


Figure 25. Résumé des principaux protocoles de différenciation des CSPih en CE de la barrière hémato-encéphalique. Les étapes de différenciation des CSPih en HBMEC dans divers protocoles publiés sont illustrées dans cette figure ainsi que la caractérisation des cellules obtenues en terme de résistance électrique transépithéliale/endothéliale (TEER), immunocytochimie (ICC), activité des transporteurs de membrane (ETA) entre autres. *Workman et Svendsen 2020.*

ces deux populations a démontré que les angioblastes veineux génèrent un plus grand nombre de cellules greffées qui acquièrent les caractéristiques des LSEC matures, dont la production du facteur VIII humain et la formation d'un endothélium fenestré (Gage et al., 2020). Dans cette étude, les HUVEC utilisées comme témoins n'ont pas donné une transplantation stable ni ont acquis des caractéristiques des LSEC (Gage et al., 2020). D'autre part, Kouï *et al.* ont démontré que la coculture de progéniteurs hépatiques et de LSEC, issus de la même lignée CSPH, induit une différenciation plus efficace des hépatoblastes par rapport à la coculture de ces progéniteurs hépatiques avec les HUVEC (Kouï et al., 2017).

Finalement, malgré l'absence de marqueurs spécifiques des CE spécialisées, la différenciation simultanée des CE et des autres lignages cellulaires à partir des CSPH a permis d'obtenir, par exemple, des organoïdes rénaux contenant des CE dans des structures similaires aux glomérules des néphrons (Freedman et al., 2015; Homan et al., 2019a; Vargas-Valderrama et al., 2020).

4.2.2.2. Améliorations des protocoles de différenciation endothéliale

Une des limitations la plus importante de la différenciation endothéliale des CSPH est la sélection de l'ECM compatible avec les normes BPF, puisque, comme décrit dans la section précédente, la plupart des protocoles en 2D induisent la spécification du mésoderme vasculaire sur Matrigel, une matrice d'origine animale. Récemment, une équipe américaine a utilisé un criblage à haut débit pour détecter la combinaison de protéines recombinantes de l'ECM qui favorise plus efficacement la production de CE-CSPH dès le jour 0, en présence du BMP-4, VEGF et SVF (Hou et al., 2017). Grâce à cette méthode, ils ont pu déterminer, après 5 jours de différenciation sur ces matrices, que les combinaisons de collagène IV, du sulfate d'héparane et de laminine ou gélatine favorisent la génération jusqu'à 50% des CE CD31⁺CD144⁺ (Hou et al., 2017). Étonnamment, la fibronectine, qui a été largement utilisée pour l'expansion endothéliale, ne figurait pas dans ces combinaisons ayant les meilleures performances dans la spécification endothéliale des CSPH, ce qui appuie l'hypothèse que les différentes étapes de la différenciation requièrent différentes compositions de la matrice cellulaire (Hou et al., 2017). Outre que la composition de l'ECM, les propriétés physiques de celle-ci, en particulier la dureté, peut favoriser la différenciation des CSPH vers un lignage cellulaire spécifique, même en absence des facteurs de croissance (Engler et al., 2006). En effet, les CSPH cultivées sur le polymère polydiméthylsiloxane, communément appelé PDMS, revêtu de collagène IV, se différencient en le mésoderme seulement si la dureté du gel est faible (module de Young, E, ≈ 3 kPa ou $\approx 1,7$ MPa par rapport aux surfaces rigides avec $E \approx 3$ GPa). De manière intéressante, l'utilisation de cette approche conditionne la spécification endothéliale ultérieure, permettant d'obtenir jusqu'à 75% de cellules CD144⁺ sans tri cellulaire et en absence de facteurs de croissance ou de petites molécules (Smith et al., 2017).

La concentration d'oxygène dans le milieu peut influencer également la différenciation des CE par l'activation des HIF, de la voie cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR, de l'anglais « *mechanistic target of rapamycin* ») ou par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, de l'anglais « *reactive oxygen species* ») (Blatchley and Gerecht, 2020). Ainsi, par exemple, HIF-1 régule jusqu'à 200 gènes dans les CE (Manalo et al., 2005) et mTOR influence les voies Notch et WNT (Wouters and Koritzinsky, 2008). A cet égard, plusieurs études sur la différenciation endothéliale des CSPh en 2D ou par la formation d'EB ont conclu que l'hypoxie favorise la différenciation endothéliale en l'absence de facteurs de croissance ou de petites molécules (Kusuma et al., 2014; Prado-Lopez et al., 2009; Shin et al., 2011). Pour les EB, l'hypoxie, en plus d'induire l'expression de marqueurs endothéliaux tels que CD144, CD31, VEGFR-2 ou Tie-2, stabilise HIF-1 α et favorise sa translocation vers le noyau, ainsi qu'elle augmente la sécrétion de VEGF et de FGF-2 dans le milieu de culture. Au contraire, l'inhibition de HIF-1, réduit l'expression des marqueurs endothéliaux décrits ci-dessus, ainsi que les niveaux de VEGF et de FGF-2, démontrant que de faibles niveaux d'oxygène favorisent la différenciation endothéliale grâce à l'activité du HIF-1 α (Shin et al., 2011). En 2D, Kusuma *et al.* ont démontré que l'hypoxie pendant la différenciation mésodermique est suffisante pour induire la différenciation endothéliale et augmenter la prolifération des futures CE-CSPh. De plus, l'hypoxie favorise la spécification artérielle et la sécrétion de protéines de l'ECM par les CE telles que le collagène IV ou la fibronectine (Kusuma et al., 2014, 2015). Dans ces études, des fortes concentrations de ROS ont été détectées exclusivement dans des conditions d'hypoxie et leur inhibition pendant la première étape de la différenciation des CSPh a réduit de manière drastique l'expression des marqueurs endothéliaux à des niveaux similaires à ceux des cellules différenciées par la normoxie (Kusuma et al., 2015).

4.2.3. Applications des cellules endothéliales générées par la CSPh

Bien que cette section soit axée sur les CE-CSPh, il convient de noter que les applications mentionnées ci-dessous sont valables pour toute autre source de CE. De fait, avant d'utiliser les cellules dérivées des CSPh, les chercheurs utilisent souvent des CE primaires, principalement les HUVEC ou les PEC. D'autre part, bien que les applications aient été divisées en une première sous-section sur la thérapie cellulaire et la modélisation des maladies et une deuxième sous-section consacrée à l'utilisation des CE-CSPh dans l'ingénierie tissulaire, il est nécessaire de préciser que l'ingénierie tissulaire est un domaine de la biologie médicale qui englobe également les applications de la thérapie cellulaire et de la modélisation des maladies, mais qui comprend des systèmes plus complexes qui incluent la coculture de plusieurs types cellulaires et l'emploi des biomatériaux, à la différence des méthodologies classiques de greffes en thérapie cellulaire.

4.2.3.1. La thérapie cellulaire et la modélisation des maladies

Pour mettre en évidence leur potentiel thérapeutique des CE-CSPh ont été transplantées dans des modèles murins de maladies cardiovasculaires (Patsch et al., 2015; Prasain et al., 2014). Notamment, le modèle le plus utilisé est celui de l'ischémie du membre inférieur chez la souris ou le rat, qui vise à recréer la maladie artérielle périphérique (MAP), l'une des maladies cardiovasculaires

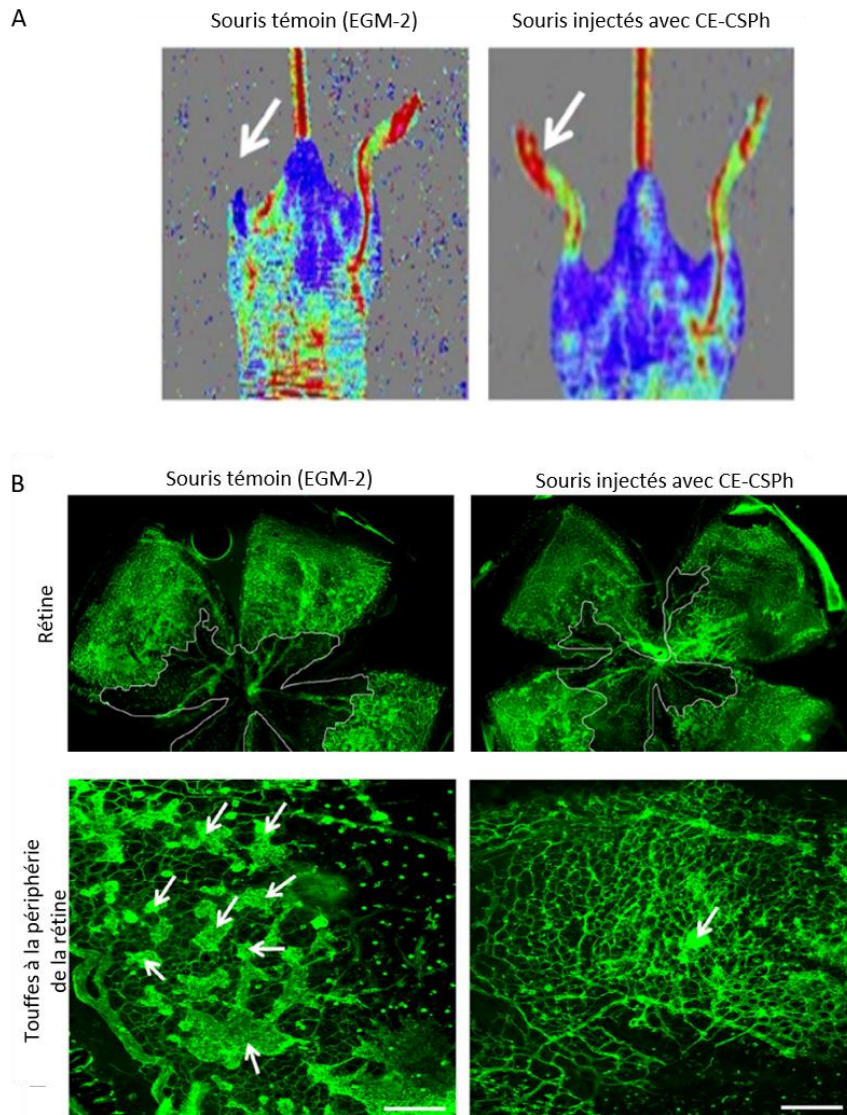


Figure 26. Potentiel angiogénique CE-CSPh dans les modèles d'ischémie du membre inférieur et de rétinopathie induite par l'oxygène. A. Images obtenues avec un laser doppler sur des souris dont une ischémie du membre inférieur a été induite par la ligation de l'artère fémorale. Les souris qui ont été injectées avec des CE-CSPh ont subi une reperfusion du membre ischémié tandis que, les pattes non-injectées et les souris injectées avec du milieu endothélial (EGM-2) sans cellules, ont une pauvre perfusion sanguine (flèches) qui aboutit à la nécrose et à la perte du membre inférieur. B. Images représentatives de montage des rétines obtenues chez des souris où une rétinopathie a été induite par l'oxygène. Les vaisseaux sanguins marqués à l'isolectine B4 en vert montrent une revascularisation à l'intérieur de la rétine (délimité par la ligne blanche) seulement dans celles qui ont été injectées avec CE-CSPh (panel supérieur). Barre d'échelle 1 mm. A la périphérie de la rétine, la néovascularisation en réponse à l'ischémie induit la formation de touffes vasculaires (flèches) dans les rétines témoins tandis que ces structures sont rarement retrouvées chez les souris injectées avec des CE-CSPh (panel inférieur) Barre d'échelle 200 μ m. Images d'après Prasain et al. 2014.

les plus courantes chez les humains. Ainsi, la diminution de l'apport sanguin aux tissus du membre inférieur de la souris s'obtient à travers la cautérisation ou ligature de l'artère fémorale (Padgett et al., 2016). Dans ces circonstances et en l'absence de traitement, les tissus du membre inférieur, dont le muscle, subit une nécrose qui peut entraîner la perte de la patte (Figure 26). Les CE-CSPh injectées par voie intramusculaire, après l'induction de l'ischémie, participent à la récupération du flux sanguin dans la patte affectée, même un mois après l'injection comme il est mis en évidence à l'aide d'un laser doppler (Figure 26). Cette amélioration est due à la formation de nouveaux vaisseaux par les cellules injectées, tel qu'il peut être constaté par immunocytochimie du tissu affecté *post-mortem* (Lu et al., 2007; Padgett et al., 2016; Patsch et al., 2015; Prasain et al., 2014). Un autre modèle murin largement utilisé est la rétinopathie induite par l'oxygène. Dans ce modèle, les souris nouveau-nées sont temporairement exposées à l'hyperoxie pour induire la destruction des vaisseaux sanguins de la rétine. Lorsque les souris sont remises dans conditions de normoxie, il se déclenche une formation de touffes vasculaires à la périphérie de la rétine vers le vitré, une caractéristique observée aussi chez des patients atteints de rétinopathies ischémiques (Scott and Fruttiger, 2010) (Figure 26). L'injection intravitréenne de CE-CSPh un jour après le retour des nouveau-nés à la normoxie réduit la formation de touffes à la périphérie de la rétine et favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à l'intérieur 72h post-injection (Lu et al., 2007; Prasain et al., 2014) (Figure 26). Dans ces deux modèles d'ischémie, l'autre organe (patte ou oeil) de la souris sert de témoin et ne montre aucun signe d'amélioration en l'absence de CE-CSPh (Figure 26). D'autres modèles de vascularisation *in vivo* comprennent l'injection sous-cutanée de gels cellularisés composés de Matrigel, de collagène I, de fibrinogène ou d'une autre matrice extracellulaire. Dans ces modèles, il n'est pas possible de détecter la formation de vaisseaux sanguins par les CE humaines et leur connexion au système vasculaire de la souris et en conséquence, ils ne représentent pas un modèle de pathologie cardiovasculaire (Prasain et al., 2014; Sriram et al., 2015).

Le dysfonctionnement endothélial lié au développement des maladies cardiovasculaires a été aussi modélisé *in vitro* grâce à la culture des CE-CSPh sous flux. Adams *et al.* ont démontré que la culture de CE-CSPh soumise à un changement de flux irrégulier, décrit comme une cause d'athérosclérose, pouvait induire l'expression d'endothéline et réduire l'expression d'eNOS dans ces cellules. De plus, l'ajout au milieu de culture d'une statine, un agent décrit précédemment comme athéroprotecteur, induit l'expression d'eNOS et des gènes *KLF2* et *KLF4*, qui ont un rôle dans la prévention du dysfonctionnement endothélial et réduit l'expression de l'endothéline (Adams et al., 2013).

En plus de leur potentiel thérapeutique dans des modèles animaux de maladies cardiovasculaires, les CE-CSPi ont été utilisées pour modéliser et corriger *in vitro* des maladies

d'origine génétique qui affectent certaines des fonctions des CE. C'est le cas de l'hémophilie A, une maladie causée par une mutation dans le gène du facteur de coagulation 8 (F8) produit par les CE. La déficience en ce facteur affecte la coagulation sanguine et produit des hémorragies graves et parfois mortelles, chez les patients atteints de cette maladie (Lacroix-Desmazes, 2013). Grâce à l'utilisation d'outils de modification génétique tels que TALENS (de l'anglais « *transcription activator-like effector nucleases* ») ou CRISPR-cas9, plusieurs équipes ont rapporté la correction de lignées CSPih issues de patients porteurs de cette mutation (Wu et al., 2016) ou la transduction de ces CSPih avec une version corrigée du gène (Sung et al., 2019, 2020). Dans les deux cas, les CE-CSPih ont été capables de produire une version fonctionnelle du facteur VIII *in vitro* (Sung et al., 2019, 2020; Wu et al., 2016). *In vivo*, Neumeyer *et al.* ont implanté, chez des souris hémophiles, des gels de collagène et de fibrine contenant des CE-CSPih provenant de patients atteints d'hémophilie A corrigées. Par cette méthode, les auteurs ont démontré que ces cellules produisent le facteur VIII, détecté dans le sang des souris injectées, confirmant ainsi leur potentiel thérapeutique (Neumeyer et al., 2019). La modélisation des maladies non mendéliennes est également utile pour déchiffrer les mécanismes qui régissent ces pathologies. Les CE dérivées à partir des CSPih issues de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) familiale et porteurs d'une mutation dans le gène du récepteur de la BMP-2 (BMPR2) et d'individus sains porteurs et non-porteurs de la mutation, ont permis d'identifier des différences génétiques responsables de la faible pénétrance de cette mutation (20%) chez les patients avec HTAP familiale. Les CE-CSPih des patients ont montré une adhésion, une migration, une survie et une angiogenèse réduite par rapport aux CE-CSPih des individus sains porteurs et non porteurs de la mutation. Une analyse approfondie de ces populations a révélé que les individus porteurs de la mutation qui ne développent pas la maladie expriment des niveaux plus élevés de BIRC3 (de l'anglais « *baculoviral IAP repeat containing 3 protein* »), ce qui compense les effets de la mutation BMPR2 et favorise la survie de la CSPih (Gu et al., 2017).

4.2.3.2. Ingénierie tissulaire

Dans la section précédente à propos des modifications des protocoles de différenciation endothéliale, nous avons mentionné que l'ingénierie tissulaire pouvait améliorer les performances et les fonctionnalités des CE-CSPh. Dans cette section, nous verrons également que l'ingénierie tissulaire peut bénéficier de l'utilisation de ces cellules. Dans les systèmes de puces microfluidiques, les CE sont nécessaires pour recréer les vaisseaux sanguins et établir une barrière entre le milieu et le tissu cible, en plus d'établir en soi un modèle pour l'étude de l'angiogenèse et du développement vasculaire. Par exemple, en utilisant un système de microfluidique, Huang *et al.* ont créé un gradient linéaire de VEGF et SDF1 α et ont démontré que les CE dérivées des CSPh migrent sélectivement en réponse au VEGF mais pas au SDF1 α (Huang et al., 2013). D'autres études ont montré que les CE-

CSPh s'allongent dans la direction du flux (Belair et al., 2015), acquérant un phénotype artériel en présence de forces de cisaillement élevées (Sivarapatna et al., 2015) et forment des réseaux vasculaires avec un lumen lorsqu'elles sont incorporées dans un gel de fibrine sous flux (Belair et al., 2015). L'application de la microfluidique aux systèmes biologiques *in vitro* a également ouvert la possibilité de recréer sur une puce, des organes qui sont interconnectés entre eux et dont l'échange de métabolites est contrôlé par l'endothélium comme cela se produit *in vivo*. Vatine *et al.* ont cultivé des HBMEC, des astrocytes et des progéniteurs neuronaux dérivés d'une lignée CSPh sur une puce branchée à un dispositif microfluidique pour modéliser la barrière hémato-encéphalique. Dans ce système, la circulation du milieu uniquement au contact des HBMEC-CSPh modélise le passage du sang dans les vaisseaux sanguins chez l'homme. Cette étude, a démontré que la force de cisaillement favorise l'expression des protéines de liaisons étroites sans altérer le TEER, même après plusieurs jours de culture. Ce système favorise également la maturation neuronale et possède une perméabilité face à différentes molécules, similaire à celle décrite précédemment par d'autres études. L'utilisation de ce modèle avec des CE-CSPih provenant d'un patient atteint de la maladie de Huntington a révélé une perméabilité au dextrane plus élevée que celle des CE-CSPih de trois individus sains, validant ainsi l'utilité de ce modèle dans des conditions physiologiques et pathologiques (Vatine et al., 2019).

D'autre part, l'utilisation de CE-CSPh dans la formation des organoïdes s'est avérée nécessaire. Les organoïdes sont des structures multicellulaires et autoorganisées dérivées de cellules souches ou de progéniteurs qui représentent les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des organes humains *in vitro*. Comme nous l'avons vu au chapitre 2, les CE participent activement à l'organogenèse et assurent le transport des nutriments et de l'oxygène vers les tissus. L'absence des vaisseaux dans ces entités limite leur croissance, leur maturation et leur survie *in vitro*. Plusieurs chercheurs ont rapporté la vascularisation des organoïdes dérivés de cellules humaines primaires et de CSPh de personnes saines et de malades, dans la plupart de cas à partir des CE primaires. Dans l'annexe 1, l'article revue intitulé "*L'endothélium, un acteur clé dans le développement des organes et la vascularisation organoïde dérivée de la CSPh*", résume les progrès et les limites de la vascularisation d'organoïdes à partir des CE-CSPh (Vargas-Valderrama et al., 2020).

Un grand nombre de CE sont également nécessaires pour l'approche de l'ingénierie tissulaire qui cherche à recellulariser des organes précédemment décellularisés. Grâce à cette méthodologie, les organes humains non transplantables sont traités pour éliminer les composants cellulaires et laisser un squelette de matrice extracellulaire qui guide le repeuplement de l'organe par de nouvelles cellules transplantables. Comme preuve de concept, Ciampi *et al.* ont revascularisé un rein de rat préalablement décellularisé avec 15×10^6 CE-CSPih injectées par l'artère rénale et 30×10^6 CE-CSPih

injectées par la veine rénale grâce à un flux statique. Par cette méthode, ils ont démontré la possibilité de repeupler les vaisseaux sanguins, y-compris les artères, les veines, les artérioles, les veinules et les capillaires des glomérules. Dans les gros vaisseaux sanguins, les CE-CSPih ont formé un endothélium continu identifié par la présence des jonctions serrées ZO-1 (de l'anglais « *zonula occludens 1* »). En revanche, les CE-CSPih ont développé des fenestrations dans le glomérules similaires à celles observées dans les reins physiologiques, démontrant ainsi que les matrices extracellulaires présentes dans les organes décellularisés sont suffisantes pour guider la spécification endothéliale (Ciampi et al., 2019). Récemment, une équipe américaine a également signalé la recellularisation de foies de rats avec des CE, des hépatocytes et des cholangiocytes dérivés de CSPih, avec de CSM et de fibroblastes primaires, suivi par leur transplantation chez le rat. Les auteurs de cette étude ont reporté la perfusion de 40×10^6 CE-CSPh par la veine centrale et 5×10^6 de CE-CSPh par la veine porte, en plus des CE-CSPh qui ont été ajoutées au parenchyme hépatique avec les hépatocytes, les fibroblastes et les CSM. Cette méthode a permis d'obtenir une couverture de plus de 70% des vaisseaux sanguins, y-compris la veine centrale et la veine porte et les capillaires sanguins. Le CE-CSPh ont montré un phénotype endothélial stable et une fonctionnalité mise en évidence par l'endocytose du LDL. Les auteurs ont rapporté aussi un taux de 65% de recellularisation de l'arbre biliaire par des cholangiocytes dérivés des CSPh et de le parenchyme hépatique, composé, entre autres, d'hépatocytes qui produisent l'albumine et l'alpha-1 anti-trypsine ce qui suggère une certaine fonctionnalité de cet organe recellularisé (Takeishi et al., 2020).

Enfin, les CE-CSPh peuvent être utiles dans la construction de greffons vasculaires et de valves cardiaques ou pulmonaires jusqu'à présent réalisés avec des biomatériaux inertes, qui doivent être remplacés périodiquement (Jang et al., 2019). Dans le cas des greffes vasculaires, l'utilisation de CE-CSPh avec des cellules musculaires lisses, également dérivées de CSPh, pourrait permettre la fabrication de petits vaisseaux sanguins, impossible avec les méthodes traditionnelles. Generali *et al.* ont démontré la possibilité de créer un greffon vasculaire à partir de la culture de CE et des cellules musculaires lisses provenant de la même lignée de CSPh dans d'échafaudages (de l'anglais « *scaffolds* ») composés de biopolymères (PGA/P4HB, pour PGA « acide polyglycolique » et P4HB pour « polyhydroxyalcanoates »). Les échafaudages cellulés sous flux ont montré une meilleure couverture cellulaire que ceux cultivés dans des conditions statiques. Après trois semaines de culture *in vitro*, les échafaudages cellulés par les deux méthodes ont montré une organisation similaire à celle d'un vaisseau sanguin physiologique, avec les CE formant une monocouche à l'intérieur, entourée de cellules musculaires lisses à l'extérieur. Cependant, la condition sous flux a permis le développement d'une couche de cellules musculaires lisses beaucoup plus épaisse que dans les conditions de culture statique (Generalis et al., 2019).

4.3. Les cellules hématopoïétiques

Dans les chapitres précédents, nous avons mentionné que la thérapie cellulaire à partir des CSH issues de la moelle osseuse est une réalité depuis 60 ans. Cependant, la nature allogénique de la plupart des transplantations limite son application puisqu'elle exige que le donneur et le receveur soient compatibles. Dans une même famille, les plus grandes probabilités d'être compatible sont entre frères et sœurs. Pourtant, seuls 30% des patients qui ont besoin d'une greffe de moelle osseuse trouvent un donneur compatible au sein de leur famille (Henig and Zuckerman, 2014). C'est pourquoi, bien que la transplantation de CSH soit aujourd'hui une réalité, les chercheurs continuent à explorer des sources alternatives de ces cellules. Comme dans le cas des CE, les CSH peuvent être isolées de la fraction des cellules mononuclées du SCO, une source beaucoup plus accessible que la moelle osseuse adulte, bien que son utilisation se confronte à la même problématique de compatibilité entre donneur et receveur. Toutefois, la création de banques de CSH dérivées de SCO, caractérisées par des haplotypes pourrait permettre l'identification d'une source compatible plus rapidement que dans le cas des transplantations actuelles.

D'autre part, les CSPih offrent la possibilité de dériver des CSH et des cellules hématopoïétiques matures à partir des propres cellules du patient. S'il est vrai que les maladies hématologiques ont leur origine dans des mutations génétiques, pour une grande partie des cancers du sang, les mutations sont acquises et limitées à la lignée hématopoïétique, permettant de dériver des CSPih saines à partir d'autres tissus. Dans le cas des maladies génétiques héréditaires dont la mutation est connue et présente dans toutes les cellules du patient, les outils actuels de modification génétique permettraient de corriger les CSPih *in vitro*. Il existe également l'option de créer des banques de CSPih avec des haplotypes spécifiques qui assurent la compatibilité avec une grande partie de la population, comme indiqué au chapitre 1. Bien que cette option s'inscrive dans le cadre des transplantations allogéniques, contrairement à d'autres sources, la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation de la CSPih garantirait l'approvisionnement continu de cellules compatibles.

4.3.1. Différenciation de cellules hématopoïétiques matures à partir des CSPh

S'il est vrai que l'objectif ultime de la différenciation hématopoïétique des CSPh est la génération, l'identification et l'isolement de CSH *in vitro* à partir desquelles tous les lignages hématopoïétiques matures peuvent être obtenus *in vivo* ou *in vitro*, cet objectif n'a pas été atteint à ce jour. Cependant, la génération de cellules hématopoïétiques matures, indépendamment de l'identification des CSH, a été utilisée pour la modélisation de maladies *in vitro* et ouvre la possibilité à la production de produits biologiques tels que les plaquettes ou les globules rouges pour le traitement de maladies hématologiques et/ou dans procédures médicales où la transfusion est

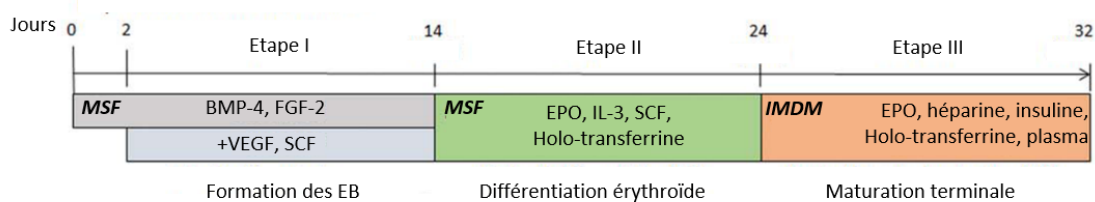
nécessaire. En plus, comme dans le cas des CE-CSPh, les composants du système immunitaire tels que les lymphocytes, les macrophages ou les granulocytes différenciés à partir des CSPh sont essentiels pour récapituler la complexité des organes *in vitro* dans des modèles comme les organoïdes.

Dans le cas des globules rouges, plusieurs équipes ont rapporté la production de grandes quantités de ces cellules à partir de CSPh différenciées en présence (Dias et al., 2011; Lu et al., 2008; Olivier et al., 2006) ou absence de cellules stromales (Huang et al., 2015; Lapillonne et al., 2010) (Figure 27). Cependant, la plupart des protocoles génèrent des érythrocytes qui expriment principalement les hémoglobines embryonnaires et fœtales et rarement, l'hémoglobine adulte. Ces populations ont aussi de faibles niveaux d'énucléation ($\approx 10\%$) même dans les protocoles de différenciation et culture à long terme (Dias et al., 2011; Huang et al., 2015; Lapillonne et al., 2010; Lu et al., 2008; Olivier et al., 2006). Dans le cas des plaquettes, la maturation des mégacaryocytes est cruciale. Néanmoins, les différents protocoles de différenciation à partir de la CSPh génèrent des cellules de taille réduite, avec un faible niveau de polyploïdie et une faible production de plaquettes par rapport aux mégacaryocytes adultes (Bluteau et al., 2013; Feng et al., 2014; Gaur et al., 2006) (Figure 27). En ce sens, Thon *et al.* ont démontré que la culture de mégacaryocytes dérivés de CSPh sous flux augmente le nombre de plaquettes produites par mégacaryocyte (Thon et al., 2014). Dans une approche différente, Moreau *et al.* ont surexprimé les facteurs de transcription FLI-1, GATA1 et SCL dans les CSPh pendant la différenciation hématopoïétique. Les auteurs ont constaté que l'expression exogène de ces facteurs induisait la production de grandes quantités de mégacaryocytes et plus tard, de plaquettes. Malgré ces progrès, les analyses transcriptomiques ont montré que les mégacaryocytes dérivés des CSPh diffèrent considérablement des mégacaryocytes isolés à partir du SCO et survivent moins longtemps dans la circulation des souris immunodéprimées (Moreau et al., 2016). Nakamura *et al.* ont généré des mégacaryocytes immortalisés à partir de CSPh, capables de survivre jusqu'à 5 mois, par la surexpression conditionnelle de c-MYC, BCL-XL (de l'anglais « *B-cell lymphoma-extra large* ») et BMI1 (de l'anglais « *B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1* ») pendant la mégacaryopoïèse. Étonnement, lors de l'inactivation de ces facteurs, les mégacaryocytes déclenchent la production efficace des plaquettes. Cependant, ces plaquettes ont montré un niveau d'adhésion et d'agrégation plus faible que les plaquettes d'individus adultes (Nakamura et al., 2014).

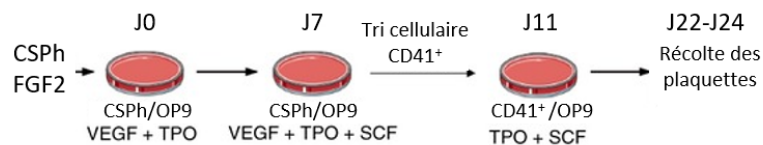
En ce qui concerne les lignages lymphoïdes, la génération de lymphocytes B et T à partir des CSPh ouvre la possibilité de nouvelles approches en immunothérapie. Cependant, la complexité de la maturation de ces lymphocytes a empêché jusqu'à présent la différenciation des CSPh vers ces lignages en absence de cellules nourricières. La différenciation des CSPh sur les cellules stromales

(OP9 ou MS5) qui surexpriment les ligands Notch, DLL1 ou DLL4, ont généré des lymphocytes T immatures qui n'ont pas subi une sélection positive et par conséquent, n'ont pas acquis les phénotypes CD4⁺ ou CD8⁺ (Kennedy et al., 2012; Montel-Hagen and Crooks, 2019; Timmermans et al., 2009) (Figure 27). Afin de générer des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) contre un antigène spécifique, certains auteurs ont opté pour la reprogrammation des lymphocytes T matures en CSPih (Maeda et al., 2016; Nishimura et al., 2013). D'autres équipes ont transduit les CSPh avec des vecteurs lentiviraux codant pour un TCR spécifique ou un récepteur d'antigène chimérique (CAR, de l'anglais « *chimeric antigen receptor* ») (Themeli et al., 2013). Les deux méthodes ont réussi à obtenir des lymphocytes T à partir des CSPh qui expriment le récepteur contre l'antigène souhaité, malgré que leur effet cytotoxique ait été signalé rarement et seulement sous stimulation par des anticorps anti-CD3 (Maeda et al., 2016). Grâce à la culture en 3D dans une interphase air-liquide de progéniteurs mésodermiques issus des CSPh et de cellules stromales DLL1⁺ ou DLL4⁺, Montel-Hagen *et al.* ont démontré la maturation *in vitro* de lymphocytes T (Montel-Hagen et al., 2019). Par cette méthode, les CSPh donnent lieu à environ 70% de lymphocytes CD8⁺TCRαβ⁺ qui expriment un grand

• **Erythrocytes (Huang et al. 2015)**



• **Plaquettes (Bluteau et al. 2013)**



• **Lymphocytes T (Montel-Hagen et al. 2019)**

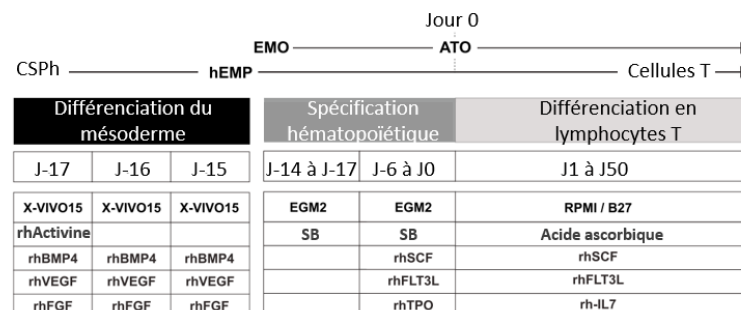


Figure 27. Différenciation de CSPh en cellules hématopoïétiques matures. Schémas représentatifs des protocoles actuels pour la génération des érythrocytes, plaquettes et lymphocytes T à partir de CSPh. Les cytokines et molécules ainsi que les milieux utilisés par les auteurs des protocoles tout au long de la différenciation sont affichés sur les schémas. MSF : milieu sans sérum.

nombre de TCR réarrangés. De plus, les CSPh transduites initialement avec un TCR montrent une activité cytotoxique spécifique contre l'antigène reconnu par le TCR transduit (Montel-Hagen et al., 2019).

D'autres composants du système immunitaire inné et adaptatif ont également été différenciés à partir de CSPh, tels que les neutrophiles (Sweeney et al., 2014; Trump et al., 2019), les éosinophiles (Choi et al., 2009), les cellules présentatrices d'antigènes (Choi et al., 2009; Su et al., 2008), les NK (Larbi et al., 2012; Shankar et al., 2020; Zhu et al., 2020) et les lymphocytes B (French et al., 2015), bien que, comme dans les exemples mentionnés ci-dessus, la génération de ces lignages hématopoïétiques soit limitée en nombre et en état de maturité.

D'autre part, la différenciation des CSPh en cellules hématopoïétiques matures et l'utilisation des techniques d'édition du génome, ont permis de modéliser et de corriger *in vitro* des maladies hématologiques monogéniques telles que les thalassémies (Liu et al., 2017) ou l'anémie falciforme (Huang et al., 2015), deux des hémoglobinopathies les plus courantes chez l'homme, ainsi que des cancers du sang (Ye et al., 2009). Ye *et al.* ont généré des CSPih à partir de cellules CD34⁺ provenant du sang d'un patient atteint de la maladie de Vaquez, une maladie myéloproliférative qui affecte principalement la prolifération des globules rouges. Les CSPih dérivées du patient portaient la mutation JAK2-V617F, décrite chez 95% des patients atteints de cette maladie. La différenciation hématopoïétique de ces CSPih a montré que ces cellules produisent une quantité plus importante de globules rouges par le test CFC et en culture liquide, en plus de présenter une prolifération élevée par rapport aux cellules hématopoïétiques provenant de patients sains (Ye et al., 2009). Iizuka *et al.* ont généré une lignée CSPih à partir d'un patient présentant une mutation dans le gène *RUNX1*, qui est à l'origine de pathologies plaquettaires ayant une propension à développer une leucémie myéloïde aiguë. La différenciation hématopoïétique de la lignée CSPih porteuse de la mutation a généré un nombre similaire de progéniteurs CD34⁺CD43⁺, de lignages myéloïdes et érythroïdes par rapport aux CSPih saines. Cependant, le nombre de mégacaryocytes produits avec les CSPih du patient a été réduit. La correction de la mutation dans ces CSPih par TALENS a permis de récupérer les niveaux de mégacaryocytes similaires à ceux des CSPih saines (Iizuka et al., 2015). Ces deux exemples suggèrent que, même chez les patients dont les CSH sont porteuses de mutations provoquant des maladies hématologiques, la génération de CSPih et la correction de la mutation *in vitro* offre la possibilité de générer des cellules hématopoïétiques pour la thérapie cellulaire autologue.

4.3.2. Différenciation des CSPh en CSH

La différenciation hématopoïétique des CSPh a permis de générer les lignages primitifs et définitifs *in vitro* ainsi que d'établir des marqueurs des différentes populations impliquées dans les deux vagues d'hématopoïèse, y-compris l'endothélium hémogénique. En effet, comme mentionné dans le chapitre 3, plusieurs équipes ont rapporté la dérivation de progéniteurs multipotents capables de générer des cellules lymphoïdes et myéloïdes *in vitro*, ce qui suggère la présence de CSH dans cette population (Choi et al., 2012; Ditadi et al., 2017; Kennedy et al., 2012). Cependant, malgré les différents efforts déployés pour démontrer leur potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme comme preuve fiable d'une dérivation de CSH *bona fide*, les méthodes de différenciation hématopoïétique de CSPh en absence des cellules nourricières n'ont réussi à générer qu'une très faible reconstitution 12 semaines après la greffe (<1% de cellules CD45⁺ humaines détectées dans la moelle osseuse) chez les souris immunodéprimées (Féraud et al., 2016b; Wang et al., 2005). De plus, cette reconstitution n'est observée que dans les cas d'injections intra-osseuses, ce qui suggère une déficience dans la migration et le *homing* de ces progéniteurs hématopoïétiques (Wang et al., 2005). Tian *et al.* ont démontré en 2006 que la différenciation hématopoïétique de CSPh en présence de la lignée stromale S17 génère des cellules de type CSH ayant un potentiel de reconstitution chez les souris NOD/SCID, même lorsque les cellules étaient injectées par voie intraveineuse (Tian et al., 2006). Ledran *et al.* ont réussi à améliorer les niveaux de reconstitution des CSH dérivés des CSPh (CSH-CSPh) en utilisant des cellules stromales provenant de différentes niches hématopoïétiques de souris telles que l'AGM ou le foie fœtal. Ces études ont mis en évidence que le potentiel de reconstitution de ces CSH-CSPh dépend de la couche stromale utilisée lors de leur différenciation (Ledran et al., 2008). Gori *et al.* ont montré que la coculture de cellules CD34⁺ dérivées de CSPh avec des HUVEC ou des PEC immortalisées (E4ORF1⁺ PEC) favorise également leur potentiel de reconstitution (Gori et al., 2015). Malgré ces résultats prometteurs, la génération des CSH à partir de CSPh avec une forte capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme nécessitent la surexpression des facteurs de transcription hématopoïétiques (Doulatov et al., 2013; Sugimura et al., 2017). Ainsi, par exemple, Sugimura *et al.* ont obtenu un endothélium hémogénique en TEH avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme chez des souris NOD/SCID, grâce à la surexpression d'ERG, HOXA5, HOXA9, HOXA10, LCOR, RUNX1 et SPI1 (Sugimura et al., 2017). Chez les souris transplantées, des cellules myéloïdes et lymphoïdes matures ont été observées ainsi qu'avec des greffes secondaires, validant le caractère CSH de ces cellules (Sugimura et al., 2017). Bien que cette approche soit très prometteuse pour la génération de CSH *in vitro*, la transduction des CSPh peut induire l'apparition de mutations dans le génome et la surexpression de facteurs de transcription peut convertir les dérivées des CSPh en cellules tumorigènes. C'est le cas des

progéniteurs hématopoïétiques dérivés des CSPh qui ont été transduits avec le gène *MLL-AF4* (de l'anglais « *mixed-lineage leukemia-ALL1-fused gene from chromosome 4* ») pour favoriser leur reconstitution *in vivo*. Tan *et al.* ont constaté la transformation de ces progéniteurs en cellules cancéreuses à long terme chez les souris greffées (Tan *et al.*, 2018). Récemment, une étude menée par Guyonneau-Harmand *et al.* a démontré la possibilité de générer une population APLNR⁺CD45⁻ à partir d'EB au jour 17 avec un grand potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme chez des souris immunodéprimées, après injection intraveineuse. Dans ce protocole compatible avec les BFP et sans cellules nourricières, les auteurs suggèrent sur la base d'une analyse transcriptomique, que les cellules APLNR⁺CD45⁻ sont l'équivalent de l'endothélium hémogénique en cours de la TEH (Guyonneau-Harmand *et al.*, 2017). Ainsi, tous ces études mettent en évidence le potentiel thérapeutique des CSPh dans la production de CSH *in vitro* et soulignent le besoin de décrypter les signaux conduisant à l'acquisition du potentiel de reconstitution des CSH.

4.3.3. Perspectives pour l'amélioration de la différenciation hématopoïétique à partir des CSPh.

En 2018, une étude transcriptomique a comparé des cellules CSH-CSPh générées par différentes méthodes, dont la formation des EB, la coculture avec OP9 ou la transduction avec des facteurs de transcription et les CSH somatiques provenant de la moelle osseuse, du sang périphérique adulte, du SCO ou du foie fœtal de 15 donneurs. Les auteurs de cette étude ont identifié l'expression du récepteur CXCR4 comme une des différences les plus flagrantes entre les CSH-CSPh et les CSH primaires. Comme décrit dans le chapitre 3, le récepteur CXCR4 et son ligand, la chimiokine CXCL12 (SDF-1) sont nécessaires à la migration (*homing*) et à la domiciliation dans la moelle osseuse des CSH transplantées. Contrairement aux CSH somatiques, les CSH-CSPh n'expriment pas le CXCR4 et ne migrent pas en réponse à la chimiokine SDF-1. Cette caractéristique pourrait contribuer à une absence de rétention des CSH-CSPh dans la moelle osseuse des souris transplantées. Exceptionnellement, les CSH issues de la surexpression des facteurs de transcription mentionnés ci-dessus, expriment des niveaux intermédiaires de CXCR4 et se rapprochent, au niveau transcriptomique, aux CSH somatiques. Comme preuve de concept, Reid *et al.* ont transduit les CSPh avec des vecteurs codant pour le CXCR4. La surexpression de ce récepteur dans les CSH-CSPh a amélioré significativement leur potentiel de reconstitution, bien qu'il ait été limité à court terme (< 4 semaines) (Reid *et al.*, 2018).

La faible reconstitution hématopoïétique pourrait être aussi le résultat d'une faible production des CSH tel qui a été mis en évidence au cours du développement embryonnaire chez les mammifères, dont l'endothélium hémogénique ne génère pas plus que 3 HSC (Gekas *et al.*, 2005;

Kumaravelu et al., 2002). Cependant, l'absence de marqueurs permettant d'identifier des CSH *bona fide* chez l'homme, empêche de confirmer cette hypothèse et rend difficile l'enrichissement d'une population avec des caractéristiques de CSH authentiques à partir des CSPh. L'expansion et la maturation ultérieures des CSH *in vitro* tel qu'il se produit dans le foie fœtal *in vivo* pourraient favoriser l'obtention de CSH appropriées pour les applications cliniques. L'expansion *in vitro* est tout aussi explorée pour les CSH somatiques. En 2012, Duchez *et al.* ont réussi à étendre la population de CSH *ex vivo*, dans des conditions conformes aux BPF en utilisant SCF, Flt-3L, TPO et G-CSF (Duchez et al., 22012). Par la suite, ils ont démontré, dans un essai clinique que les CSH amplifiées gardent leur potentiel de reconstitution hématopoïétique (Forcade et al., 2015). En plus des cytokines, des criblages de haute performance ont permis d'identifier des petites molécules et des composés chimiques qui favorisent l'expansion des CSH *in vitro*. C'est le cas de l'antagoniste du récepteur d'aryl hydrocarboné, Stem-Reginin1 (SR1) (Boitano et al., 2010), d'un dérivé du pyrimidinol, l'UM171 (Fares

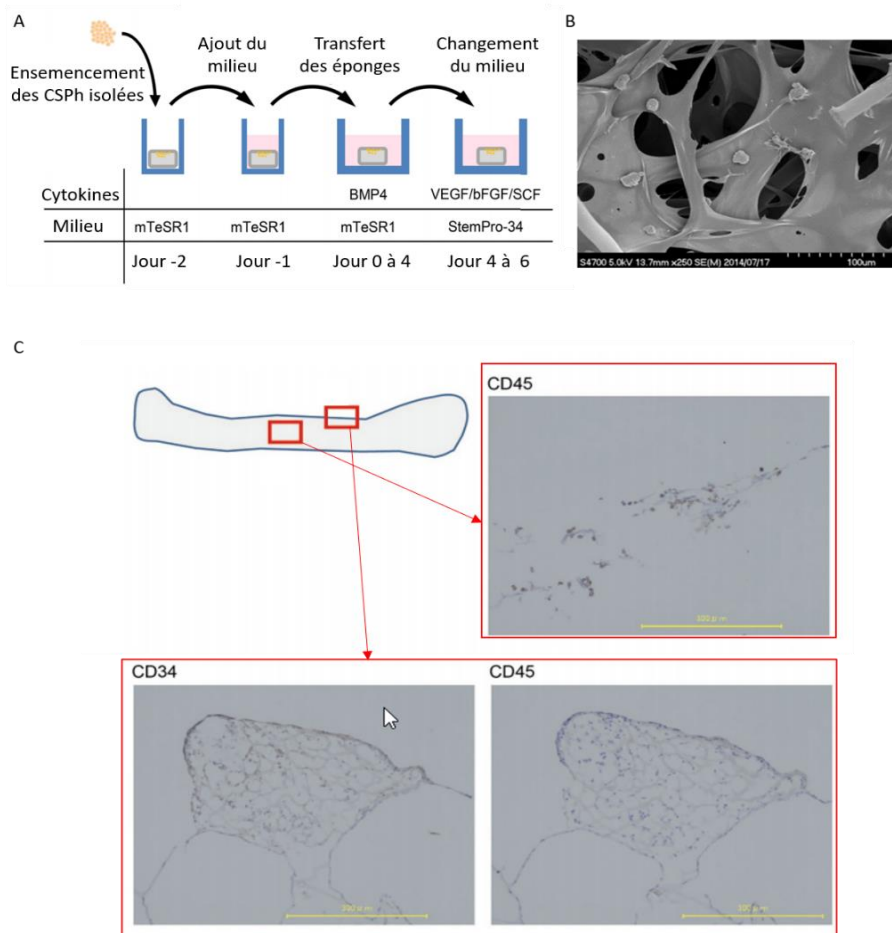


Figure 28. Différenciation hématopoïétique des CSPh en utilisant des biomatériaux. A. Protocole de différenciation décrit par Sugimine *et al.* grâce à l'utilisation d'une éponge de collagène avec des fibres de PET et en présence de cytokines. B. Image de microscopie électronique à balayage d'un agrégat des CSPh dans l'éponge de collagène. Barre d'échelle 100 µm. C. Images histologiques des deux sections de l'échafaudage signalées par les carrés rouges. Les cellules CD34⁺ sont localisées principalement en contact avec les fibres de PET en formant des structures en forme de sac, tandis que les cellules CD45⁺ se retrouvent dans les cavités de collagène.

et al., 2014), ou de l'inhibiteur d'histone désacétylase, l'acide valproïque (De Felice et al., 2005). Toutes ces molécules ont été décrites pour leur capacité à induire une expansion *ex vivo* des CSH isolées à partir du SCO sans modifier leur potentiel de reconstitution *in vivo* chez la souris et sont actuellement utilisées dans des essais cliniques pour vérifier leur potentiel thérapeutique chez l'homme (Cohen et al., 2018; Papa et al., 2019; Wagner et al., 2016). En ce qui concerne les progéniteurs hématopoïétiques dérivés de CSPh, le SR1 et l'UM171 ont montré une augmentation de la prolifération de ces cellules *in vitro*, bien que leur potentiel de reconstitution n'ait pas encore été prouvé (Angelos et al., 2017; Mesquitta et al., 2019; Tao et al., 2017).

Enfin, l'utilisation d'échafaudages qui récapitulent les propriétés biophysiques de la moelle osseuse et favorisent l'expansion et la différenciation hématopoïétique est une alternative aux protocoles classiques de différenciation des CSPh. En ce sens, une équipe japonaise a utilisé une éponge de collagène renforcée par des fibres polytétraphtalate d'éthylène (PET) pour différencier les CSPh en cellules hématopoïétiques en présence de cytokines. Grâce à cette méthodologie, les CSPh se sont différenciées en progéniteurs hématopoïétiques capables de produire en continu de grandes quantités de cellules myéloïdes et d'érythrocytes pendant environ un mois. Étonnamment, les cellules CD34⁺ sont restées à l'intérieur de l'échafaudage alors que les cellules différenciées l'ont quitté et sont restées en suspension dans le milieu, facilitant leur récupération. En plus des cellules hématopoïétiques, les CSPh ont également générée des CE et des cellules mésenchymateuses qui sont restées dans l'échafaudage tout au long de la différenciation. Étant donné l'implication de ces types cellulaires dans la niche hématopoïétique, elles pourraient être indispensables dans ce système pour le maintien de la population CD34⁺ à l'intérieur de l'échafaudage (Sugimine et al., 2016) (Figure 28). D'autre part, Xu et al. ont différencié les CSPh dans un échafaudage composé d'un hydrogel à base de peptides contenant différentes populations de cellules stromales (Xu et al., 2016). Après 10 jours de culture, les CSPh différenciées, en présence de cellules stromales de la moelle osseuse de souris plus les cellules OP9-DL1⁺, ont donné lieu à environ 70% de cellules CD34⁺CD43⁺ capables de générer *in vitro* des lignées myéloïdes et érythroïdes. *In vivo*, ces progéniteurs hématopoïétiques ont montré un potentiel de reconstitution hématopoïétique des lignages myéloïdes et lymphoïdes jusqu'à 12 semaines après l'injection (par voie intraveineuse) (Xu et al., 2016). D'autre part, la différenciation des CSP de souris sur une surface recouverte par l'oxyde de graphène a favorisé la production des progéniteurs hématopoïétiques CD41⁺ à partir d'une population de type hémangioblastique, en absence des cellules stromales. Les auteurs ont démontré que cette augmentation des progéniteurs CD41⁺ est le résultat d'une spécification majeure de l'endothélium hémogénique à partir de l'hémangioblaste (Garcia-Alegria et al., 2016).

Objectifs

Les CE qui recouvrent les parois des vaisseaux sanguins et les cellules hématopoïétiques du sang sont impliquées dans une grande diversité de processus physiologiques, notamment le transport du sang et des nutriments vers toutes les cellules du corps, l'hémostase, la réponse immunitaire et même l'organogenèse. Le dysfonctionnement endothélial est la cause et la conséquence des maladies cardiovasculaires. Selon l'OMS, ces maladies sont la première cause de mortalité dans le monde. D'autre part, le dysfonctionnement des cellules hématopoïétiques est à l'origine d'un groupe large et hétérogène de maladies allant des anémies aux cancers du sang. La thérapie cellulaire ou la transplantation de CE ou des cellules hématopoïétiques saines est, dans certains cas, la seule alternative au traitement de ces maladies. Cependant, la thérapie cellulaire avec des CE primaires est encore en phase d'étude clinique. Au contraire, la transplantation des CSH est une procédure courante depuis quelques années. Toutefois, l'hétérogénéité et le nombre limité de donneurs compatibles mettent en évidence la nécessité de trouver d'autres sources de cellules pour la thérapie cellulaire. Depuis leur découverte, les CSPh sont considérées comme une source illimitée de cellules. Plusieurs équipes ont publié des protocoles pour la différenciation des CE et des cellules hématopoïétiques à partir des CSPh, mais le manque de maturité de ces cellules, l'inefficacité de la différenciation ou la difficulté d'adapter ces protocoles aux BFP limitent leur application. Dans ce contexte, mon travail de doctorat a eu pour objectif décliné en deux axes :

Axe 1 : Différenciation des CSPh en cellules endothéliales et hématopoïétiques à travers d'une population de type hémangioblaste.

- Établir une méthode de différenciation des CSPh vers un progéniteur bipotent hémato-endothélial, l'hémangioblaste, dans des conditions sans sérum *in vitro*.
- Isoler et caractériser phénotypiquement ce progéniteur.
- Démontrer la capacité de ce progéniteur à générer une population entièrement endothéliale ou hématopoïétique
- Démontrer la reproductibilité de ce protocole par la différenciation des deux lignées de CSEh et une lignée de CSPih.
- Caractériser phénotypiquement et fonctionnellement *in vitro* les CE issues de la population hémangioblastique.
- Évaluer le potentiel angiogénique de ces CE *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie de la chambre dorsale.
- Caractériser le potentiel de reconstitution hématopoïétique de ce progéniteur bipotent chez des souris immunodéficientes.

Axe 2 : Organoïdes hépatiques vascularisés dérivés des CSPih

- Explorer d'autres applications des CE-CSPH dans des modèles *in vitro* en collaboration avec l'équipe du Dr. A. Dubart-Kupperschmitt et dans le cadre du projet *iLite* : évaluer la coculture en 3D des CE et des hépatoblastes dérivés d'une même lignée de CSPih pour la formation d'organoïdes hépatiques vascularisés.

RESULTATS

Résultats

Axe 1

Depuis l'isolement des premières CSEh en 1998 (Thomson et al., 1998a) et puis, avec la reprogrammation des cellules somatiques en CSPih en 2007 (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007), les CSPh sont d'un grand intérêt pour la communauté scientifique et médicale, au regard de leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Les cellules hématopoïétiques et les CE différenciées à partir de CSPh représentent une alternative prometteuse pour le traitement des maladies hématologiques et cardiovasculaires. Les protocoles de différenciation, visant à produire des cellules issues des CSPh, cherchent à récapituler le développement embryonnaire. L'émergence proche dans l'espace et dans le temps des cellules hématopoïétiques et des CE suggèrent l'existence d'un progéniteur embryonnaire commun hémato-endothélial appelé l'hémangioblaste (Huber et al., 2004; Sabin, 1920). Ce progéniteur a été différencié et caractérisé à partir des CSE murines (Choi et al., 1998) et humaines (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007), et isolé *ex vivo* à partir des embryons de souris (Huber et al., 2004). Malgré tout, son existence *in vivo* reste encore sujet à débat. De plus, son utilisation pour la génération de populations homogènes de cellules hématopoïétiques et/ou CE *in vitro* à partir des CSPh reste peu exploré jusqu'alors.

Dans l'étude qui a pour titre « *Efficient hPSCs differentiation into endothelial and hematopoietic cells via a hemangioblast-like population* », soumise au journal « *Stem Cell Reports* » et présentée dans les pages suivantes de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la différenciation de trois lignées de CSPh (deux CSEh et une CSPih) en une population cellulaire équivalente à l'hémangioblaste. A partir de ces cellules, nous avons généré *in vitro* soit une population pure de cellules hématopoïétiques soit des CE. Après 84 heures de différenciation des CSPh en EBs et en absence de sérum, l'étude phénotypique de ces cellules a montré l'expression des marqueurs de surfaces caractéristiques de l'hémangioblaste tels que CD309, CD34 et CD143 (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007; Zambidis et al., 2008) ainsi que le marqueur endothélial CD144. A l'issue du tri CD144⁺ des EB à 84h, nous avons observé des transcrits hémato-endothéliaux, ETV2 et RUNX1, plus exprimés dans la population EB-CD144⁺ comparée à celle des EB-CD144⁻ et des EB non triés. Leur potentiel hémato-endothélial a été confirmé par la différenciation des EB-CD144⁺ et des EB-CD144⁻ en cellules hématopoïétiques et CE.

Dans les conditions de culture hématopoïétique, seuls les EB-CD144⁺ ont généré plus de 90% des colonies blastiques (BC) exprimant les marqueurs hématopoïétiques CD43, CD45 et CD41 ainsi que les facteurs de transcription hématopoïétiques RUNX1c, HOXB4, GATA2, GATA1 et SCL. Ces cellules se différencient dans les lignages érythro-myéloïdes (CFU-GM, CFU-GEMM et BFU-E). De

plus, les EB-CD144⁺ contribuent également à la reconstitution hématopoïétique chez des souris immunodéprimées (NSG) irradiées et injectées par la voie intra-fémorale.

Dans les conditions de culture endothéliale, les EB-CD144⁺, à différence des EB-CD144⁻, ont généré une population des plus de 90% des CE prolifératives et fonctionnelles *in vitro* caractérisées par l'expression du CD144, CD31, CD34, CD309 et CD143 et l'absence des marqueurs hématopoïétiques CD43, CD45 et CD41. Nous avons également démontré que les CE issus de ce progéniteur s'incorporent aux vaisseaux sanguins *in vivo* grâce à un modèle murin d'ischémie en chambre dorsale.

Axe 2

La différenciation endothéliale des CSPh s'avère également intéressante pour l'ingénierie tissulaire et le développement de nouveaux modèles récapitulant *in vitro* entièrement ou partiellement les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des organes. C'est le cas des organoïdes du foie qui suscitent l'intérêt pour des applications telles que la découverte des nouveaux médicaments, les études toxicologiques ou la modélisation des maladies hépatiques. Dans ce cadre, les CE jouent un rôle très important dans la vascularisation des organoïdes ainsi que dans la différenciation et la maturation des progéniteurs hépatiques, les hépatoblastes (Hb), en cellules matures du foie, les hépatocytes et les cholangiocytes. A cette fin, nous avons participé au projet européen iLite (de l'anglais « *innovation in Liver tissue engineering* ») en collaboration avec l'équipe de Dr. Anne Dubart-Kupferschmitt pour la génération des organoïdes hépatiques vascularisés à partir des CE, CSM et Hb différenciés indépendamment de la même lignée de CSPih et cocultivés *in vitro* dans des conditions favorisant leur agrégation et leur auto-organisation en 3D. Nos résultats, présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit, suggèrent que la coculture de ces trois lignages cellulaires induit la différenciation des Hb en hépatocytes matures par rapport à la différenciation conventionnelle des Hb en 2D, ainsi qu'en cholangiocytes. Les CE survivent également à l'intérieur des agrégats et expriment les marqueurs caractéristiques des CE sinusoidales du foie. Ces résultats feront l'objet d'une deuxième publication prochainement.

Efficient hPSCs differentiation into endothelial and hematopoietic cells via a hemangioblast-like population

Alejandra Vargas-Valderrama^{1*}, Anne-Charlotte Ponsen¹, Denis Clay², Tudor Manoliu⁴, Karine Ser-le-Roux⁵, Valérie Rouffiac⁴, Cyril Quivoron⁶, Fawzia Louache⁷, Georges Uzan¹, Hind Guenou^{1,2}, Maria-Teresa Mitjavila Garcia^{1,2}.

- 1- INSERM UMRS-MD 1197, Université Paris Sud-Université Paris-Saclay. Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France
- 2- INSERM UMS-44, Université Paris Sud-Université Paris-Saclay. Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France
- 3- Université d'Evry-Val-d'Essonne. Université Paris-Saclay, Evry, France
- 4- Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Plate-forme Imagerie et Cytométrie, UMS AMMiCa, Villejuif, F-94805, France
- 5- INSERM, Gustave Roussy, Plate-forme d'Evaluation Préclinique, UMS AMMiCa, Villejuif, France
- 6- Laboratoire d'Hématologie Translationnelle, Gustave Roussy, Villejuif, France.
- 7- INSERM UA09/ Université Paris-Saclay / CNRS-GDR 3697 Micronit, Institut André Lwoff, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Summary

hPSC-derived endothelial and hematopoietic cells are an interesting source of cells for tissue engineering. Despite their close spatial and temporal embryonic development, the current hPSC differentiation protocols are specialized only in one of these lineages. In this study, we bring back the hemangioblast concept, a bipotent haemato-endothelial progenitor, to generate *in vitro* pure populations of these two lineages. The hemangioblast-like population is obtained after only 84 hours of embryoid body formation under serum-free conditions and can be isolated based on the expression of CD144. Endothelial differentiation of this progenitors yields a population of >95% functional endothelial cells *in vitro*. *In vivo* these cells participate at the formation of new vessels in a mouse ischemia model. Hematopoietic differentiation generates an intermediate population of >90% CD43⁺ blast colonies capable to generate myeloid and erythroid colonies. Intrafemorally injection of the hemangioblast-like progenitors in immunodeficient mice contributed to the generation of CD45⁺ human cells.

Keywords:

Hemangioblast, endothelium, hematopoietic cells, hPSC, ESCs, hiPSC, endothelial differentiation, hematopoietic differentiation.

Introduction

Since the isolation of the first human embryonic stem cells (hESCs) in 1998 (Thomson et al., 1998a), and later with the development of human induced pluripotent stem cells (hPSCs) in 2007 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), human pluripotent stem cells (hiPSCs) have been viewed with great interest by the scientific and medical community, as they are a theoretically unlimited source of any human cell type. In the case of hematopoietic cells, hPSCs are an alternative to the current bone marrow transplantation for the treatment of hematopoietic conditions such as leukemias, lymphomas, immune system problems or bone marrow deficiency syndromes (Demirci et al., 2020). In the case of endothelial cells (ECs), hPSC-derived ECs (hPSC-ECs) represent the possibility of treating cardiovascular diseases due to the EC dysfunction in patients. In the most severe cases, the obstruction of the blood vessels generates ischemia or the absence of blood perfusion in the tissues, causing tissue death and necrosis. Under these conditions, the use of hPSC-ECs could prevent and/or treat stroke, myocardial infarction or lower limb amputation by regenerating the dysfunctional endothelium and by promoting the formation of new blood vessels (Williams and Wu, 2019).

Current protocols aiming to differentiate hPSCs into hematopoietic stem cells (HSCs) seek to reproduce the embryonic development of this lineage *in vitro*. To this purpose, most of them firstly generate an endothelium with hemogenic properties followed by the induction of the hemato-endothelial transition as described *in vivo* in chick (Pardanaud et al., 1996), mouse (Garcia-Porrero et al., 1995) and humans (Galat et al., 2017; Oberlin et al., 2002; Sugimura et al., 2017; Uenishi et al., 2018). Despite the effort devoted to this task during the last 20 years, to date, none of these protocols has demonstrated a consistent production of HSCs with hematopoietic reconstitution potential similar to bone marrow HSCs (Demirci et al., 2020). It is worth to mention that, in these studies, the hPSC-derived hemogenic endothelium is usually not analyzed for its angiogenic potential. Similarly, current protocols for the generation of hPSC-ECs with angiogenic potential do not analyzed the contribution of their ECs to hematopoiesis (Goldman et al., 2009; Orlova et al., 2014; Prasain et al., 2014).

Nonetheless, ECs and hematopoietic cells may have a common progenitor, the hemangioblast, as it is suggested by their proximal close and temporal development (Murray, 1932; Sabin, 1920). The hemangioblast has been studied for years in animal models such as chick (Weng et al., 2007), zebrafish (Vogeli et al., 2006) and mouse (Huber et al., 2004). In the latter, Huber *et al.* were able to isolate cells positive for the mesodermal marker Brachyury and for the VEGF receptor 2 (VEGFR-2, CD309, KDR or Flk1) capable of generating blast colonies (BCs) with hemangioblastic properties *in vitro* (Huber et al., 2004).

A similar population was generated from mouse ESCs a couple of years earlier (Choi et al., 1998; Kennedy et al., 1997) and later, from hESCs (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007). Despite these interesting results, the concept of hemangioblast is still open to debate since cell tracing experiments in embryos have not been able to confirm the existence *in vivo* of such a bipotent progenitor (Nishikawa, 2012). This, together with the fact that the relationship between a possible hemangioblast and the hemogenic endothelium remains elusive, has made the figure of the hemangioblast fade over the last years in favor of the hemogenic endothelium. Yet, the possibility of generating an *in vitro* hemangioblast from hPSCs whose differentiation into one or another lineage could be control remains attractive for regenerative medicine and tissue engineering. The studies on hPSC differentiation into the hemangioblasts, however, aimed to demonstrate the bipotentiality of this progenitor by generating mixed populations of both lineages and often, focus on the hematopoietic lineage to the detriment of the endothelial one (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007; Zambidis et al., 2008).

In this study, we differentiated three hPSCs lines in a hemangioblast-like population characterized by the expression of CD144⁺, generated in only 84 hours under serum-free conditions. We showed this population also expressed hemangioblast markers previously described in the literature as CD309, CD34 and CD143 (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007; Zambidis et al., 2008). Differentiation of this population under endothelial or hematopoietic conditions allowed the generation of over 90% CD144⁺CD31⁺CD43⁻ cells or CD43⁺ cells, respectively. The ECs derived from this CD144⁺ population showed a clonogenic potential, *in vitro* functionalities comparable to endothelial colony forming cells (ECFCs) isolated from human umbilical cord blood and contributed to the formation of new blood vessels *in vivo* in a mouse dorsal chamber ischemic tissue injury model. Furthermore, the hemangioblast-like population showed limited hematopoietic reconstitution potential *in vivo* in immunosuppressed mice. *In vitro*, the generation of myeloid and erythroid hematopoietic colonies (CFU-GEMM, CFU-GM and BFU-E) is observed via the formation of BCs characterized by the expression of the hematopoietic markers CD43, CD45, CD41 and CD34.

Results

hPSCs differentiation towards a hemangioblast

EBs were generated independently from one hiPSC line, A29, and from two hESC lines, SA01 and H1, following an adapted version of the Lu *et al.* protocol (Lu et al., 2007). Briefly, mesoderm was induced during the first 48 hours of EB formation followed by hemangioblast specification of the mesoderm during the next 36 hours in a serum-free

medium (Figure 1A). Loss of pluripotency so as mesoderm and hemangioblast commitment were assessed by the expression of the pluripotency markers *NANOG* and *POU5F1* (*OCT3/4*), the mesoderm marker *TBXT* (*Brachyury*) and the hemangioblast marker *KDR* (CD309) at 48 and 84 hours compared to the initial hPSC (0 hours) (Figure 1B-E). Compared to hPSCs, the *POU5F1* transcripts decreased significantly at 48h and 84h for A29 (0.281 ± 0.082 and 0.063 ± 0.036 -fold change); SA01 (0.204 ± 0.114 and 0.112 ± 0.218 -fold change) and H1 (0.268 ± 0.245 and 0.131 ± 0.133 -fold change) (Figure 1B). Similarly, the expression of *NANOG* started decreasing at 48h at found its minimal level at 84h for A29 (0.146 ± 0.102 and 0.032 ± 0.028 -fold change); SA01 (0.102 ± 0.132 and 0.065 ± 0.124 -fold change) and H1 (0.272 ± 0.239 and 0.146 ± 0.149 -fold change) (Figure 1C). In contrast, *TBXT* was 6.354 ± 1.937 , 13.230 ± 3.037 and 14.420 ± 4.365 -fold change higher expressed in 48h-EBs than in hPSCs for A29, SA01 and H1 at 48h, respectively. At 84h, the levels of *TBXT* were significantly reduced for the three cells lines (0.196 ± 0.109 for A29, 0.668 ± 0.391 for SA01 and 0.744 ± 0.523 for H1) suggesting an early and transient *TBXT*⁺ mesoderm population within the 48h-EBs (Figure 1D). The *KDR* gene was only upregulated at 84h being its expression 4.368 ± 1.021 , 5.129 ± 0.741 and 4.588 ± 1.710 -fold change higher than in hPSCs for A29, SA01 and H1 (Figure 1E).

To confirm the commitment of the mesoderm into a hemangioblast-like population as suggested by the expression of *KDR*, we dissociated 84h-EBs and analyzed the expression of hemangioblast, endothelial and hematopoietic markers by flow cytometry (Figure 1H). Consistently with *KDR* messenger expression, $20.4\% \pm 12.8\%$, $20.1\% \pm 8.3\%$ and $27.1\% \pm 12.4\%$ of 84h-EBs expressed CD309 for A29, SA01 and H1, respectively. Other hemangiogenic markers, CD34 and CD143, were also present in similar proportions in EBs at 84h for A29 ($15.3\% \pm 7.1\%$ and $24.8\% \pm 14.8\%$), SA01 ($17.5\% \pm 8.2\%$ and $27.0\% \pm 13.2\%$) and H1 ($15.4\% \pm 7.9\%$ and $36.1\% \pm 13.2\%$). CD144 and CD31 were expressed in $16.5\% \pm 5.8\%$ and $9.1\% \pm 5.4\%$ of the A29-derived EBs at 84h, respectively. In contrast, the expression of the hematopoietic markers CD43 ($1.3\% \pm 1.8\%$), CD41 ($0.5\% \pm 0.7\%$) and CD45 ($0.2\% \pm 0.3\%$) in this population was negligible. SA01- and H1-derived 84h-EBs expressed CD144 ($15.4\% \pm 5.0\%$ and $17.5\% \pm 7.9\%$) and CD31 ($10.8\% \pm 5.5\%$ and $11.3\% \pm 6.9\%$) in a similar manner. As for A29, EBs derived from both hESC lines expressed very low levels of the hematopoietic markers CD43 ($1.8\% \pm 1.9\%$ for SA01 and $2.4\% \pm 2.7\%$), CD41 ($0.2\% \pm 0.6\%$ for SA01 and $0.0\% \pm 0.0\%$ for H1) and CD45 ($0.2\% \pm 0.6\%$ for SA01 and $0.0\% \pm 0.0\%$ for H1).

Isolation and characterization of a hemangioblast-like progenitor from 84h-EBs

Since CD309 has also been described as a marker of cardiogenic mesoderm (Ema et al., 2006a), we looked for another marker that could selectively isolate the hemangioblast-

like progenitors (Figure S1). As illustrated in the Figure 1G, the majority of the CD144⁺-84h-EB population also expressed the hemangioblast markers CD309, CD143 and CD34, and despite being an endothelial marker, it only expressed partially the mature endothelial marker CD31. Immunofluorescence analysis of 84h-EBs revealed CD144⁺ cells were organized in clusters from where vessel-like networks sprouted (Figure 1H).

Based on these results, we isolated the CD144⁺ and CD144⁻ fraction of 84h-EB and analyzed the expression of two master transcription factors required for endothelial and hematopoietic specification, *ETV2* and *RUNX1*. *ETV2* was slightly higher expressed in the CD144⁺ fraction of 84h-EBs compared to the non-sorted EB population for A29 (1.659 ± 0.450-fold change), SA01 (1.587 ± 0.319-fold change), and H1 (1.763 ± 0.473-fold change). In contrast, CD144⁻-EBs had a significantly reduced expression of *ETV2* for all the three cell lines (0.155 ± 0.135, 0.105 ± 0.054 and 0.335 ± 0.079-fold change for A29, SA01 and H1, respectively) (Figure 2I). Similarly, a significantly higher amount of *RUNX1* transcripts were detected in the CD144⁺ population than in the CD144⁻-EBs for A29 (5.461 ± 2.018 vs 0.264 ± 0.180-fold change), SA01 (1.659 ± 0.450 vs 0.155 ± 0.135- fold change) and H1(1.587 ± 0.319 vs 0.105 ± 0.054-fold change) (Figure 1J). These results suggest that the potential to generate both endothelial and hematopoietic cells may reside solely in CD144⁺-EBs.

CD144⁺-EBs differentiate in a homogeneous population of endothelial cells in vitro.

To test the endothelial potential of CD144⁺-EBs, CD144⁺ cells were isolated from 84h-EBs and seeded on fibronectin-coated well plates. They were passed once they reached confluency (every 7 days approximately). As shown in the figure 2A, hPSC-derived ECs exhibited a typical endothelial cobblestone morphology that was preserved along the passages. They proliferated and increased in a two-fold change for A29 or between three-fold to fourth fold for SA01 and H1 the initial number of ECs (Figure 2B). ECs proliferated *in vitro* for up to 10 to 20 days for A29, and up to 20 to 30 days for SA01 and H1 (Figure 2B). Flow cytometry analysis revealed that A29-derived ECs expressed CD309 (58.9% ± 24.1% at p1, 66.6% ± 15.9% at p2, and 65.2% ± 22.8% at p3), CD144 (96.7% ± 4.2% at p1, 97.8% ± 3.6% at p2, and 88.0% ± 15.6% at p3) and CD31 (93.7% ± 6.6% at p1, 94.6% ± 4.6% at p2, and 87.2% ± 15.3% at p3) without a significant difference among the passages. Hemangiogenic markers such as CD34 and CD143 were also expressed by A29-derived ECs at p1 (88.7% ± 11.5% and 54.0% ± 27.7%), p2 (88.1% ± 12.3% and 59.0% ± 25.9%), and p3 (91.0% ± 13.4% and 74.8% ± 19.2%) whereas the hematopoietic markers CD43 (0.8% ± 0.9% at p1, 0.4% ± 0.8% at p2, and 0.5% ± 1.0% at p3), CD41 (0.8% ± 0.8% at p1, 0.8% ± 0.9% at p2, and 0.3% ± 0.5% at p3) and CD45 (0.4% ± 0.5% at p1, 0.4% ± 0.5% at p2, and 0.7% ± 0.6% at p3) were not detected at any passage (Figure

2C). Homogeneous endothelial populations were also observed for the hESCs. 93.0% \pm 8.6% of SA01-ECs and 95.8% \pm 3.7% of H1-ECs expressed the endothelial marker CD144 at p1. These expression levels were maintained at p2 (87.9% \pm 20.1% for SA01 and 95.4% \pm 5.4% for H1), p3 (90.6% \pm 16.6% for SA01 and 97.2% \pm 2.4 for H1), p4 (97% \pm 2.9% for SA01 and 82.7% \pm 25.7 for H1) and p5 (98.3% \pm 1.2% for SA01 and 94.7% \pm 5.9 for H1) for both hESC lines. Expression of CD309 (52.6% \pm 21.0% for SA01 and 57.2% \pm 27.2 for H1), CD31 (90.2% \pm 9.6% for SA01 and 94.6% \pm 4.9 for H1), CD34 (90.0% \pm 8.5% for SA01 and 87.1% \pm 13.3 for H1), and CD143 (54.1% \pm 27.4% for SA01 and 58.0% \pm 31.9 for H1) were also observed at p1 and maintained all along the passages up to p6 without significant differences between both hESC lines. Any of the analyzed hematopoietic markers CD43, CD41 nor CD45 were expressed at any passage for both SA01 and H1 (Figure 2C). Similar results were obtained from frozen CD144⁺-EBs (data not shown). Furthermore, we detected by immunofluorescence the presence of the von Willebrand Factor (vWF) in the cytoplasm of the three hPSC-derived ECs at P2 and in the control endothelial colony forming cells (ECFCs) isolated from human cord blood (Figure 2D).

We assessed the clonogenic potential of CD144⁺-EBs by their capacity to form colonies from single seeded CD144⁺ sorted cells. After 7 days of culture, small endothelial colonies were observed by phase contrast microscopy for the three hPSC lines (Figure 2E). After some days in culture, most of the colonies became larger (Figure 2E) and at day 15, they were analyzed for the endothelial markers CD144 and CD31 by immunofluorescence to confirm their endothelial phenotype. As illustrated in the Figure 2F, they all expressed these endothelial markers independently on the hPSC line they were derived from.

Because several studies suggest that after hemangioblast differentiation into the angioblasts (embryonic endothelial progenitors), there exist already committed arterial and venous subpopulations of ECs (Herzog et al., 2005; Zhong et al., 2001), we checked for the expression of arterial (*NRP1* and *EFNB2*) and venous markers (*NRP2*, *EPHB4* and *NR2F2/COUPFTII*) in the hPSC-ECs population compared them to the human umbilical vein ECs (HUVECs). RTqPCR analysis revealed that the gene expression of *NRP1* and *EPHB4* was comparable to the HUVEC expression. However, the arterial marker *EFNB2* was expressed higher in hPSC-EC than in HUVEC (10.680 \pm 5.183, 11.800 \pm 4.349 and 8.055 \pm 4.530-fold change for A29, SA01 and H1, respectively) while the expression levels of the venous marker *NR2F2* was lower in hPSC-EC (0.303 \pm 0.165, 0.275 \pm 0.150 and 0.364 \pm 0.199-fold change for A29, SA01 and H1, respectively) (Figure 2G). Strikingly, the venous marker *NRP2* was also upregulated compared to HUVECs (4.850 \pm 0.945, 4.220 \pm 0.792 and 4.784 \pm 0.731-fold change for A29, SA01 and H1, respectively) suggesting

the existence of a mixed population of arterial and venous ECs or of an intermediate state of ECs expressing both arterial and venous markers. Since the Notch pathway has been proven to play a pivotal role in arterial differentiation, we studied next the effect of a Notch antagonist (DAPT) during CD144⁺-EBs endothelial differentiation and the overall expression of these markers compared to untreated hPSC-ECs (Figure S2). The use of DAPT during CD144⁺-EBs endothelial differentiation did not change the final proportion of ECs as evidenced by the expression of CD144 and CD31 (Figure S2). Remarkably, although the effects of the antagonist of Notch were more visible in A29 than in SA01 or H1-ECs, the expression of *EFNB2* and *NR2F2* was significantly modified in all the three cell lines compared to the non-treated hPSC-ECs. *EFNB2* expression was downregulated ($0.179 \pm 0.103a$, 0.320 ± 0.278 and 0.107 ± 0.011 -fold change for A29, SA01 and H1, respectively) while *NR2F2* was upregulated (2.982 ± 0.312 , 2.300 ± 1.054 and 1.337 ± 0.480 -fold change for A29, SA01 and H1, respectively) in DAPT-treated cells compare to the control hPSC-ECs suggesting that, under the right culture conditions, arterial/venous commitment can be guided during CD144⁺-EBs differentiation into hPSC-ECs (Figure 2H-J).

hPSC-derived ECs are functional in vitro and in vivo

ECs are key players in a wide variety of physiological processes. *In vivo*, ECs participate in the transcytosis of small molecules present in the bloodstream to the surrounding tissues. Thus, we tested the capacity of hPSC-ECs to endocytose acetylated-LDL (ac-LDL) conjugated with AlexaFluor-488 *in vitro*. After 4h hours of incubation, ac-LDL was observed in the cytoplasm of ECs derived from A29, SA01 and H1 hPSCs, and the positive control, ECFCs (Figure 3A). ECs also play an important role in the immune response by mediating the leukocyte extravasation thanks to the upregulation of adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1. We analyzed the *in vitro* activation of hPSC-ECs in response to a pro-inflammatory cytokine, TNF- α , by quantifying the expression of ICAM-1 by flow cytometry. Although, ECs expressed a basal level of ICAM-1 in the absence of TNF- α , after 16h of incubation with this cytokine, we observed an increased in the fluorescence mean of ICAM-1 suggesting an upregulation of this protein. Thus, we analyzed the percentage of ICAM-1^{High} positive ECs as shown in the Figure 3B. $90.5\% \pm 0.7\%$, $94.5\% \pm 5.7\%$ and $82.2\% \pm 18.13\%$ of ECs derived from A29, SA01 and H1, respectively, were ICAM-1^{High} positive after TNF- α treatment, while only $4\% \pm 5.7\%$, $6.8\% \pm 6.7\%$ and $4.6\% \pm 1.7\%$ of A29-, SA01- and H1-derived ECs expressed similar levels of ICAM-1 in the absence of TNF- α (Figure 3B'). A similar upregulation of ICAM-1 was observed in the control ECFCs ($13.3\% \pm 8.4\%$ vs $93.5\% \pm 7.1\%$).

In addition, we assessed the capacity of hPSC-ECs to form endothelial networks following the Matrigel-based tube formation assay and compared them to ECFCs. All the hPSC-ECs formed a network comparable to the one formed by ECFCs after 8 hours (Figure 3C, 3C' and Figure S2). No significant differences in the number of master segments ($148.4 \pm 80.5\%$ for A29-ECs, $129.5\% \pm 62.6\%$ for SA01-ECs, $188.5 \pm 46.5\%$ for H1-ECs and $73 \pm 32.5\%$ for ECFCs), meshes ($34.9 \pm 19.9\%$ for A29-ECs, $25.9\% \pm 15.42\%$ for SA01-ECs, $39.7 \pm 11.9\%$ for H1-ECs and $14.5 \pm 9.0\%$ for ECFCs) or branching interval ($112.5 \pm 33.6\%$ for A29-ECs, $128.0\% \pm 63.4\%$ for SA01-ECs, $113.5 \pm 19.3\%$ for H1-ECs and $161.6 \pm 33.8\%$ for ECFCs), were observed among the three hPSC lines and ECFCs (Figure 3C'), although the latter show a slightly lower number of these parameters.

Production of nitric oxide (NO) by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is known to play an important role in endothelial homeostasis, inflammation and vasodilation. We first checked the expression of eNOS in hPSC-ECs by flow cytometry. $72.7\% \pm 16.4\%$ of A29-ECs, $86.0\% \pm 17\%$ of SA01-ECs and $84.5\% \pm 24.5\%$ of H1-ECs expressed eNOS so as the ECFCs ($74.3\% \pm 18.9\%$) (Figure 3D). We further analyzed the endothelial production of NO by using the probe DAF-FM diacetate. This permeable molecule is de-acetylated inside the cell and reacts with NO to form fluorescent DAF-FM that can be detectable by flow cytometry. In the absence of the probe, no fluorescence was detected for any of the hPSC-ECs nor ECFCs. However, after incubation with the probe, we detected the fluorescent DAF-FM in $83.3\% \pm 12.6\%$, $91.7\% \pm 11.1\%$, $90.3\% \pm 5.0\%$ and $88.0\% \pm 9.0\%$ of ECs derived from A29, SA01, H1 and ECFCs, respectively (Figure 3D'). Slightly increase of DAF-FM fluorescence was detected when ECs were incubated with LPS (known to induce the NO production) and with a S-nitrosothiol molecule (SNAP) as a positive control. Thus, hPSC-ECs are able to produce NO probably thanks to the eNOS.

Finally, we tested the *in vivo* angiogenic potential of hPSC-ECs in a mouse dorsal chamber model where an ischemic injury has been induced. Since no apparent differences in the functionality of the three hPSC-ECs were observed *in vitro*, we performed the *in vivo* experiments with mcherry-ECs derived from the SA01 cell line. SA01-ECs survived for 4 weeks independently on the presence or not of an ischemia. Already from day 5, some mcherry SA01-ECs were observed lining the walls of perfused mice blood vessels (Figure 3E). Quantification of the blood vessels show no differences between the analyzed conditions, suggesting that even in the absence of hPSC-ECs, mice undergo angiogenesis in the presence of an ischemia. The immunofluorescent analysis *post-mortem* confirmed the survival of CD144⁺ hPSC-ECs in both ischemic and non-ischemic mice and their localization at the wall of the blood vessels. No teratomas or any other complications were observed at

the dorsal chambers. Thus, SA01-ECs survive and participate to the formation of new vessels *in vivo*.

Hematopoietic differentiation from CD144⁺-EBs

To confirm the potential of CD144⁺-EBs to generate hematopoietic cells, CD144⁺ and CD144⁻ cells were seeded on a serum-free methylcellulose enriched with hematopoietic cytokines. After 4 to 6 days, blast colonies (BCs) were observed for the three-hPSC lines only in the CD144⁺ condition (Figure 4A). Flow cytometry analysis of this population confirmed that BCs are highly hematopoietic being 91.1% ± 9.6% of A29-BCs, 90.3% ± 7.5% of SA01-BCs and 91% ± 2.6% of H1-BCs positive for the hematopoietic marker CD43 (Figure 4B). Other hematopoietic markers such as CD41 (61.6% ± 17.1%, 33.6% ± 11.0% and 56.3% ± 11.0% for A29, SA01 and H1, respectively) and CD45 (33.8% ± 15.5%, 38.5% ± 18.4% and 56.3% ± 11.0% for A29, SA01 and H1, respectively) were also expressed (Figure 4B). In addition, A29-BCs (48.6% ± 11.3%), SA01-BCs (22.1% ± 7.9%) and H1-BCs (74.3% ± 12.7%) contained a positive population for the hemangiogenic marker CD34. Cells expressing these marker also co-expressed CD143 (21.4% ± 12.1%, 11.4% ± 7.8% and 46.3% ± 2.5% of A29-, SA01- and H1-BCs, respectively) and CD43 (33.6% ± 18.6%, 21.8% ± 11.0% and 71.7% ± 11.2% of A29-, SA01- and H1-BCs, respectively) (Figure 4C). Interestingly, a decrease in the expression of the endothelial marker CD144 was observed for A29 (20.0% ± 8.0%), SA01 (8.7% ± 3.5%) and for H1 (29.3% ± 5.0%) (Figure 4B) compared to the initial purified CD144⁺-EB population. This remaining endothelial population co-expressed CD45 (18.3% ± 8.0%, 5.6% ± 1.3% and 25.0% ± 9.6% for A29, SA01 and H1, respectively) (Figure 4C) suggesting the existence of a hemato-endothelial intermediate population in BCs. Even though BCs were observed from all the three-hPSC lines, significant differences in the expression of hematopoietic and endothelial markers were observed among the hPSC-BCs. Notably, H1-BCs expressed significantly more CD34, CD143, CD45 and CD41, suggesting a difference in hematopoietic potential among the hPSC cell lines. BCs were also obtained from frozen and thawed CD144⁺-EBs without any evident change in their phenotype (data not shown).

When BCs were maintained on methylcellulose, they gave rise to myeloid and erythroid colonies CFU-GM, CFU-GEMM and BFU-E for both hiPSCs and hESCs (Figure 4D). For A29, a total of 25.2 ± 19.2 colonies was obtained per 10⁵ of CD144⁺-EBs seeded cells distributed in 84.9% ± 13.4% of CFU-GM, 0.1 ± 0.4 % of CFU-GEMM and 23.8% ± 11.4% of BFU-E. For SA01, 60.7% ± 13.6% of CFU-GM, 4.3 ± 2.4 % of CFU-GEMM and 38.2% ± 11.8% of BFU-E were obtained from a total of 83.6 ± 64.6 colonies/10⁵ CD144⁺-EBs seeded cells. Finally, for H1 a total of 86.3 ± 56.4 colonies/10⁵ CD144⁺-EBs seeded cells were counted, 79.3% ± 13.1%, 0.8 ± 0.9 % and 22.1% ± 10.3% of which corresponded

to CFU-GM, CFU-GEMM and BFU-E, respectively (Figure 4E and 4F). Since the hemoglobin subunits are differentially expressed during the embryonic, fetal and adult erythropoiesis, we next analyzed the expression of the embryonic (ϵ), fetal (γ) and adult (β) hemoglobin chains from the CFU-GEMM and BFU-E colonies by RTqPCR and we compared them to the fetal human liver transcripts. A significant higher expression of both ϵ and γ hemoglobin transcripts was observed for SA01 (1387.0 ± 637.7 and 0.130 ± 0.059 -fold change for ϵ and γ , respectively) compared to A29- (321.7 ± 262.6 and 0.021 ± 0.019 fold change) and H1-derived hematopoietic cells (34.8 ± 30.6 and 0.012 ± 0.014 fold change) (Figure 4G). In contrast, all the hPSC-derived hematopoietic colonies expressed very low levels of β hemoglobin ($6.7 \times 10^{-5} \pm 6.3 \times 10^{-6}$ -fold change for A29, $9.6 \times 10^{-4} \pm 7.3 \times 10^{-4}$ -fold change for SA01 and $4.0 \times 10^{-4} \pm 3.8 \times 10^{-4}$ -fold change for H1) (Figure 4H). The divergences among hPSC-lines may be caused by differences in the BFU-E and CFU-GEMM colony number. To compensate for this, we calculated the ratio of fetal over the embryonic hemoglobin (γ/ϵ) and the ratio of the embryonic over the adult hemoglobin (ϵ/β). Based on this, H1 showed a higher expression of the fetal over the embryonic hemoglobin ($1.9 \times 10^{-4} \pm 0.8 \times 10^{-4}$) compared to A29 ($9.9 \times 10^{-5} \pm 1.9 \times 10^{-5}$) and SA01 ($8.4 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$). No significant differences were detected for the ϵ/β ratio among the hPSC lines, expressing all of them higher levels of ϵ than β hemoglobin ($134.4 \pm 68,34$, $44.99 \pm 17,36$ and $124.0 \pm 73,16$ for A29, SA01 and H1, respectively) (Figure 4H).

Finally, to assess the *in vivo* hematopoietic reconstitution potential of hPSC-derived cells, a xenograft model of immunodeficient NSG mice was used. When H1-derived CD144⁺-EBs were intravenously injected, we did not observe any hematopoietic engraftment in the transplanted mice while human cord blood CD34⁺ cells engrafted efficiently (data not shown). To circumvent any caveat due to homing defect, we injected CD144⁺-EBs cells directly into the right femur of sublethally irradiated NSG mice by iBMT. Mice were monitored for human reconstitution by peripheral blood analysis (at 6 weeks) and mice were euthanized at 12 weeks post-transplant and BM was analyzed for human CD45 expression by FACS analysis. Presence of human DNA in the BM of the right and left femur of transplanted mice was also analyzed by Q-PCR. Six weeks after transplantation, we observed human CD45⁺ cells in the peripheral blood of mice injected with CD34⁺ cells (8.8 and 0.9%) and with H1-derived CD144⁺-EBs (between 0.5 and 3.6%). We did not detect any human CD45⁺ in the control mice injected with PBS (Figure S3 and Table S4). After 3 months of engraftment, human specific CD45 was detected by flow cytometry only in the right femur in 5 out of 5 mice injected with H1-derived CD144⁺-EBs (between 0,1% and 0,6%) (Figure 4I and Figure S3). In the mice injected with human umbilical cord blood CD34⁺ cells as control, human specific CD45 was detected in both right (10% and 9%) and left femurs (5% and 1%) (Figure 4I and

Table1). These results were further confirmed by qPCR where human DNA was detected in the right femur for CD144⁺-EBs and in the right and left femur for hCD34⁺ cells. One left femur out of five was also positive for human DNA; however, it was negative for CD45 in the flow cytometry analysis. Mice injected with PBS did not express human specific CD45 neither contained human DNA in the femurs (Figure 4I, Figure S3 and Table S4). Thus, these results suggest CD144⁺-EBs have a hematopoietic reconstitution potential only by iBMT, however, this is considerably lower compared to human CD34⁺ isolated from umbilical cord blood.

The hematopoietic potential may reside on BCs instead of CD144⁺-EBs.

During hematopoietic and endothelial differentiation, several transcription factors have been described to be pivotal for the specification of these two lineages and for the further differentiation into mature cells (Zhu and Emerson, 2002). We analyzed the expression of these factors in the main three populations obtained during the hPSC differentiation: the CD144⁺ hemangioblast-like population, the BCs and the hPSC-ECs; and compare it to their expression in human bone marrow (Figure 5A). The isoform c of *RUNX1* has been described to be specific for the hemogenic endothelium and the HSC formation. Although the transcripts of this transcription factor were detected in the CD144⁺-EB (0.011 ± 0.011-fold change for A29, 0.015 ± 0.019-fold change for SA01 and 0.023 ± 0.021-fold change for H1) and hPSC-EC populations (0.003 ± 0.003-fold change for A29, 0.004 ± 0.001-fold change for SA01 and 0.004 ± 0.002-fold change for H1), BCs expressed significantly higher levels of *RUNX1c* independently on the hPSC line (0.852 ± 0.345-fold change for A29, 0.378 ± 0.164-fold change for SA01 and 0.985 ± 0.185-fold change for H1). Consistently with the role of SCL in both endothelial and hematopoietic, *SCL* mRNAs were detected in the three cell populations for A29 (0.868 ± 0.373-fold change in CD144⁺-EB, 2.113 ± 0.982-fold change in BCs and 0.523 ± 0.144-fold change in hPSC-ECs), SA01 (0.415 ± 0.391-fold change in CD144⁺-EB, 1.850 ± 0.212-fold change in BCs and 0.583 ± 0.267-fold change in hPSC-ECs) and H1 (0.616 ± 0.648-fold change in CD144⁺-EB, 0.483 ± 0.202-fold change in BCs and 1.250 ± 0.613-fold change in hPSC-ECs), being slightly higher in BCs for A29 and SA01. Three members of the GATA transcription factor family are implied at different moments of hematopoiesis. We analyzed the expression of GATA-1, known to regulate erythropoiesis and GATA-2, necessary for endothelial and hematopoietic progenitors and HSCs specification. Hence, *GATA-1* was significantly upregulated in BCs derived from A29 (0.753 ± 0.579-fold change in BCs vs 0.017 ± 0.003-fold change in CD144⁺-EB, and 4.81x10⁻⁵ ± 0.59x10⁻⁵-fold change in hPSC-ECs), SA01 (0.596 ± 0.193-fold change in BCs vs 0.015 ± 0.002-fold change in CD144⁺-EB and 2.4x10⁻⁴ ± 0.23x10⁻⁴-fold change in hPSC-ECs) and H1 (1.433 ± 0.645-fold change in BCs vs 0.069 ± 0.029-fold change in CD144⁺-EB and 0.014 ± 0.0161-fold change in hPSC-ECs),

while *GATA-2* was expressed at similar levels in all the three populations for A29 (2.283 ± 1.120 , 2.152 ± 1.472 and 1.094 ± 0.523 -fold change in CD144⁺-EB, BCs and hPSC-ECs), SA01 (1.363 ± 0.889 , 2.812 ± 0.846 and 1.180 ± 0.909 -fold change in CD144⁺-EB, BCs and hPSC-ECs) and H1 (1.280 ± 0.668 , 2.673 ± 1.283 and 2.241 ± 0.762 -fold change in CD144⁺-EB, BCs and hPSC-ECs). Finally, we analyzed the expression of the HOX transcription factors *HOXA3* and *HOXB4* implied in endothelial and hemogenic endothelium specification, respectively. In accordance with the endothelial phenotype of CD144⁺-EBs and hPSC-ECs, A29 (7.809 ± 1.553 and 8.384 ± 1.581 -fold change), SA01 (6.154 ± 1.189 and 6.424 ± 2.216 -fold change) and H1 (5.405 ± 1.620 and 3.312 ± 0.743 -fold change) expressed *HOXA3* more in these two populations than in BCs (0.001 ± 0.002 , 0.016 ± 0.027 and 0.062 ± 0.083 -fold change for A29, SA01 and H1, respectively). Strikingly, *HOXB4* expression levels were slightly higher in hPSC-EC compared to CD144⁺-EBs and BCs for A29 (20.990 ± 12.350 vs 6.057 ± 1.570 and 3.953 ± 2.158 -fold change), SA01 (20.460 ± 6.854 vs 2.598 ± 1.492 and 2.765 ± 2.387 -fold change) and H1 (13.540 ± 8.079 vs 2.927 ± 0.759 and 0.914 ± 0.226 -fold change). To rule out the possibility that hPSC-ECs could still have a hematopoietic potential, a CFU assay was performed. None of the hPSC-ECs were able to generate hematopoietic colonies (data not shown). Thus, these results indicate that the highest hematopoietic potential may reside on BCs and confirm that hPSC-ECs do not keep properties of the hemogenic endothelium.

Discussion

In the last decade, the concept of the hemangioblast has faded in favor of the hemogenic endothelium as it generates the adult HSCs *in vivo* (De Bruijn et al., 2000; Jaffredo et al., 2000; Oberlin et al., 2002). However, the bipotent capacity of the hemangioblast, independently on the debate about its *in vivo* existence, may be a useful tool for tissue engineering since it would allow the generation of two cell lineages from the same population. In this study, we brought back the hemangioblast concept to generate pure (>90%) endothelial and hematopoietic populations *in vitro*. At the beginning of the 21st century, hPSC differentiation protocols described the bipotential properties of BCs (Kennedy et al., 2007; Lu et al., 2007). However, those protocols generated mixed populations of endothelial and hematopoietic cells. We adapted one of these serum-free protocols (Lu et al., 2007) by adding a WNT agonist during the first 48 hours of EB formation since some studies suggest that this molecule enhances mesoderm differentiation and promotes definitive hematopoiesis (Galat et al., 2018; Patsch et al., 2015). We showed by RTqPCR and flow cytometry analyses that hemangioblast markers are already expressed in 84h-EBs. Although CD309 has been described as a hemangioblast marker (Kennedy et al., 2007), it also marks the onset of the cardiogenic mesoderm (Ema et al., 2006a). In our system, CD144 was

shown to be a better marker to isolate the largest number of 84h-EB cells expressing other hemangioblast markers such as CD309, CD34 and CD143. We confirmed the enrichment of two master transcription factors for endothelial and hematopoietic differentiation only in the CD144⁺-EB population: ETV2 and RUNX1. It is not surprising that an endothelial marker can isolate a population with hemangioblast properties considering that the primitive and definitive hematopoiesis have shown to occur through a specialized population of endothelial cells (Ema et al., 2006b; Oberlin et al., 2002, 2010b).

Endothelial differentiation of the CD144⁺-EBs generated a pure (>90% CD144⁺CD31⁺) population of proliferating ECs *in vitro* from all the three hPSC lines showing functional capacities comparable to endothelial progenitors of the umbilical cord blood. Interestingly, RTqPCR analysis showed ECs expressed both arterial and venous markers. Other authors have reported mixed arterial and venous populations from the endothelial differentiation of hPSC (Gage et al., 2020). In zebrafish and chick embryos, angioblast populations are composed by arterial and vein ECs (Herzog et al., 2005; Zhong et al., 2001). However, we showed that the inhibition of the Notch pathway during CD144⁺-EBs endothelial differentiation upregulated the expression of venous markers and downregulated arterial markers consistent with the role of this signaling pathway in arterial specification (Krebs et al., 2004). These results suggest that CD144⁺-EBs may be specified into arterial or venous ECs under the right culture conditions. This feature is crucial for the possible therapeutic applications of hPSC-ECs that aim to replace the dysfunctional endothelium in patients undergoing cardiovascular diseases. In this sense, we also showed SA01-derived ECs participated at the formation of new vessels *in vivo* in a mouse dorsal chamber model that has been previously used in our laboratory to show the angiogenic potential of ECFCs (Proust et al., 2020). We evidenced that, independently on the induction or not of an ischemia, hPSC-ECs localized at the walls of the mouse blood vessels. In previous studies analyzing the contribution of hPSC-ECs to ischemic models, authors did not assess the angiogenic potential of these cells in non-ischemic conditions (Lu et al., 2007; Prasain et al., 2014). We did not observe signs of teratomas or pathological vascularization. Further studies on this model are necessary to understand if the incorporation of hPSC-ECs into the mouse blood vessels in the absence of an ischemia enhances angiogenesis or it is the result of the normal endothelium turnover.

On the other hand, the hematopoietic differentiation of CD144⁺-EBs in methylcellulose generated BCs expressing more than 90% of CD43. Only a reduced percentage of CD144⁺ cells (≈10%) were observed after 6 days of culture. Remarkably, most of the remaining CD144⁺ cells were also positive for the hematopoietic marker CD45 suggesting that CD144⁺-EBs undergo hemato-to-endothelial transition to generate BCs so as it has been evidenced

in vivo in humans. BCs give rise to myeloid and erythropoietic colonies. Hemoglobin switching is often associated with the end of the primitive hematopoiesis and the beginning of the definitive hematopoietic wave (Luo et al., 1999; Sankaran and Orkin, 2013). In our study, BFU-E and CFU-GEMM mainly expressed the ϵ and γ globins, associated with primitive and fetal hematopoiesis, and comparative low levels of β globins. However, some studies suggest that erythrocytes may mature *in vivo* and *in vitro* and acquire mature red blood cell characteristics, including expression of the β hemoglobin subunit (Luo et al., 1999; Ma et al., 2008). In any case, *in vivo* hematopoietic reconstitution is the only reliable evidence for the existence of HSCs and, therefore, for definitive hematopoiesis. Analysis of the bone marrow from immunodeficient mice injected with CD144⁺-EBs showed that these cells are able to differentiate into hematopoietic CD45⁺ cells *in vivo* but do not migrate or give good long-term reconstitution of hematopoiesis so as CD34 cells from human umbilical cord blood (Scala and Aiuti, 2019). These results are, however, consistent with previous studies where 16 day-EBs were injected into a similar mouse model and their reconstitution levels were as low as ours (Féraud et al., 2016a). To date, the only approaches that have successfully reconstituted hematopoiesis *in vivo* from hPSC-derived cells require the *in vitro* coculture of these cells with stromal cells or their genetic modification to express hematopoietic transcription factors such as HOXB4 (Gori et al., 2015; Kyba et al., 2002; Ledran et al., 2008). Interestingly, the RTqPCR analyses that we carried out of some of the transcription factors involved in definitive hematopoiesis such as RUNX1c, SCL, GATA-2 or HOXB4 (Zhu and Emerson, 2002), together with the flow cytometry analysis of hematopoietic markers at BC state, suggest that BCs may have a higher reconstitution potential than CD144⁺-EBs. It is worth to mention that, as for hPSC-ECs, *in vivo* hematopoietic experiments were performed with a single line of hPSCs. However, unlike endothelial differentiation, hematopoietic differentiation showed divergence between hPSCs. BCs derived from H1 cell line expressed significantly more CD34 than BCs derived from SA01 and A29 cell lines. This difference can be attributed to variation of maturation timing for each cell line or to a different hematopoietic potential as previously studied by our team (Féraud et al., 2016a). Future *in vivo* experiments comparing the hematopoietic reconstitution potential of BCs against CD144⁺-EBs derived from several hPSCs could help to better understand their contribution to the definitive hematopoiesis, to select the most suitable cells for therapeutic purposes, and to adapt the differentiation protocol to compensate for their differences. In addition, coculture of BCs with hPSC-ECs may improve their hematopoietic potential since ECs have been described as important niche players (Gori et al., 2015). Thus, our differentiation system may provide hematopoietic cells and niche cells, all of them derived from the same hPSC-cell line.

In conclusion, herein we presented a differentiation protocol of hPSCs for the generation of endothelial and hematopoietic cells via a hemangioblast-like population. This population is obtained after 84 hours of EB formation following CD144-based cell sorting. These cells can be frozen without altering their bipotential properties. Its endothelial and hematopoietic progeny are considered as pure since they are not mixed populations of both lineages. This protocol was shown to be reproducible since ECs and BCs were obtained independently on the hESC and hiPSC used. However, it still allowed to analyzed differences among the hPSC lines. In addition, ECs and BCs were proven to be good candidates for future cell therapy. Thus, the CD144⁺-EBs are an interesting and rapid source of endothelial and hematopoietic cells for tissue engineering.

Author contributions

A.V.V., M.T.M.G. and H.G. conceived and performed experiments. A.V.V wrote the manuscript. G.U., M.T.M.G. and H.G. secured funding, corrected the manuscript, provided expertise and feedback. A.C.P. performed the immunofluorescence experiments in the mouse dorsal chamber model. D.C. provided expertise on flow cytometry and performed cell sorting experiments. A.V.V., H.G., T.M., K.S., V.R. and C.L. conceived, performed and analyzed *in vivo* experiments of endothelial cells. A.V.V., C.Q. and F.L. conceived, performed and analyzed *in vivo* hematopoietic reconstitution.

Acknowledgements

We thank Dr. Anne Dubart-Kupperschmitt for giving us the hiPSC line A29 and to Dr. Antonietta Messina for her advices in the immunofluorescence experiments. We want also to thank Philippe Duquesnoy for his assistance in the design of RTqPCR experiments. We thank Robin Van Havermaet for his comments that greatly improved the manuscript. This work was funded by the the *Société Française d'Hématologie* and the RHU program "iLite" on "Innovations for Liver Tissue Engineering" granted by PAI2 through ANR-16-RHUS-005.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Figures

Figure 1. hPSC differentiation into a hemangioblast-like population. **A.** One hiPSC cell line (A29) and two hESC cell lines (SA01 and H1) were differentiated following embryoid body (EB) formation for 84 hours supplied with growth factors inducing mesoderm and hemangioblast specification. **B-E.** EBs were analyzed at 48h and 84h by RTqPCR and compared to the hPSCs preceding EB formation (0h) for the stem cell genes *POU5F1* (**B**) and *NANOG* (**C**), the mesoderm gene *TBXT* (**D**) and the hemangioblast gene *KDR* (**E**). **F.** At 84h, EBs were dissociated enzymatically and analyzed by flow cytometry for the expression of hemangioblast (CD309, CD34 and CD143), endothelial (CD144 and CD31) and hematopoietic markers (CD43, CD41 and CD45). n=30 for every hPSC cell line and marker. **G.** Representative flow cytometry analysis of CD143, CD309, CD34 and CD31 within the CD144⁺ population from 84h-EBs (See also Figure S1). **H.** Confocal microscope images of 84h-EBs labeled against CD144 (green), CD31 (red) and nuclei (DAPI, blue). Scale bar: 100 μ m. **I** and **J.** 84h-EBs were sorted based on the expression of CD144 and analyzed for the expression of the haemato-endothelial transcription factors *ETV2* (**I**) and *RUNX1* (**J**) by RTqPCR. n=5 for each time point and cell line. *P-value < 0.05; **P-value<0.005, ***P-value<0.0005. Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 2. Endothelial differentiation of CD144⁺-EBs. **A.** Representative phase-contrast images of hPSC-derived endothelial cells (hPSC-ECs) from passage (p) 1 to 5 derived from CD144⁺-EBs. Scale bar 500 μ m. **B.** Cumulative population doubling (CPD) indicates hPSC-ECs were highly proliferative during the first 10 days in culture. Differences among the proliferative rate were observed among the hPSC-cell lines being A29 the less proliferative. **C.** Endothelial phenotype was analyzed along the passages by flow cytometry for A29 (left), SA01 (center) and H1 (right)-derived ECs. ECs derived from the three cell lines kept a stable phenotype characterized by the expression of CD309, CD144, CD31, CD34 and CD143. The expression of hematopoietic markers was negligible at every passage. **D.** Confocal microscope images of hPSC-ECs and Endothelial colony-forming cells (ECFCs) labeled with antibodies against von Willebrand Factor (vWF, red) and CD31 (green). Nuclei stained with DAPI (blue). Scale bar 500 μ m. **E.** Representative phase-contrast images of endothelial colonies formed from single CD144⁺ cells at day 7 (left) and at day 15 (right). Scale bar 100 μ m. **F.** Confocal microscope images of endothelial colonies from the colony forming assay. hPSC-ECs were labeled against CD31 (green), CD144 (red) and with DAPI for the nuclei (blue). Scale bar 500 μ m. **G-J.** RTqPCR analysis of arterial (*NRP1* and *EFNB2*), venous genes (*NRP2*, *EPHB4* and *COUPTFI*) and the pan-endothelial gene *CDH5* (CD144) in hPSC-derived ECs compared to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (**G**) and after treatment with an antagonist of Notch (DAPT) during the EC differentiation (**H-J**) (see also Figure S2). n=5 for every condition and cell line. *P-value<0.05; **P-value<0.005 and ***P-value<0.0005. Data are represented as mean \pm SEM.

Figure 3. CD144⁺-EB-derived endothelial cells are functional in vitro and in vivo. **A.** Confocal microscopy images of hPSC-derived ECs and ECFCs after 4 hours of incubation with acetylated low-density lipoprotein (acLDL) conjugated with Alexa488 fluorochrome (green). CD31 in red and nuclei in blue (DAPI). Scale bar 100 μ m **B-B'.** Endothelial activation by TNF- α assay. Expression of ICAM-1 in hPSC-ECs and ECFCs was analyzed by flow cytometry in the absence and presence of TNF- α . As hPSC-ECs and ECFCs expressed a basal low level of ICAM-1 (B) even in the absence of pro-inflammatory cytokines, their activation was measured as the percentage of ICAM-1^{High} positive cells which were only detected after incubation with TNF- α (B'). **C-C'.** Matrigel-based tube formation assay. hPSC-ECs and ECFCs were seeded on matrigel coated dishes. After 8h, the well plates were imaged (C), and different parameters of the networks quantified. (C'). Scale bar 1000 μ m (see also Figure S2). **D-D'.** The capacity of hPSC-ECs to produce nitric oxide (NO) was related to the expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) measured by flow cytometry (D). In parallel, the probe DAF-FM diacetate was used to detect NO in hPSC-ECs and ECFCs since it becomes fluorescent (DAF-FM) in the presence of this vasodilator molecule. DAF-FM fluorescence was measured by flow cytometry in cells that were not incubated with the probe (-DAF-FM) as a negative control, in cells incubated with the probe alone (+DAF-FM) and in the presence of a S-nitrosothiol molecule (+DAF-FM +SNAP) or in cells previously stimulated with lipopolysaccharides (+DAF-FM +LPS), the two latter as positive controls. **E.** Representative confocal image of a dorsal skinfold chamber in a mouse that has undergone an ischemia and has been injected with mcherry-hPSC-EC at day 29 post-injection. The yellow square indicates a perfused blood vessel with hPSC-EC lining the wall. Vessel perfusion was observed thanks to the injection of dextran 70 kDa-FITC (green). **F.** Percentage of new blood vessels formed at day 19 post-injection. **G.** Confocal images of the dorsal chambers analyzed *post-mortem* by

immunofluorescence for the mice with and without ischemia injected with hPSC-EC and the control mouse with ischemia injected with PBS. Yellow arrows indicate human CD144⁺ EC localized at the wall of blood vessels. *P-value<0.05; **P-value<0.005 and ***P-value<0.0005. Data are represented as mean ± SEM.

Figure 4. Hematopoietic differentiation of CD144⁺-EBs. **A.** Phase contrast microscopy images of hPSC-derived blast colonies (BCs). Scale bar 100 µm. **B-C.** Flow cytometry analysis of day 6-BCs for hemangioblast (CD309; CD143 and CD34), endothelial (CD144 and CD31) and hematopoietic markers (CD43, CD45 and CD41) as simple (B) and double labelling (C). n=15 for every hPSC line and marker. **D.** Phase contrast microscopy images of myeloid, CFU-GM (image above left) and CFU-GEMM (image above right), and erythroid colonies, BFU-E (image below right), derived from BCs. Scale bar: 100 µm. **E.** Number of hematopoietic colonies per 10⁵ EB-CD144⁺ seeded cells in methylcellulose. **F.** Percentage of every type of myeloid and erythroid colony per hPSC line. **G-H.** Relative mRNA expression of the hemoglobin subunit epsilon-1 (*HBE1*), gamma-1 (*HBG1*) and beta-1 (*HBB1*) in the BFU-E and CFU-GEMM derived from every hPSC-cell line compared to mRNAs from human fetal liver. (G). Ratio of gamma/epsilon and epsilon/beta hemoglobin expression of the BFU-E and CFU-GEMM (H). **I-J.** CD144⁺-EBs derived from H1 were injected in the bone marrow of the right femur of irradiated NSG mice. CD34⁺ cells isolated from human cord blood and PBS were also injected as a positive and negative control, respectively. After 3 months, the bone marrow of both right and left femur was recovered and analyzed by flow cytometry for the expression of human specific CD45 (bottom). Isotype controls on the top image. (I). Presence of human DNA in the mouse bone marrow was assessed by qPCR with primers amplifying specifically the human gene CD45 (J). Data are represented as mean ± SEM. For the *in vivo* experiment: ND: non detected. n=2 for CD34⁺ and PBS; and n=5 for CD144⁺-EBs. For all the other histograms: n=5 for every condition and cell line. *P-value<0.05; **P-value<0.005 and ***P-value<0.0005.

Figure 5. Expression of hematopoietic and endothelial transcription factors in CD144⁺-EBs, hPSC-ECs and BCs. **A.** Analysis of the mRNA expression of the transcription factors *RUNX1c*, *SCL*, *GATA1*, *GATA 2*, *HOXA3* and *HOXB4*. **B.** Scheme summarizing the three populations characterized during the hPSC-differentiation: a hemangioblast-like progenitor that can efficiently differentiate into endothelial and hematopoietic cells. These latter through the formation of BCs. Data are represented as mean ± SEM. n=5 for every condition and cell line. *P-value<0.05; **P-value<0.005 and ***P-value<0.0005.

Figure 1

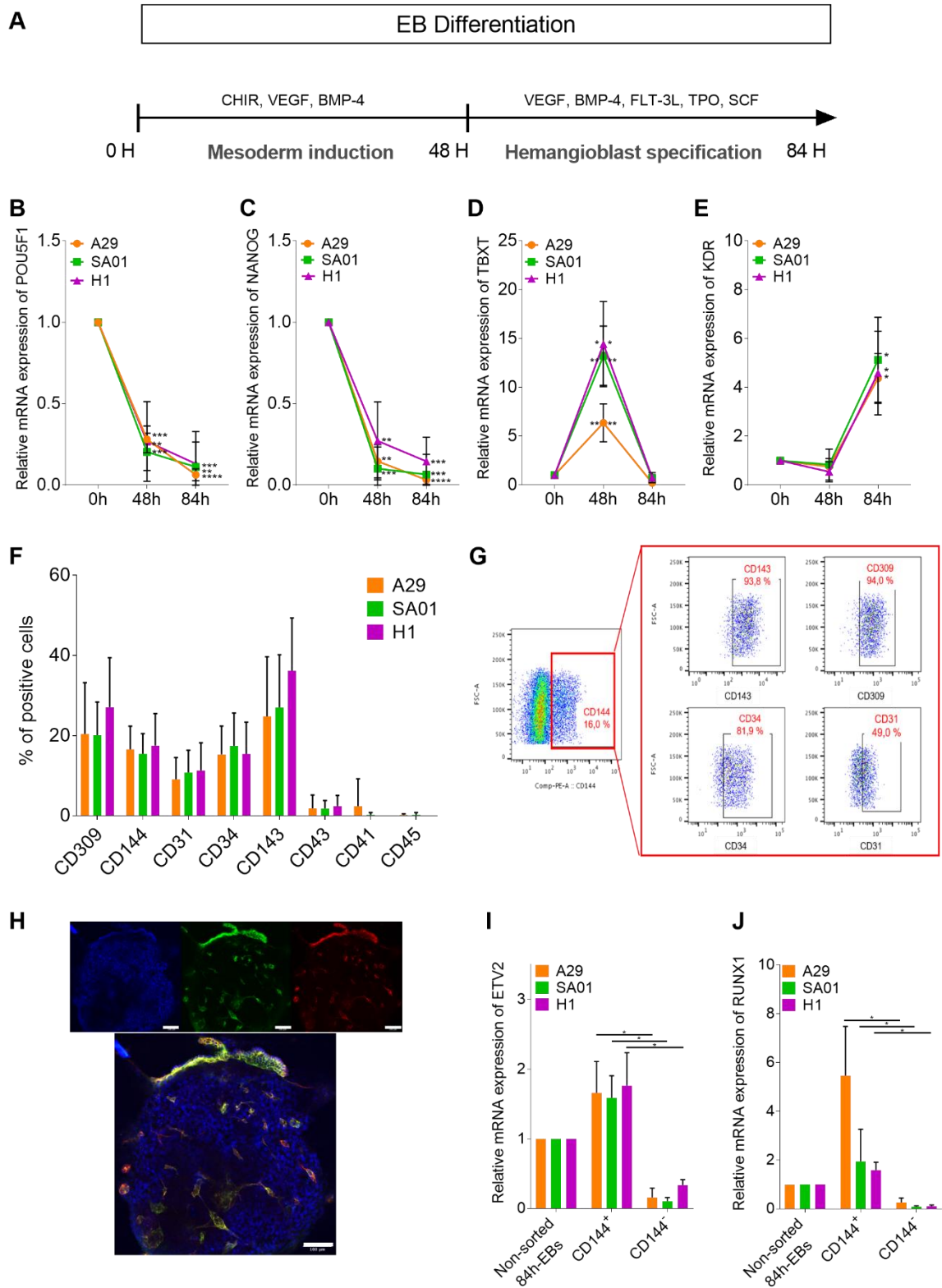


Figure 2

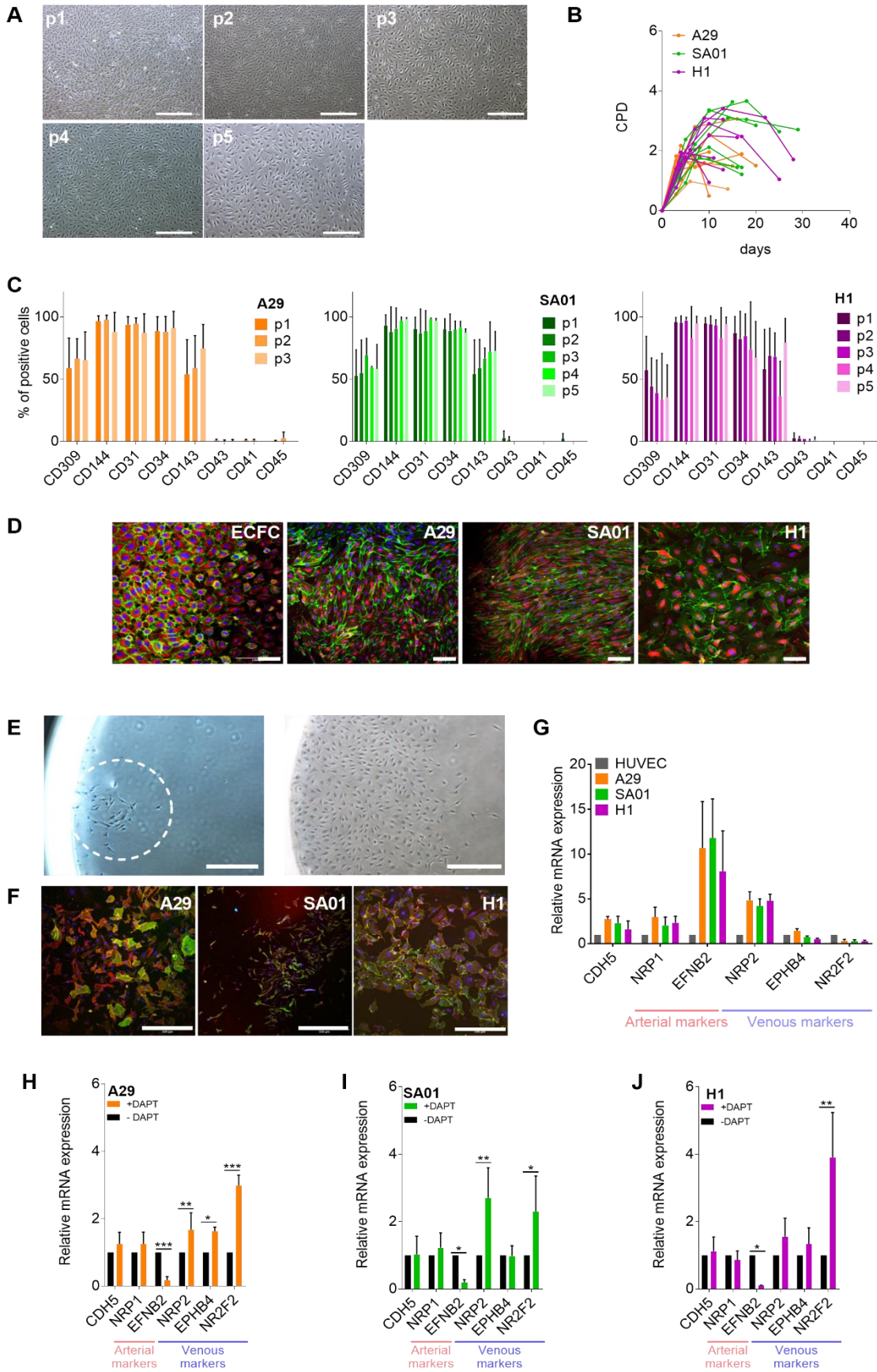


Figure 3

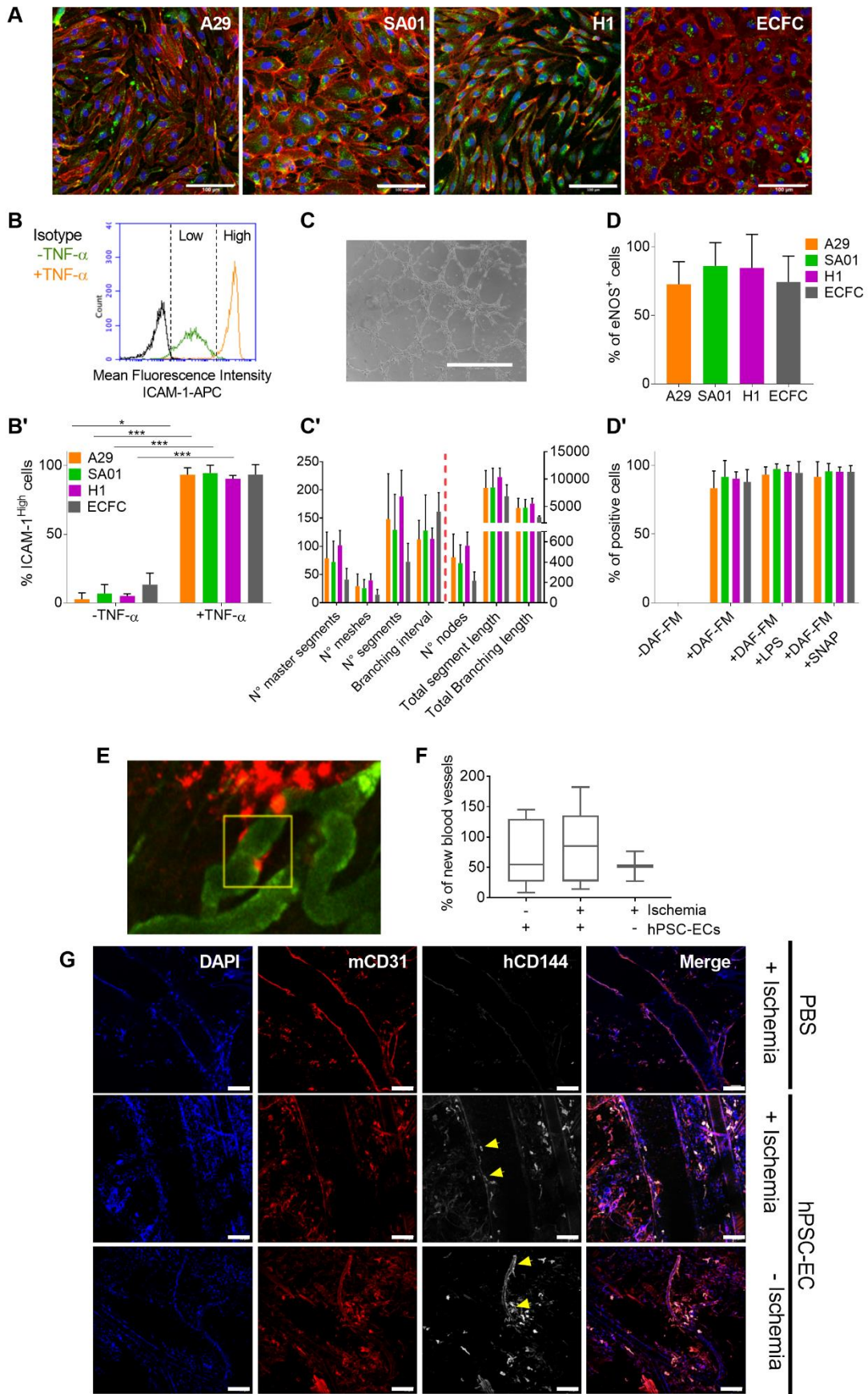


Figure 4

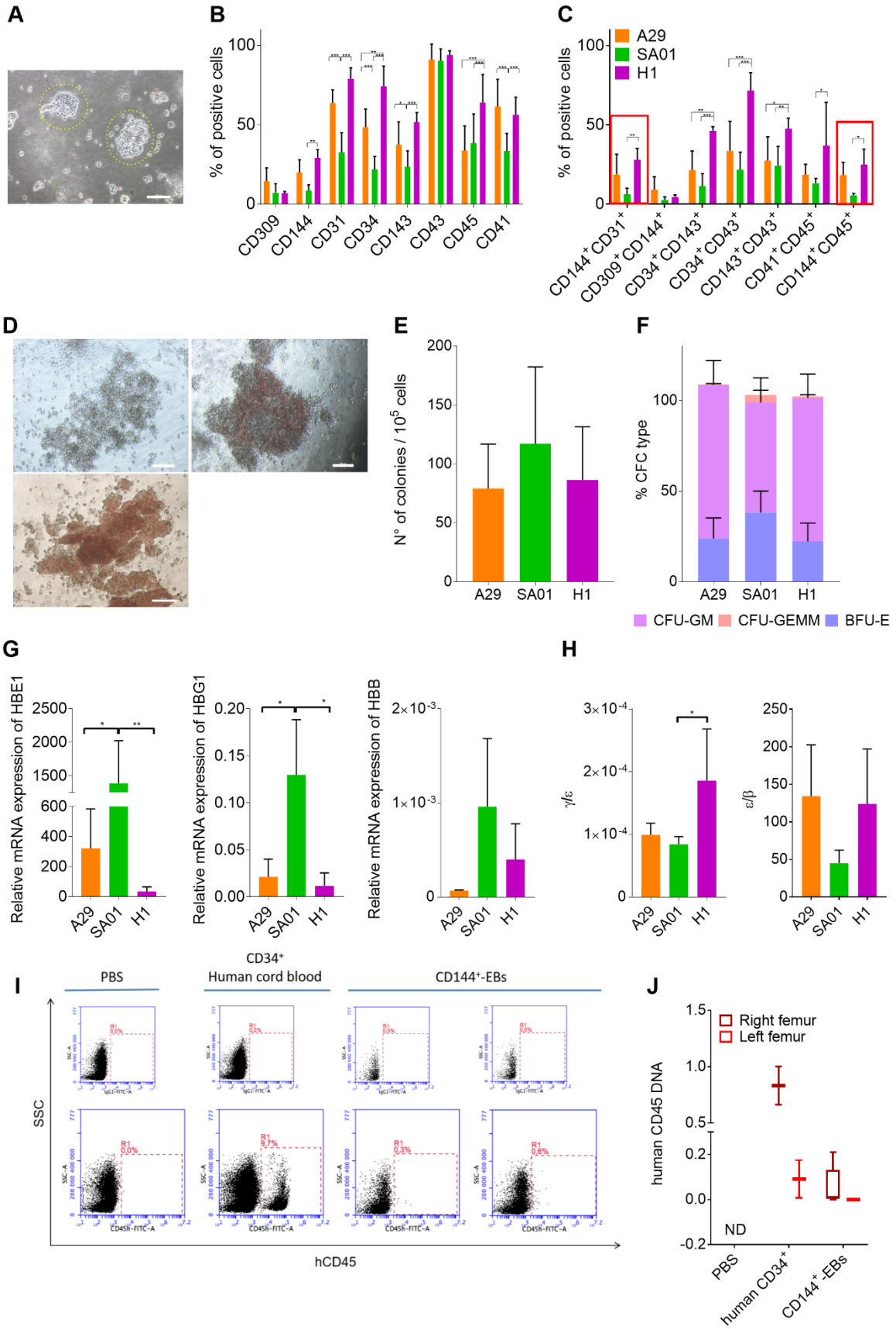
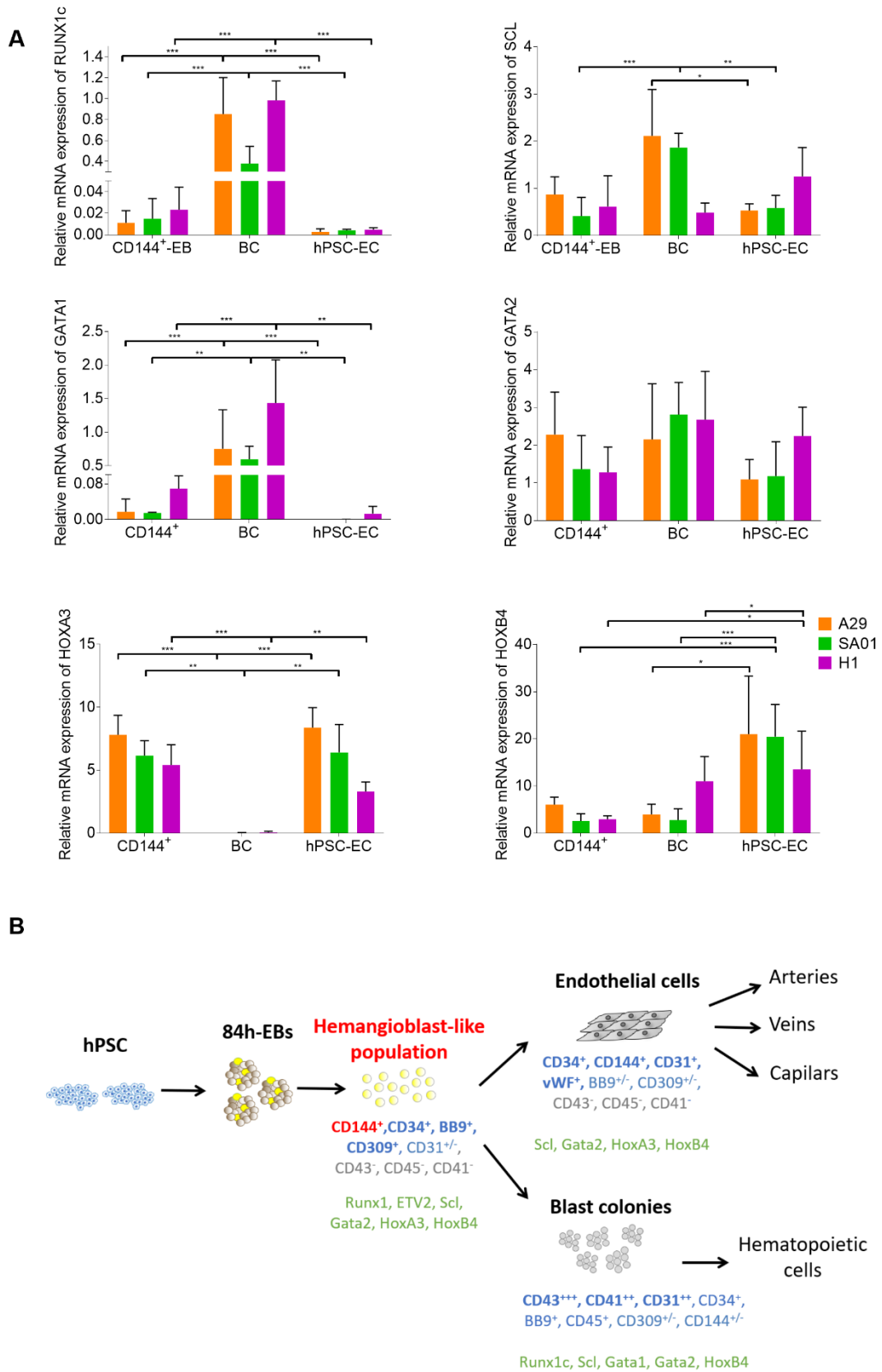


Figure 5



Lead Contact and Materials Availability

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Alejandra Vargas Valderrama (alejandra.vargas-valderrama@inserm.fr).

All unique/stable reagents generated in this study are available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

Experimental Model and Subject Details

Human Pluripotent Stem Cells

The two hESCs used in this study, SA01 (Cellartis AB, Sweden) and H1 (WiCell Research Institute, USA) were provided by the INSERM cell bank « Embryonic Human Stem Cells » (U935) according to the agreement n° RE14-007R of the French Biomedicine agency. The hiPSCs line A29 has been derived, characterized and kindly provided by the team INSERM U1193 of Dr. Dubart-Kupperschmitt (Steichen et al., 2014). All the hPSCs were cultured on a mitomycin-treated mouse embryonic fibroblast (MEF) cells in Knockout DMEM medium (Gibco) supplemented with 20% Knockout serum replacement (Gibco), 1% penicillin/streptomycin, 1 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 0.1 mM β -Mercaptoethanol (all from Gibco) and 5 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF, Miltenyi) at 37°C et 5% CO₂. The medium was daily replaced by fresh medium and cells were passaged weekly enzymatically by using collagenase type IV at 1 mg/mL (Gibco). hESCs were used between passages 52 and 100 for SA01, and between passages 80 and 110 for H1. The hiPSC line was used between passage 40 and 70. hPSCs were verified by flow cytometry for the pluripotency markers SSEA-3, SSEA-4, and TRA-1-81 and by RTqPCR for the mRNA expression of *NANOG* and *POU5F1*. Genomic integrity was assessed by karyotype analysis and mycoplasma detection was performed monthly.

hPSC differentiation towards an hemangiogenic progenitor

For embryoid body (EB) formation, hPSC were passed as previously described and small cell clumps were obtained by further mechanical dissociation and cultured in Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium (Sigma-Aldrich) supplied with 1% streptomycin, 1 mM de L-glutamine, 50 ng/mL vascular endothelial growth factor A (VEGF-A₁₆₅) (Peprotech), 50 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) (Peprotech), and 6 μ M CHIR99021 (StemCell Technologies) on low-attachment culture plates (NUNC, ThermoFisher) at a cellular density equivalent to 3.5 x10⁴ cells/ml. After 48h, the EB medium was entirely replaced by Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium supplied

with 1% streptomycin, 1 mM de L-glutamine, 50 ng/mL VEGF-A₁₆₅, 50 ng/mL BMP-4, 20 ng/mL stem cell factor (SCF), 20 ng/mL Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) and 20 ng/mL Thrombopoietin (TPO) (all from Peprotech). At 84h of the EB differentiation, the EBs were recovered and dissociated enzymatically with Accutase (Corning). CD144⁺-cells were isolated by magnetic-based cell sorting (MACS) using microbeads conjugated with anti-hCD144 antibodies (Miltenyi) on MS sorting columns (Miltenyi) according to the manufacturer's instructions and were further cultured under endothelial or hematopoietic condition, or frozen in FBS supplied with 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

Endothelial differentiation and Hematopoietic differentiation

CD144⁺ and CD144⁻ sorted cells from 84h-EBs were plated on fibronectin (Sigma-Aldrich) pre-coated well plates at a density of 15000 cells/cm² in STEMdiff™ APEL™2 Medium (StemCell Technologies) supplied with with 5% FBS (Lonza), 1 mM de L-glutamine, 50 ng/mL VEGF-A₁₆₅ and 10 ng/mL bFGF. Endothelial cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ with media change every other day. Confluent endothelial cells were passaged enzymatically with Accutase and plated at 15000 cells/cm² on fresh fibronectin pre-coated well plates. In parallel, 50000 cells/mL were cultured in a serum-free enriched methylcellulose (StemCell Technologies) supplied with Stemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium containing 1 mM L-glutamine, 50 ng/mL VEGF-A₁₆₅, 50 ng/mL BMP-4, 50 ng/mL TPO, 50 ng/mL Flt-3L, 20 ng/mL, bFGF and 3 units/mL Erythropoietin (EPO) on low-attachment culture plates. Six days later, some of the blast colonies were recovered and analyzed by flow cytometry and RTqPCR. At day 14 of culture, hematopoietic colonies, CFU-GM, CFU-GEMM and BFU-E, were counted.

Isolation of endothelial colony forming cells (ECFC) and CD34⁺ cells from umbilical cord blood

Human umbilical cord blood (UCB) from different healthy full-term newborns were collected and handled in compliance with the declaration of Helsinki by the Cord Blood Bank of St Louis Hospital (Paris, France) and assigned to our laboratory in agreement to the authorization n° PPC51 of the French Biomedicine agency. Mononuclear cells were isolated from the UCB following a density gradient centrifugation on Pancoll (Dutscher). For the isolation of endothelial colony forming cells (ECFC), mononuclear cells were resuspended in EGM-2-MV (Lonza) and seeded on well plates previously coated with 50 µg/ml of collagen type I rat tail (Corning). Cells were kept in culture at 37°C and 5% CO₂ and medium was replaced daily during the first 7 days and from day 7 on, every other day. ECFCs are passaged enzymatically with the Accutase and plated on new well plates at a cellular density

of 10000 cells/cm². For the isolation of CD34⁺ cells, mononuclear cells were further sorted by magnetic-based cell sorting (MACS) using microbeads conjugated with anti-hCD34 antibodies (Miltenyi) on MS sorting columns (Miltenyi) according to the manufacturer's instructions. Once isolated, the CD34 phenotype was confirmed by flow cytometry and cells were stored at -180°C in FBS supplied with 10% DMSO until they were required for the *in vivo* experiments.

***In vivo* experiments**

The animal experiments herein presented were approved by the Ethical Committee C2EA-26 “Comité d'éthique en expérimentation animale de l'IRCIV”, ceea26@gmail.com officially registered with the French ministry of research, under the project number: 18028/2016100416362036 for the dorsal chamber experiments and 18028-2016100416362036v5 for the hematopoietic reconstitution experiments.

For the ischemic tissue injury model on a mouse dorsal chamber, 8-week-old male nude mice were obtained also from Animal Core Facility of Gustave Roussy Institute. The surgical procedure was previously described in (Rouffiac et al., 2020). Briefly, anesthetized mice were (1.5% isoflurane in 1.5–2 L/min air flow) injected subcutaneously with 100 µL of Lidocaine® (21.33 mg/mL) in the scapular region before skin incision. A local antiseptic solution (Betadine®) was also applied. A skinfold was stretched keeping the dorsal median line at the top. The two faces of the dorsal chamber were positioned on each side of the skinfold and secured by sutures between two adjacent orifices. To limit the inflammatory reaction, a dermocorticoid ointment was spread on the side where the skin had not been removed. On the opposite side, the entire epidermis and upper dermis within the optical window was removed as close as possible to the edges. 6 nude mice were injected intradermally on the dorsal chamber with 3x10⁵ mcherry SA01-derived ECs resuspended in 20 µL of PBS. On 9 nude mice, an ischemia was induced by thermal cauterization of a macrovessel 15 minutes before cell injection to allow sufficient heat dissipation; 6 of them were further injected with 3x10⁵ mcherry SA01-derived ECs resuspended in 20 µL of PBS and 3 of them with 20 µL of PBS, all of them close to the cauterized blood vessels. The surgical procedure was ended by closing the dorsal chamber with glass coverslips maintained by rings sealed under mechanical pressure. Anesthetic gas was switched off, and Tolfedine (4 mg/kg) was subcutaneously injected before the animal woke. Mice recovered inside cages enriched with a cocoon and diet gel to facilitate food access while the animals regained their initial mobility. Mice were maintained for a maximum of 30 days after dorsal chamber implantation. Twice a week, mice were observed under light microscopy. Acquisitions are made under general anesthesia with isoflurane (1.5% isoflurane / air flow rate 1.5 L/min) as indicated in the methods details. Mice were injected with 70kDa-FITC

intravenously in the retro-orbital sinus (100 μ L). At day 29, after the last acquisitions, mice were euthanatized, and the dorsal chambers were recovered to perform further immunofluorescence analysis as described in methods details.

For the hematopoietic reconstitution, NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ mice (NSG) were bred and maintained under specific pathogen free conditions with acidified water (pH 5.3) at the Animal Core Facility of Gustave Roussy Institute (n° E-94-076-11). Six to eight-week-old mice were irradiated at 2.5 Gy with an IBL637 gamma irradiator containing a Cs-137 source. After 24 hours, mice were subjected to isoflurane anesthesia and submitted to intra-bone marrow transplantation (IBMT) with 4×10^5 CD144⁺-EBs in 15 μ L PBS. Peripheral blood was obtained from the retro-orbital sinus of anesthetized mice and analyzed at 6 weeks post-transplant for human cells by flow cytometry analysis as described below. Mice were euthanatized at 12 weeks post-transplant. Bone marrow (BM) cells were collected and stained with FITC-conjugated mouse anti-human CD45 (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. Genomic DNA was extracted from the bone marrow of the right and left femur and analyzed by quantitative PCR (Q-PCR) to determine the presence of human cells using human specific primers for the human *CD45* gene (Table S2).

Methods details

Flow cytometry

hPSC single-cell suspensions were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies against the human pluripotency markers SSEA-3, SSEA-4 and TRA-1-81 (BD Sciences). Dissociated EBs and single-cell suspension of hPSC-ECs, BCs and ECFCs were incubated with fluorochrome-conjugated mouse antibodies recognizing the human hemangiogenic markers CD34 (BD Sciences), CD143 (Miltenyi), and CD309 (Miltenyi); the endothelial markers CD144 and CD31 (Miltenyi); and the hematopoietic markers CD43, CD45, and CD41a (BD Sciences). For the intracytoplasmic detection of eNOS in hPSC-ECs and ECFCs, single cell suspensions were treated firstly with the FIX & PERM Cell Permeabilization Kit (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions and incubated with mouse PE-conjugated antibody against human eNOS. Blood samples from the NSG mice of the hematopoietic reconstitution were treated with the ACK lysis buffer (Gibco) according to the manufacturer instructions to lyse red blood cells. Lysed blood samples and bone marrow mouse samples were further incubated with specific anti-human CD45 (BD Sciences). Cells were incubated with selected antibodies for 30 minutes on ice, washed and resuspended in PBS containing 5% FBS and 7-aminoactinomycin D (7AAD; 1 μ g/mL) (Sigma Aldrich) to exclude dead cells. Isotypes matched FITC-, PE- and APC-conjugated irrelevant mAbs (BD Pharmingen, Miltenyi and Beckman Coulter). Data

acquisition was performed by the BD Accuri C6 cytometer and the analysis were carried out with the BD Accuri C6 Plus Software (BD Biosciences).

Immunofluorescence

hPSC-ECs at passage 1 and ECFCs at passage 4 were seeded on Lab-Tek chamber slides (ThermoFisher) and cultured in endothelial media (APEL™2 Medium or EGM-2-MV for hPSC-ECs and ECFCs, respectively) at 37°C and 5% CO₂. Once confluence was reached, ECs and ECFCs were fixed with PBS 4% *paraformaldehyde* (PFA) (Electron Microscopy Sciences). Fixed hPSC-ECs and ECFCs were further permeabilized with PBS 0,1% Triton and blocked with PBS 5% BSA. Primary antibodies against CD31 (R&D systems), CD144 (R&D systems) or vWF (Dako) diluted on PBS 5% BSA were incubated with the hPSC-ECs and ECFCs during 1h at room temperature. Then, ECs were washed and incubated with the secondary antibodies conjugated with AlexaFluor-488 or AlexaFluor-546 during 1h at room temperature. As for ECs, 84h-EBs previously adhered on a fibronectin-coated Lab-Tek were fixed, permeabilized and blocked. The incubation with primary antibodies anti-CD31 and anti-CD144 was performed overnight at 4°C. Secondary antibodies were incubated during 4h at room temperature.

In the case of the dorsal skinfold chambers, they were fixed with 4% PFA for 4 hours. The epidermis still present at one side of the chamber was gently separated from the dermis. The immunofluorescence was performed on the dermis by adapting the previous protocol. Briefly, samples were permeabilized for two hours at room temperature, primary antibodies anti-human CD144 (R&D systems) and anti-mouse CD31 (BD pharmlingen) were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies conjugated with fluorochromes 546 and 633 were incubated during 2 hours at room temperature.

For all the samples, after three washes with PBS, they were incubated with DAPI (Life technologies) for 1 minute at room temperature. Finally, the excess of DAPI was rinsed and samples were mounted with Glycergel Mounting Medium (Dako). To verify the specificity of the conjugated secondary antibodies, control samples were treated following the aforementioned conditions but were only incubated in the presence of secondary antibodies conjugated with the fluorochromes. Immunofluorescence images were acquired with the confocal microscope Leica TCS SP5 (Leica) and analyzed with software ImageJ.

Endothelial colony forming assay

Dissociated EBs were incubated with fluorochrome-conjugated mouse antibody anti-human CD144 (Miltenyi, clone REA199) for 30 minutes at 4°C. Cells were washed and resuspended in PBS containing 5% FBS and 7AAD. 7AAD⁻CD144⁺ cells were sorted and plated at 1 cell/well on fibronectin pre-coated 96-well plates under endothelial conditions by

the BD FACS Aria Sorter (BD Biosciences). Endothelial medium was replaced twice per week. After 15 days in culture at 37°C and 5% CO₂, ECs colonies were counted and fixed with 4% PFA. *The expression of the endothelial markers CD31 and CD144 was further analyzed by immunofluorescence as previously described.*

mCherry transduction of hPSC-ECs

For non-invasive cell tracking in the ischemic tissue injury model on a mouse dorsal chamber, SA01-derived ECs were previously transduced with a lentiviral vector carrying the red fluorescence protein mCherry under the control of a CMV promoter (LV-CMV-mCherry-Puro, SignaGen Laboratories). 24 hours after seeding CD144⁺-EBs under endothelial conditions, cells were incubated with the lentiviral vector at 10 multiplicity of infection (MOI) for 12 hours at 37°C and 5% CO₂ in the presence of 8 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich). After incubation, medium was replaced with fresh endothelial medium and SA01-ECs were recovered once they reached confluency. The transduction efficiency and the endothelial phenotype was evaluated by flow cytometry analysis. Only SA01-ECs having more than 80% mcherry⁺ cells were used for *in vivo* experiments.

Quantification of the blood vessels at the dorsal skinfold chamber

Treatment of macroscopy images of the dorsal chambers was performed with the software ImageJ. PBS controls were used to set up the parameters for background subtraction and blood vessel quantification. The plugin Tubeness (Sato et al., 1998) followed by Analyze skeletons 2D/3D (Arganda-Carreras et al., 2010) were used on all the images following the parameters selected for the control. The density of blood vessels was reported as the total branch length measured in the dorsal chamber for day 5 and day 19 post-injection. For every mouse, we calculated the change in percentage of the total branch length of day 19 compared to day 5.

LDL uptake assay

Confluent hPSC-ECs at passage 2 and ECFCs at passage 5 were incubated with endothelial media supplied with 15 µg/mL of acetylated-LDL conjugated with AF488 (Invitrogen) for 4 hours at 37°C and 5% CO₂. After incubation, endothelial media was removed. ECs were rinsed with PBS and fixed with 4% PFA in PBS for further immunofluorescence analysis.

Endothelial activation by TNF-α

Confluent hPSC-ECs at passage 2 and ECFCs at passage 5 were incubated with endothelial media supplied with 10 ng/mL of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) (Miltenyi)

overnight at 37°C and 5% CO₂. Next day, TNF- α -treated and non-treated ECs were recovered after treatment with Accutase, washed and incubated with anti-hICAM-1 antibodies conjugated with allophycocyanin (APC) at 4°C. After 30 min of incubation, cells were washed and resuspended in PBS containing 5% FBS and 7-aminoactinomycin D and analyzed by flow cytometry.

Nitric Oxide (NO) detection

Confluent hPSC-ECs at passage 2 and ECFCs at passage 4 were incubated with endothelial media supplied with 0,5% FBS and 1 μ M DAF-FM-2A (Invitrogen) during 1h at 37°C and 5% CO₂. Positive controls were stimulated with 100 ng/mL LPS during the night preceding the experience. After incubation with the probe, ECs are washed and resuspended in PBS 5% FBS. Fluorescence acquisition was carried out with the BD Accuri C6 flow cytometer and analyzed with the BD Accuri C6 Plus Software.

Matrigel-based tube formation assay

Confluent hPSC-ECs at passage 2 were detached from the culture plates with Accutase and seeded on a layer of 9 mg/mL Matrigel (Corning) at 20000 cells/cm² with endothelial media for 24h at 37°C and 5% CO₂. ECs were imaged every two hours with an inverted phase contrast microscope (Leica) and images were analyzed with the Image J tool Angiogenesis analyzer (Carpentier G. Contribution: angiogenesis analyzer. ImageJ News. 2012;5). Analysis herein shown correspond to quantification of 8h-images since we found the maximum number of networks at this time. At 24h, cells were fixed with PBS 4%PFA and the expression of the endothelial marker CD31 was analyzed by immunofluorescence.

RT and qPCR

The total mRNA of hPSCs, 48h-EBs and 84h-EBs, CD144⁺-EBs, hPSC-ECs, BCs and BFU-E+CFU-GEMM was extracted with the RNeasy Micro Kit (Qiagen) for an equivalent of 500000 cells and quantified with the NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription to obtain the first strand of cDNA was further performed by using the SuperScript III kit (Invitrogen) with random hexamers. Three replicates per sample, each corresponding to 9 ng of cDNA, were analyzed for differential gene expression by using the Mx3000P qPCR thermocycler system (Agilent) with Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (Agilent) for most of the genes and with TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems) for arterial/vein endothelial genes as shown in supplementary tables S1 and S2. mRNA extraction and RTqPCR conditions were set according to the manufacturer's instructions. Target gene expression was normalized with the endogenous RNA control human 18S and ERCC3 according to the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Fold-change expression was calculated with respect to the initial hPSCs of the same

differentiation experiment for *NANOG*, *POU5F1*, *TBXT* and *KDR*. *ETV2* and *RUNX1* fold-change expression in CD144⁺- and CD144⁻-EBs were calculated with respect to the 84h-EBs they are derived from. For arterial/venous phenotype, expression is relative to HUVEC (at passage 1) gene expression. Finally, for the hematopoietic genes, mRNA expression was compared to total human bone marrow gene expression.

For the mouse bone marrow samples from the hematopoietic reconstitution experiments, qPCR was also used to quantify the presence of human DNA. DNA was extracted according to the instructions of the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) and quantified with the NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Three replicates per sample, each corresponding to 36 ng of DNA, were analyzed for the presence of human CD45 DNA and normalized based on the mouse actin gene.

Statistics analysis

Sample sizes were determined by the nature of the experiment and variability of the output, not by a statistical method. Statistical analysis was performed in PRISM software. Data obtained from multiple experiments were reported as mean ± standard error. n=5 in most all the experiments unless stated differently. Where appropriate, either a paired parametric t-test or a one-way ANOVA with a Tukey post-hoc test. Differences were considered significant when *p < 0.05, **p < 0.005, or ***p < 0.0005.

Supplementary data

Table S1. Related to STAR methods. Oligonucleotides used in RTqPCR experiments for EBs and BC.

	Forward	Reverse
RUNX1 (a+b+c)	TCGGCTGAGCTGAGAAATG	GTGATGGTCAGAGTGAAGCTTTT
RUNX1c	GTGCATTTTCAGGAGGAAGC	TCGTGGACGTCTCTAGAAGGA
TBXT	GCTCACCAATGAGATGATCG	AGACACGTTACCTTCAGCA
KDR	GCTCAAGACAGGAAGACCAAG	GGTGCCACACGCTCTAGG
ETV2	GATGCCCCAAAATAACCAC	GGCTGTTGCCAGTCCAAC
GATA1	CCCTGTCCCAATAGTGCT	CCTGCCCGTTTACTGACAAT
GATA2	AAGGCTCGTTCCTGTTTCTGAGA	GGCATTGCACAGGTAGTGG
NANOG	CCTATGCCTGTGATTTGT	GTTGTTTGCCTTTGGGAC
POU5F1	CGAAAGAGAAAGCGAACCAG	TGAGAAAGGAGACCCAGCAC
TAL1	AATCGAGTGAAGAGGAGACCTTC	CTCATTCTTGCTGAGCTTCTTGT
18S	GATATGCTCATGTGGTGTTG	AATCTTCTTCAGTCGCTCCA
ERCC3	GCTGGTCTTGAAGCACAACA	GGATGCAACGTTTCTGGAGT
HBB	GGCAAGGTGAACGTGGATGAA	CAAAGTGATGGGCCAGCACAC
HBE1	GGAGCAAGATGAATGTGGAAGAGG	GCCAAAGTGAGTAGCCAGAATAATC
HBG	GGGCAAGGTGAATGTGGAAGAT	CGAAATGGATTGCCAAAACGG
HOXB4	CTGGATGCGCAAAGTTCAC	CGTGTCAGGTAGCGGTTGTA
HOXA3	CACAAAGCAGAAAACCAGCA	ACAGGTAGCGGTTGAAGTGG

Table S2. Related to STAR methods. Oligonucleotides used in qPCR for the detection of human DNA.

	Forward	Reverse
hCD45	ACTTTCCCATCTGATCTCTGATTC	CTGGATTTATCATCTGGGTTTGT
Mouse actine	GTACCACAGGCATTGTGATG	GCAACATAGCACAGCTTCTC

Table S3. Related to STAR methods. Oligonucleotides used in RTqPCR experiments in artery and vein differentiation.

	Source	Identifier
EFNB2	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs00187950_m1
NR2F2	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs00819630_m1
EPHB4	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs00174752_m1
NRP1	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs00826128_m1
NRP2	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs00187290_m1
18S	ThermoFisher Scientific	Assay ID: Hs99999901_s1

Table S4. Hematopoietic reconstitution in NOG mice. Percentage of human CD45 positive cells in the peripheral blood (PB) six weeks post-transplantation and in the bone marrow (BM) of immunodeficient mice after three months post-transplantation with human CD34 cells from umbilical cord blood, with CD144⁺-EB and with PBS. Right femur (RF) and left femur (LF) BMs were analyzed separately. Bone marrow DNA was also analyzed by qPCR to confirm the presence of human cells in both right and left femurs. The human DNA levels are expressed in fold-change with respect to the mouse 1 injected with human CD34 cells. ND: non detected.

Sample		Human CD34		CD144 ⁺ -EB					PBS	
		#1	#2	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2
%hCD45 in the PB		8.8%	0.9%	1.5%	0.6%	0.5%	0.9%	3.6%	0%	0%
%hCD45 in the BM	RF	10%	9%	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.6%	0%	0%
	LF	5%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Human DNA Fold change	RF	1	0.662	0.007	0.210	0.013	0.0004	0.051	ND	ND
	LF	0.175	0.008	ND	ND	0.0002	ND	ND	ND	ND

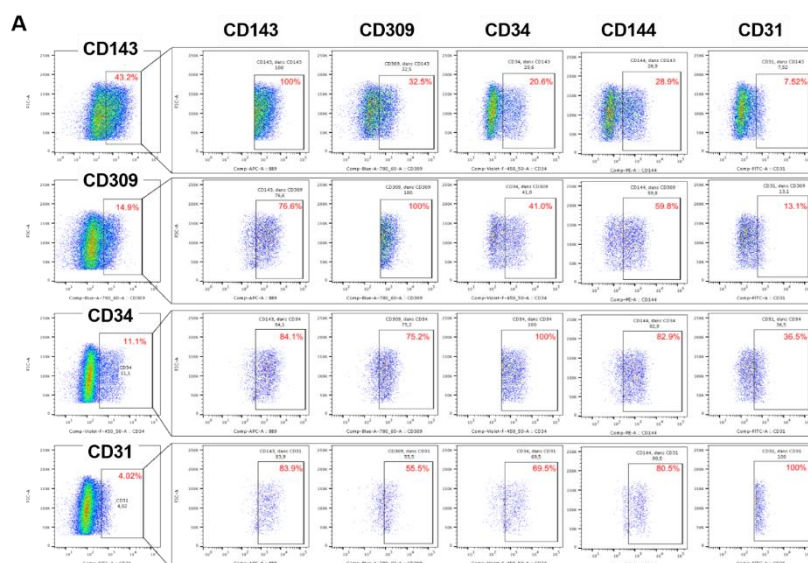


Figure S1. Representative image of the flow cytometry analysis of 84h-EBs. In order to determine which marker could isolate a homogeneous hemangioblast-like population giving rise only to pure populations (>90%) of endothelial and hematopoietic cells, we analyzed the expression of all the markers in the selected CD144, CD143, CD309, CD34 and CD31 positive populations. Only CD144 (Figure 1) and CD34 populations co-expressed in more of than 70% of the cells all the other hemangioblast markers.

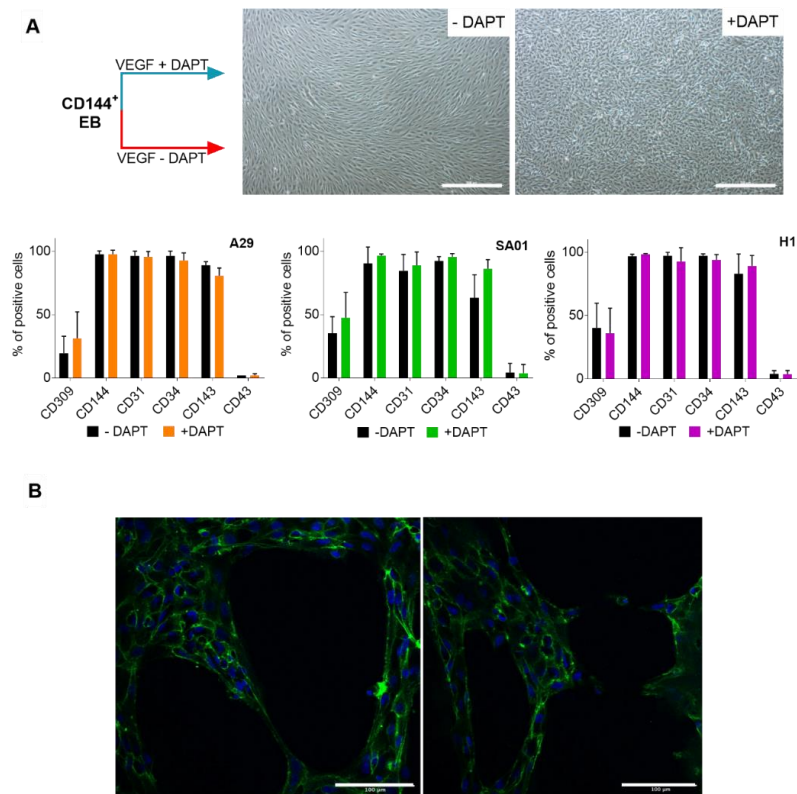


Figure S2. hPSC-ECs differentiation and functionality. **A.** Scheme of the CD144⁺-EB endothelial differentiation in the presence or absence of DAPT and representative phase-contrast images of hPSC-ECs after endothelial differentiation and DAPT treatment. Scale Bar 500 μ m. Below: Flow cytometry analysis of the endothelial phenotype of hPSC-ECs in the presence and absence of DAPT. **B.** Confocal immunofluorescent image of the matrigel network formed by hPSC-ECs. CD31 in green and DAPI in blue. Scale Bar: 100 μ m.

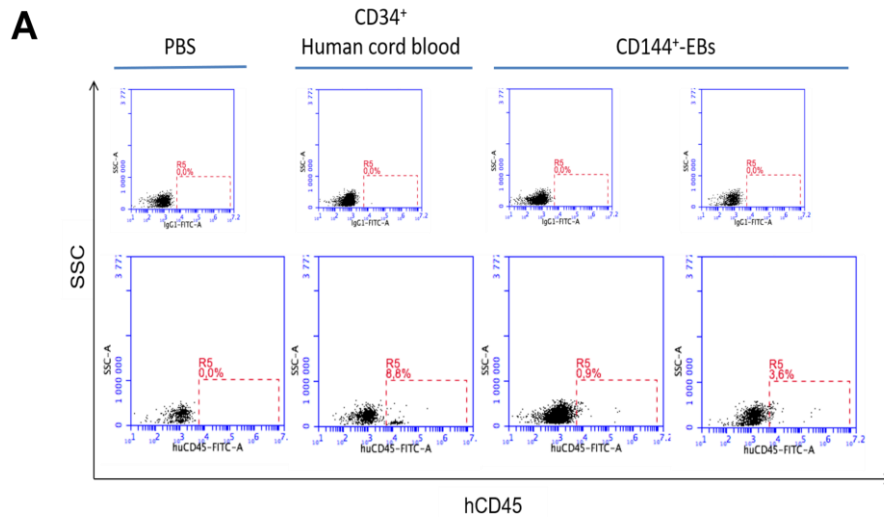


Figure S3. Representative flow cytometry analysis of mice peripheral blood of the hematopoietic reconstitution experiments. Immunodeficient NSG mice were injected by iBMT with H1-derived CD144⁺-EBs human, with CD34 cells isolated from umbilical cord blood as positive control, and with PBS as negative control. Six weeks post-transplantation, peripheral blood of all the transplanted mice was analyzed by flow cytometry to detect specific human CD45 cells. Isotype control on the top images and CD45 analysis on the bottom.

Organoïdes hépatiques vascularisés dérivés des CSPih

Travail en collaboration avec l'équipe du Dr. Anne Dubart-Kupperschmitt, Inserm U1193

Antonietta Messina, Alejandra Vargas Valderrama, Astrid Laurent-Bellue, Maria Teresa Mitjavila-Garcia, Hind Guenou, Anne Dubart-Kupperschmitt

Introduction

Les hépatocytes primaires humains (HPH) sont utilisés dans le cadre des études de métabolisme et de toxicité des médicaments ou de la thérapie cellulaire chez des patients atteints de maladies du foie (Trefts et al., 2017). Cependant, leur utilisation est limitée en raison de leur qualité, de leur disponibilité réduite, de leur tendance à la dédifférenciation et de la perte rapide de leur fonctionnalité lors de leur culture conventionnelle, en monocouche, *in vitro* (Boyer et al., 2012; Elaut et al., 2006; Fraczek et al., 2013). Depuis l'isolement des premières CSEh (Thomson et al., 1998a) et de la reprogrammation des cellules somatiques en CSPih (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), les CSPh sont devenues une source prometteuse de cellules du foie grâce à leur potentiel d'autorenouveau indéfini et de différenciation vers les trois feuilletts embryonnaires. Jusqu'à présent, malgré les efforts employés dans l'établissement des protocoles pour la différenciation des hépatocytes à partir de CSPh, les hépatocytes issus de la différenciation de CSPh ne reproduisaient pas la totalité des fonctions des HPH. Ce pourquoi le développement de nouvelles stratégies pour la différenciation hépatocytaire s'est avéré nécessaire. Les premières tentatives pour améliorer la maturation des hépatocytes dérivés des CSPh se sont concentrées sur les protocoles de différenciation bidimensionnelle (2D) et l'utilisation de produits chimiques et de petites molécules (Shan et al., 2013; Si-Tayeb et al., 2010; Song et al., 2009; Touboul et al., 2010). Plus récemment, des études sur la culture tridimensionnelle (3D) des hépatocytes ont démontré leur potentiel à récapituler les interactions complexes cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (ECM) du foie (Takebe et al., 2013, 2014). Les systèmes de culture cellulaire en 3D, tels que les matrices de collagène (Gieseck III et al., 2014), les formats micro-modèles (*micro-patterned*) (Berger et al., 2015) ou la culture sous forme des sphéroïdes (Takayama et al., 2013) sont utilisés pour favoriser les interactions cellulaires et la reproduction de l'architecture du foie plus efficacement que les cultures sandwich traditionnelles, améliorant la fonction hépatocytaire dérivée des CSPih. Toutefois, ces systèmes sont confrontés aux mêmes problèmes que la culture cellulaire classique, à savoir, la faible adaptabilité à une augmentation d'échelle, l'absorption/adsorption du médicament dans l'ECM et la variabilité associée aux lots de l'ECM (Godoy et al., 2013). A ce jour, les cultures de sphéroïdes 3D des hépatocytes qui incluent des cellules non parenchymateuses (CNP) ont été réalisées avec des cellules

primaires de souris (Song et al., 2015). Les CNP comprennent des cellules endothéliales (CE), qui participent non seulement à la formation des vaisseaux sanguins mais aussi à l'organogénèse du foie (Matsumoto et al., 2001). Dans cette étude, nous avons généré des agrégats cellulaires en 3D à partir de la coculture des progéniteurs hépatiques, les hépatoblastes (iHb), des iCE et des cellules de type mésenchymateuse (iCSM) tous dérivés de la même lignée de CSPih. Les agrégats obtenus ont été caractérisés en termes de morphologie, d'expression génique, d'expression de marqueurs hépatiques spécifiques ainsi que de fonctionnalité. Après 10 jours de coculture, nous avons constaté la présence des hépatocytes et cholangiocytes, mettant en évidence l'adéquation de cette méthode pour la maturation des cellules hépatiques.

Matériels et méthodes

Culture des CSPih

La lignée de CSPih (Steichen et al., 2014) utilisée pour la différenciation des progéniteurs du foie est cultivée sur Geltrex™ *LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix* (Gibco) et maintenue avec StemMACS™ iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec) à 37°C et 5% O₂. Le milieu est changé tous les deux jours et les colonies sont passées mécaniquement pour une amplification avec un rapport de 1 sur 6. La même lignée est maintenue sur MEF pour la différenciation en CE-CSPh et CSM-CSPh (voir matériels et méthode de l'article précédent).

Différenciation des CSPih en iHb, iCE et iCSM

La différenciation des CSPih en iHb et en iCE sont réalisées selon les protocoles décrits précédemment (Caron et al., 2019, Vargas-Valderrama et al., 2020). Pour la différenciation des CSPih en iCSM, les EB sont formés à partir des CSPih selon les conditions décrites dans l'article précédent. A 84 heures, les EB dissociés sont ensemencés à une densité cellulaire de 20000 cellules/cm² dans le milieu *Minimum Essential Medium α* (αMEM, Gibco) et 5% du SVF sur des plaques de culture recouvertes au préalable de fibronectine. L'entretien des cellules se fait par changement de milieu de culture tous les deux jours et par repiquage des cellules confluentes à l'acutase. Toutes les différenciations sont réalisées à 37°C et 5% O₂.

Formation des agrégats

La formation des agrégats cellulaires est réalisée par un processus d'autoassemblage. À l'aide d'un moule en PDMS (Messina et al., 2017), des micro-puits sont imprimés dans une solution d'agarose liquide. Une fois l'agarose gélifié, les moules sont retirés et les micro-cylindres, aux caractéristiques non-adhérentes sont obtenus pour la culture cellulaire. Afin de mieux contrôler les conditions de culture et surtout, d'assurer un niveau optimal de diffusion des nutriments et des gaz

au cœur des organoïdes, différents tests préliminaires ont été réalisés pour déterminer le nombre et la proportion adéquants des cellules et leur ratio pour obtenir leur bon autoassemblage. Environ 4500 cellules totales sontensemencées afin de produire un agrégat par micro-puit. Les iHb, iCE et iCSM cultivés indépendamment sont dissociés à l'aide de l'acutase, centrifugés à 1000 rpm pendant 5 minutes et enfin, mélangés suivant le ratio 75:20:5, respectivement. Pour la condition contrôle, les iHb sont cultivés dans des conditions décrites précédemment (Caron et al., 2019). Tous les agrégats sont maintenus dans un milieu obtenu du mélange 1:1 de HCM™ (*Hepatocyte Complete Medium*, Lonza) et APEL™2 *Medium* (StemCell Technologies) complété avec le facteur de croissance hépatique (HGF) (20 ng/ml), l'oncostatine M (OSM) (20 ng/ml), VEGF (25 ng/ml) et le dexaméthasone (DEX) (0.1 ng/ml). La moitié du milieu est changé toutes les 48-72 h. Quelques sphéroïdes sont récupérés après 24 et 48 h de culture, lavés avec 1X DPBS (Gibco) et testés pour la viabilité avec le kit d'imagerie de viabilité cellulaire *Ready Probes*® (Molecular Probes®) selon les instructions du fabricant. Les images sont acquises avec le système d'imagerie automatique EVOS™ FL.

Cytométrie en flux

Les suspensions unicellulaires de iCE et des iCSM sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec des anticorps, couplés à des fluorochromes, reconnaissant respectivement les marqueurs endothéliaux CD144, CD31, CD34 et CD309 (Miltenyi), les marqueurs mésenchymateux CD90, CD146, CD105 et CD73 (R&D Systems) ou les isotypes correspondants (R&D Systems, Miltenyi), les cellules sont alors lavées et remises en suspension dans du PBS contenant 5% de SVF et de la 7-aminoactinomycine D (7AAD ; 1µg/mL) (Sigma Aldrich) pour marquer les cellules mortes. L'acquisition des données est effectuée par le cytomètre BD Accuri C6 et l'analyse a été réalisée avec le logiciel BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Extraction d'acides nucléiques

Le contenu total en ARN/ADN des sphéroïdes est extrait à l'aide du réactif *TRIzol*™ (Sigma-Aldrich Aldrich) et purifié grâce au kit *MiniPrep Direct-zol*™ DNA/RNA (Zymo Research) en suivant les instructions du fabricant. La quantification de l'ARN et de l'ADN des échantillons est réalisée par *UV-visible Nanodrop Lite* (ThermoFisher). L'ADN isolé est utilisé pour quantifier le nombre de cellules par échantillon de sorte que les résultats des tests de quantification de la sécrétion des protéines soient indiqués en valeur par million de cellules/24 h.

RT et qPCR

La rétrotranscription pour obtenir le premier brin d'ADNc est réalisée en utilisant le kit *SuperScript III* (Invitrogen) avec des hexamères aléatoires. Trois répliques par échantillon, chacun correspondant à 9 ng d'ADNc, sont analysés pour l'expression différentielle des gènes (voir Tableau 13) en utilisant le thermocycleur *qPCR Mx3000P* (Agilent) avec le *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green* (Agilent) conformément aux instructions du fabricant. L'expression du gène cible est normalisée par rapport au gène de ménage humain ERCC3 selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'expression relative des gènes est exprimée par rapport à l'ARN d'un échantillon du foie fœtal humain.

Tableau 13. Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes par RTqPCR

Gène	Sens	Antisens
STAB2	TTCTTACAATTAGGACCGAGTGC	CGGGGAGAGACAGAGAGTATGT
LYVE1	GCTGAATTCACAGAAGCTAAGG	CTAGAGATGACCACGAATCCATC
F8	TCTTTCCATTCAACACCTCAGT	AACAGCATGAAGACTGACAGGAT
CDH5	ATGACGTGAACGACAAGTGG	TTCATACCTGGCCTGCTTC
ERCC3	ACTGGATGGAGCTGCAGAAT	GACATAGGGCACCAGACCTC

Immunofluorescence

Les agrégats entiers et les coupes (3 μ m) obtenues à partir de blocs de paraffine sont traitées selon le même protocole, avec les adaptations nécessaires. Après fixation dans de la PFA à 4% pendant 15 minutes, les échantillons sont perméabilisés avec une solution de perméabilisation à base de PBS contenant du Triton-X100 à 0,1%, de la BSA à 1% et de l'EDTA à 0,2 mM pendant 5 minutes à 4°C, lavées et saturées avec une solution de BSA à 3%. Ensuite, les échantillons sont incubés avec les anticorps primaires toute la nuit. Après lavages au PBS-BSA, les anticorps secondaires sont incubés pendant 1h à température ambiante et les noyaux sont colorés au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Pour l'imagerie en 3D, des agrégats sont prélevés dans les micropuits d'agarose et fixés pendant 4h dans de la PFA à 4%, puis lavés et perméabilisés pendant 45 minutes. Une étape de saturation de 3h avec une solution au PBS-5% de BSA est effectuée avant l'incubation des anticorps primaires et secondaires pendant respectivement 48 h (4°C) et 3 h à température ambiante et le DAPI est utilisée pour contre-colorer les noyaux. Finalement, les échantillons sont finalement soigneusement lavés et montés sur des lames en utilisant un milieu de montage glycérine-eau (DAKO) pour préserver les structures 3D. La liste des anticorps primaires est

présentée dans le Tableau 14. Les images sont acquises avec le système d'imagerie automatique EVOS™ FL.

Tableau 14. Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

Protein	Ref	Type d'anticorps
ALB	Sigma A6684	mouse monoclonal IgG
BSEP (ABCB11)	Sigma HPA019035	rabbit polyclonal IgG
CYP3A4	SC 53850	mouse monoclonal IgG
CD144	R&D AF938	goat polyclonal IgG
CD31	R&D BBA7	mouse polyclonal IgG
STAB2	Ab121893	rabbit polyclonal IgG
MDR1	Fisher 4MA-26528	mouse monoclonal IgG
Phalloidin (Alexa Fluor 488)	Life Technologies A12381	
Alexa Fluor 488-conjugated	Life Technologies	
Alexa Fluor 594-conjugated	Life Technologies	

Évaluation *in vitro* de la fonctionnalité hépatocytaire

Les propriétés fonctionnelles de l'hépatocyte sont évaluées par la sécrétion de l'albumine et de la alpha-fœtoprotéine (AFP). Des échantillons du milieu de la culture sont prélevés 24 heures après chaque changement du milieu, centrifugés à grande vitesse et les surnageants sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La concentration de l'AFP sont effectuées à l'aide du kit ELISA humain de l'AFP humaine (Fisher Scientific) en suivant les instructions du fabricant. La sécrétion d'albumine est quantifiée par le kit de quantification de l'albumine humaine ELISA (Bethyl Laboratories) conformément aux instructions.

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart type. L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA unidirectionnelle avec test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples. Les valeurs P sont présentées pour des résultats statistiquement significatifs $\leq 0,001$.

Résultats

Caractérisation phénotypique des iCE et iCSM

Les iCE et les iCSM ont été dérivées à partir des EB à 84h. Pour les iCE, les EB ont été triés sur l'expression du marqueur CD144. Afin d'établir les différences entre ces deux populations, nous les avons caractérisées phénotypiquement par cytométrie en flux. La caractérisation fonctionnelle des iCE est présentée dans l'article précédent. Comme il est illustré dans la Figure 29 les iCSM présentent une morphologie plus allongée que les iCE en culture classique sur 2D. A la différence des iCSM, la majorité des iCE expriment les marqueurs endothéliaux CD309, CD144, CD31 et CD34. Les iCE

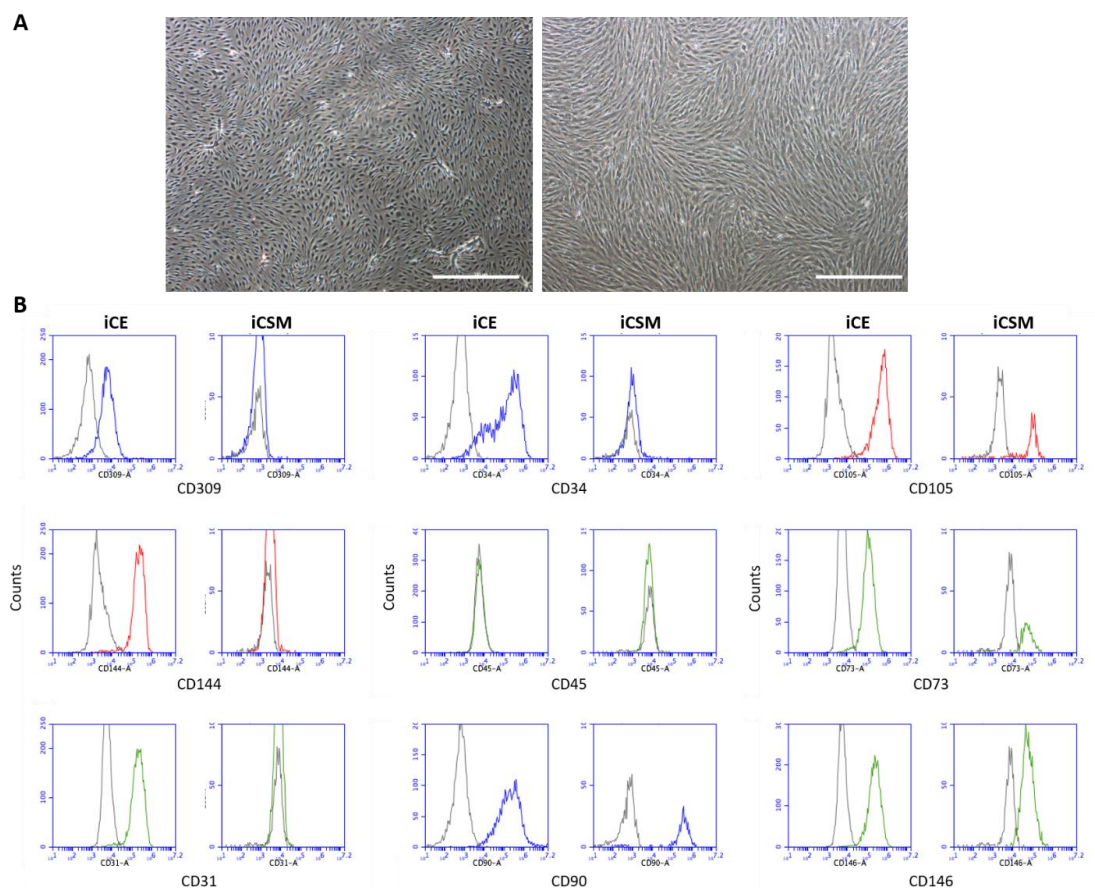


Figure 29. Caractérisation phénotypique des iCE et iCSM. A. Image en contraste de phase des iCE, à gauche et des iCSM, à droite. Barre d'échelle: 500 μ m. **B.** Analyse par cytométrie de flux de l'expression des marqueurs endothéliaux CD309, CD144, CD31 et CD34; hématopoïétique CD45 et méssenchymateux CD90, CD105, CD73 et CD146 par les iCE et iCSM.

expriment également des marqueurs décrits pour les CSM tel que le CD90, CD105, CD73 et CD146. En effet, nous avons observé l'expression de ces marqueurs aussi dans les iCSM. Aucune des deux populations n'exprime le marqueur hématopoïétique CD45. Au vu de ces résultats, nous avons choisi les marqueurs CD144 et CD31 pour identifier spécifiquement les iCE dans les agrégats.

Formation des agrégats et caractérisation phénotypique

La formation des agrégats est permise par la coculture des iHb, iCE et iCSM dans des micro-puits d'agarose selon le schéma présenté dans la Figure 30. Cet environnement non-adhérent favorise l'agrégation des cellules ensemencées. Ainsi, nous avons constaté la formation des petits amas de cellules 2 heures après l'ensemencement. Ces petits amas sont le début d'une agrégation des cellules qui finit par former un agrégat par micro-puits dans les premières 48 heures de coculture (Figure 30). La densité cellulaire détermine la taille des agrégats. Cependant, les changements des milieux peuvent favoriser la mobilisation des quelques agrégats entre les micro-puits, entraînant la fusion des agrégats regroupés ce qui génère au final un certain degré d'hétérogénéité de la taille des agrégats.

Pour caractériser le niveau de maturation des agrégats à jour 10 de la culture, une analyse par immunofluorescence est effectuée sur des coupes d'échantillons (Figure 30). Comme le montrent les marquages des coupes du haut, milieu et bas d'un même agrégat, nous ne retrouvons pas des signes de nécrose ou d'apoptose malgré la taille des agrégats autour 200 μm de diamètre. Au cœur des agrégats nous avons retrouvé des cellules CD144⁺ tout au long de la structure tridimensionnelle, ce qui confirme la présence et la dissémination des iCE 10 jours après la coculture. Au vu de nos images, il est difficile de confirmer la formation d'un réseau vasculaire à l'intérieur des agrégats. Cependant, nous avons retrouvé des cellules CD144⁺ alignées et certaines localisées autour des espaces vides. De plus, nous avons constaté l'expression de la STAB2, principalement exprimée par les LSEC. Comme le CD144, le STAB2 est exprimé par des cellules qui entourent des petits espaces vides. Concernant les autres types cellulaires, l'albumine a été observée dans les cytoplasmes des cellules réparties dans la totalité des agrégats. Le cytochrome 3A4 et deux des marqueurs apicaux des hépatocytes tels que MDR1 et BSEP sont aussi exprimés. Ces derniers montrent la présence des hépatocytes différenciés dans les agrégats, qui ont acquis une

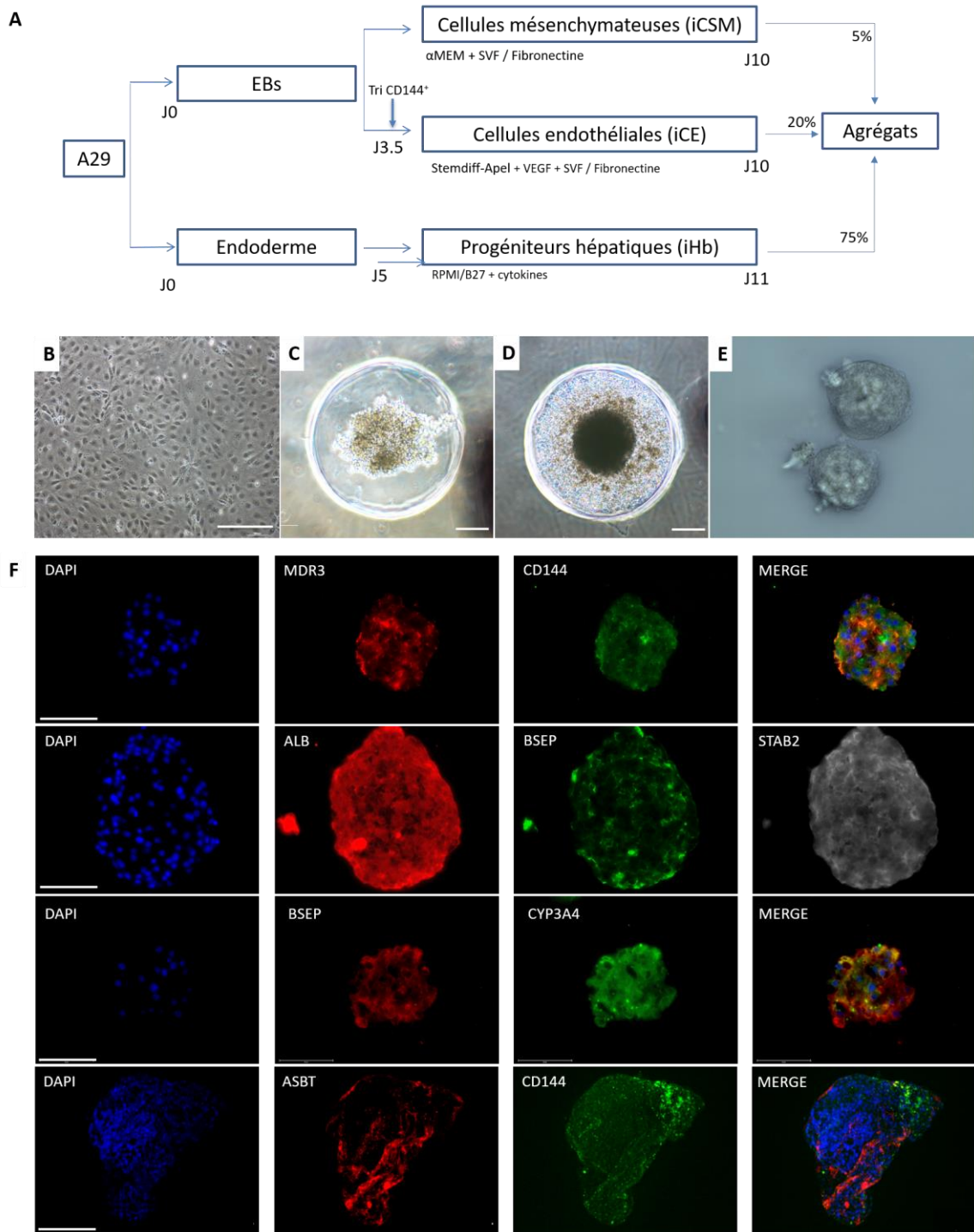
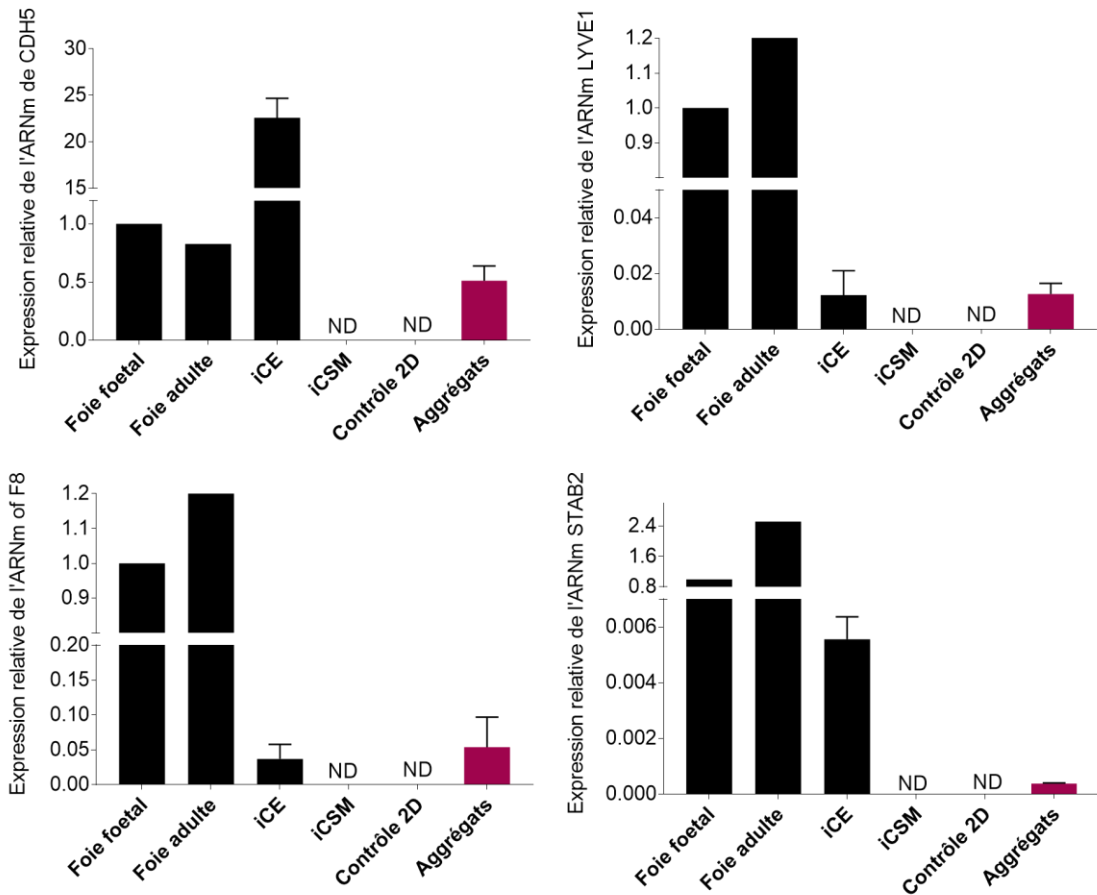


Figure 30. Caractérisation phénotypique des agrégats à j10 de coculture. **A.** Schéma de la différenciation des CSPih en tous les lignages cellulaires utilisés pour la coculture et formation des agrégats multicellulaires. Les agrégats ont été formés à partir de 75% des iHb, 20% des iCE et 5% des iCSM. **B-D.** Images en contraste de phase des iHb à jour 11 de différenciation utilisée dans la coculture (B), des agrégats 2 heures (C) et 10 jours (D) après l'ensemencement dans les puits d'agarose. **E.** Projection en Z des stacks en contraste de phase faites sur deux agrégats 10 jours après la coculture. **F.** Images représentatives des immunomarquages sur des coupes des agrégats à jour 10 de la coculture pour les marqueurs hépatocytaires MDR3, Albumine (ALB), BSEP et CYP3A4; pour les marqueur endothélial CD144 et STAB2 et pour le marqueur cholangiocytaire ASBT. Les trois premières lignes d'images appartiennent au même sphéroïde à différents niveaux (haut, milieu et bas). Barres d'échelle pour B, 500 μm ; pour C et D, 100 μm ; pour F, 75 μm .

A



B

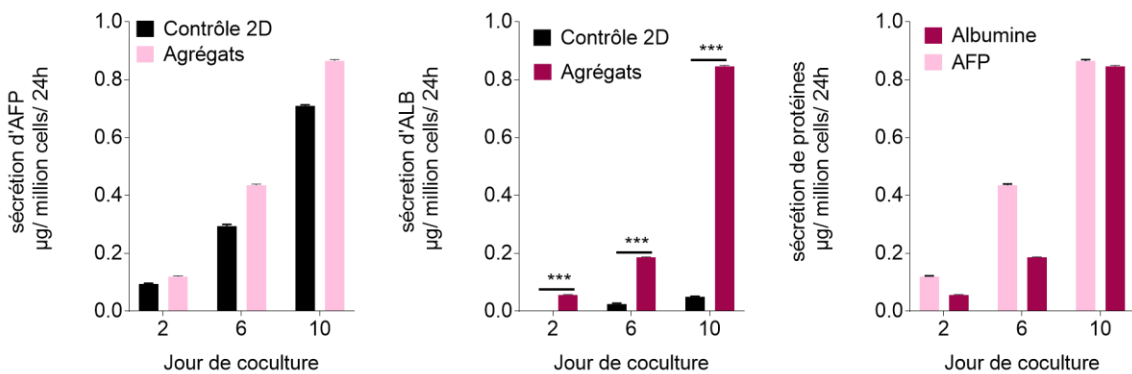


Figure 31. Caractérisation des CEi et des iHep. A. Analyse par RTqPCR de l'expression du gène pan-endothéliale CH5 (Ve-cadhérine) et des gènes propres aux LSEC, à savoir, LYVE1, F8 et STAB2 dans un échantillon de foie foetal et adulte humain, dans des populations initiales de iCE et iCSM et dans iHb cultivés en 2D (côntrole) ou à partir de la coculture des iHb, iCE et iCSM. ND: non détecté. B. Analyse par ELISA de la sécrétion d'AFP et albumine (ALB) par les agrégats contrôles et les agrégats de la coculture à jour 2, 6 et 10. *** P-value<0.0005.

polarisation complexe avec la formation de pôles apicaux. Cette polarisation s'avère nécessaire pour la génération de canaux biliaires adaptés à l'excrétion de la bile. De plus, l'expression du transporteur d'acides biliaires dépendant du sodium (ASBT) sur les membranes des cellules suggère la différenciation en cholangiocytes des certains hépatoblastes.

Caractérisation fonctionnelle des iCE et des iHep.

Les LSEC sont connues pour leurs capacités d'épuration (« *scavenger cells* ») par endocytose des molécules provenant du métabolisme cellulaire présentes dans la circulation sanguine. Pour ce faire, elles emploient des récepteurs de membrane tel que la STAB2 ou le récepteur de LYVE1 qui reconnaissent spécifiquement un grand nombre de molécules (Sørensen et al., 2015). De plus, les LSEC expriment le facteur de coagulation FVIII (Do et al., 1999). Afin de caractériser les iCE au sein des agrégats, nous avons vérifié par RTqPCR l'expression de ces gènes à jour 10 et nous avons comparé cette expression à celle des populations initiales d'iCE, d'iCSM, des échantillons de foie foetal et adulte et à la culture adhérente des hépatoblastes. Nous n'avons pas détecté l'expression des transcrits d'aucun des gènes endothéliaux analysés dans les iCSM ou dans les hépatoblastes contrôles. En revanche, les agrégats issus de la coculture expriment deux fois moins (0.5 ± 0.127) de *CDH5* par rapport au foie foetal, ce qui correspond au 0.2% des cellules endothéliales présentes dans les agrégats. Les agrégats de la coculture expriment de très faibles niveaux, mais détectables, les transcrits des gènes *STAB2*, *LYVE* et *F8*, correspondant au $3.77 \times 10^{-4} \pm 0.24 \times 10^{-4}$, 0.013 ± 0.004 et 0.054 ± 0.043 fois les niveaux du foie foetal, respectivement (Figure 31).

D'autre part, nous avons la concentration de l'AFP et de l'albumine secrétées dans le milieu de culture afin de déterminer les niveaux de maturation des hépatocytes générés dans la coculture. La Figure 31 montre les profils de sécrétion de deux protéines hépatocytaires au cours de la coculture pendant 10 jours. L'AFP, l'isoforme foetale de l'albumine, augmente dans le temps aux niveaux similaires que la différenciation classique en 2D des iHb à jour 2 (0.12 ± 0.0025 vs 0.09 ± 0.003 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h), à jour 6 (0.44 ± 0.004 vs 0.29 ± 0.006 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h) et à jour 10 (0.87 ± 0.0047 vs 0.71 ± 0.004 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h). Quant à l'albumine, l'isoforme sécrétée par les hépatocytes matures, elle est détectée dès 2 jours de la coculture. Les agrégats multicellulaires sécrètent significativement plus cette protéine que le contrôle en 2D à jour 2 (0.06 ± 0.0020 vs 0.001 ± 0.00 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h), à jour 6 (0.19 ± 0.001 vs 0.025 ± 0.003 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h) et à jour 10 (0.85 ± 0.004 vs 0.05 ± 0.002 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24h). De plus, la comparaison de la sécrétion de ces deux protéines montre que les hépatocytes sécrètent plus d'AFP qu'albumine pendant les premiers jours de coculture. Cependant, à jour 10, les niveaux d'AFP et d'albumine sont équivalents dans le milieu des agrégats multicellulaires (Figure 31).

Discussion

L'isolement des CSEh et la reprogrammation de cellules somatiques en CSPih ont ouvert la possibilité de générer *in vitro* n'importe quel type cellulaire sans les limitations des cellules primaires concernant leur disponibilité et leurs hétérogénéité. Cependant, à ce jour, la plupart des protocoles de différenciation des CSPh aboutissent à la production à des cellules au phénotype immature, loin du phénotype adulte souhaité. Dans ce contexte, il existe un besoin de développer des nouvelles méthodes de différenciation qui permettent aux cellules différenciées de CSPh l'acquisition d'un phénotype adulte plus pertinentes aux applications en toxicologie, développement des nouveaux médicaments ainsi que pour l'établissement des foies artificiels (BAL de l'anglais « *bioartificial liver device* »). Dans cette étude, nous avons exploré la coculture des cellules hépatiques et des CNP (iCE et iCSM), différenciées de la même lignée de CSPih, afin de favoriser la maturation des hépatocytes. Pour ce faire, nous avons employé un système de culture non-adhérente en 3D qui favorise la formation des agrégats cellulaires et l'auto-organisation des cellules en organoïdes. Il a été décrit dans la littérature que, lorsque les cellules sont mises en suspension, elles ont tendance à s'agréger entre elles. Cette agrégation débute entre les cellules du même type et s'étend progressivement vers d'autres types cellulaires de leur entourage jusqu'à aboutir à la formation d'un agrégat cellulaire (Foty and Steinberg, 2005). A l'intérieur de ces agrégats, les interactions entre cellules favorisent à la fois la diffusion des gaz et des nutriments et la maturation structurelle et fonctionnelle de ces structures. Lorsque la structure et la fonctionnalité se rapprochent de celles d'un organe, ils reçoivent le nom d'organoïdes (Lancaster and Knoblich, 2014). Dans notre système, nous avons constaté la formation des petits agrégats quelques heures après de l'ensemencement, puis la fusion et compaction dans un agrégat plus large. Les hépatocytes différenciés par cette méthode ont dépassé les capacités fonctionnelles de la différenciation classique de iHb en hépatocytes cultivés en 2D. Notamment, l'expression membranaire de la BSEP et MDR3 démontre la présence d'une structure polarisée en plus d'une sécrétion élevée d'albumine. Cette maturation est obtenue grâce à la coculture en 3D avec les deux autres types cellulaires car les hépatocytes cultivés en 2D sécrètent niveaux plus réduits d'albumine. D'une part, il semble que la co-culture en présence des iCSM favoriserait la formation des agrégats. Ce constat converge avec le travail de Takebe *et al.* qui a décrit un rôle similaire des cellules mésenchymateuses dans la formation des organoïdes (Takebe et al., 2014). D'autre part, le rôle des CE dans l'induction de la délamination et de la migration des hépatoblastes pendant l'organogenèse du foie est connu (Matsumoto et al., 2001) Des données similaires ont été publiées par d'autres auteurs avec des modèles des sphéroïdes/organoïdes auto-assemblés (Norona et al., 2016; Ramachandran et al., 2015; Takebe et al., 2014). Cependant, les CE et CSM utilisées dans

ces études proviennent d'une culture primaire. Dans notre travail, tous les types cellulaires utilisés proviennent de la même lignée de CSPih.

La coculture de ces trois lignages cellulaires a participé également à l'expression des gènes *STAB2*, *LYVE* et *F8*, caractéristique des LSEC et à son maintien. Bien que d'autres études soient nécessaires pour démontrer la formation d'un réseau vasculaire au cours de nos organoïdes, notre étude représente une étape importante dans cette direction. La présence du flux sanguin à l'intérieur des vaisseaux sanguins et notamment, la génération d'une force de cisaillement joue un rôle très important dans la formation et maintien des nouveaux vaisseaux sanguins (Galie et al., 2014). La vascularisation des organoïdes pourrait nécessiter également leur intégration dans des systèmes de microfluidiques qui apporterai ces contraintes hémodynamiques et qui permettrai le développement d'un model plus pertinent du foie.

Finalement, l'établissement des modèles à l'échelle au delà du lobule hépatique requiert le développement des canalicules biliaires qui draine les acides biliaires vers le système biliaire. Ces premières sont générées par la polarisation des hépatocytes tandis que l'arbre biliaire est constitué par les cholangiocytes. Dans nos organoïdes, les hépatocytes différenciés à partir des iHb montrent une polarisation qui précède la formation des canalicules biliaires. De plus, les iHb se différencient également en cholangiocytes ASBT⁺ au sein des agrégats.

En conclusion, ces résultats suggèrent la formation des organoïdes de foie à partir d'une lignée des CSPih. La coculture des iHb, iCE et iCSM par auto-organisation en absence d'une ECM résulte en un système 3D multicellulaire composé d'iCE, d'hépatocytes fonctionnels et de cholangiocytes. Une caractérisation plus approfondie de chacun des lignages présents est nécessaire pour établir leur état de maturité. Cependant, cette étude est une première étape vers la production des organoïdes fonctionnels de foie pour des applications en médecine régénérative et pharma-toxicologie. De même, l'étude des interactions entre les différents types cellulaires au sein des organoïdes pourrait permettre d'établir plus précisément le rôle des iCE et iCSM dans l'organogénèse hépatique.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

Un autre protocole pour la différenciation endothéliale et hématopoïétique des CSPh ?

Les protocoles actuels de différenciation endothéliale et hématopoïétique à partir de CSPh présentent des limites qui empêchent leur utilisation en thérapie cellulaire, voir pour d'autres applications, où les cellules primaires restent l'option privilégiée. Dans certains cas, ils utilisent d'ECM ou des couches nourricières d'origine animale et dans d'autres, leur efficacité reste réduite (Ditadi et al., 2015; Kennedy et al., 2012; Montel-Hagen et al., 2019; Patsch et al., 2015; Prasain et al., 2014; Sahara et al., 2014). De plus, les CE-CSPh ont un potentiel de prolifération limité par rapport aux CE primaires (Prasain et al., 2014) et les CSH-CSPh ont un potentiel de reconstitution hématopoïétique très faible par rapport aux cellules CD34⁺ adultes ou du SCO (Féraud et al., 2016b; Ledran et al., 2008). Nous avons mis au point un protocole de différenciation endothéliale et hématopoïétique à partir d'une population bipotente. Bien que notre protocole ne vise pas à résoudre chacune des limitations mentionnées ci-dessus, il intègre des éléments intéressants dans la production de ces cellules à envisager pour une application clinique et pour leur incorporation dans des modèles *in vitro*. Notamment, il est techniquement et économiquement intéressant que deux lignages cellulaires différents puissent être générés à partir d'un même protocole de différenciation. Dans notre cas, la différenciation de cette population bipotente *via* la culture des EB en suspension dans un milieu sans sérum, élimine la nécessité d'utiliser une matrice extracellulaire. De plus, il ne faut que 84 heures de différenciation pour obtenir un tel progéniteur, un temps court par rapport aux protocoles précédents qui nécessitent entre 5 et 20 jours pour générer un nombre de cellules équivalent. La congélation de ces cellules est également possible sans altérer leur bipotentialité, ce qui permet la génération d'un stock de progéniteurs.

Différenciation endothéliale

Comme d'autres protocoles de différenciation endothéliale, notre méthode exige une culture adhérente sur des surfaces recouvertes par de la fibronectine d'origine bovine et l'utilisation du SVF pour l'expansion des CE-CSPh. Ce dernier est un facteur limitant non seulement en vue d'une application thérapeutique, mais aussi car il peut jouer sur la reproductibilité de cette méthode en raison de la variabilité de sa composition entre différents lots de production. Toutefois, aujourd'hui, la fibronectine recombinante est produite selon les BPF (Macaskill et al., 2018). De même, nos études préliminaires ont montré que les cellules EB-CD144⁺ peuvent être cultivées dans des plaques à faible adhérence favorisant la formation de sphéroïdes qui conservent l'expression des marqueurs CD144

et CD31 (Figure A1). La caractérisation fonctionnelle des CE dans ces sphéroïdes pourrait permettre l'établissement d'un système d'expansion endothéliale en absence de protéines de l'ECM. D'autre part, comme mentionné ci-dessus, la première partie de la différenciation, la génération de EB-CD144⁺, est effectuée en l'absence de sérum. Compte tenu du phénotype endothélial présenté par ces cellules, on pourrait penser à leur utilisation sans expansion en culture adhérente au préalable.

Enfin, en ce qui concerne la prolifération des CE expansées cultivées en culture adhérente à partir du progéniteur EB-CD144⁺, nous avons observé des différences entre les trois lignées CSPh. Malgré qu'aucune différence ait été remarquée dans la génération de la population progénitrice EB-CD144⁺ par rapport aux lignées CSEh, les CE-CSPih ont rapidement diminuée leur prolifération après le premier passage (environ 7 jours de culture). Les deux lignées de CSEh (H1 et SA01) ont montré une plus grande prolifération et ont été conservées en culture jusqu'à un mois après.

Certaines études suggèrent que l'origine cellulaire des CSPih pourrait conditionner leur différenciation ultérieure en certains lignages (Kim et al., 2010; Noguchi et al., 2018; Papp and Plath, 2013; Phetfong et al., 2016). Par exemple, un potentiel de différenciation endothéliale plus élevé a été mis en évidence pour les CSPih dérivées des HUVEC et des PEC par rapport aux CSPih dérivées des fibroblastes dermiques (Phetfong et al., 2016). Dans la même étude, seuls les CSPih des HUVEC ont montré une différenciation hématopoïétique efficace, ce qui suggère l'existence d'une mémoire épigénétique qui conditionne leur différenciation. En effet, l'analyse épigénétique a montré des différences dans les niveaux de méthylation de l'ADN des promoteurs de gènes hématopoïétiques et endothéliaux entre les lignées CSPih (Phetfong et al., 2016). Li *et al.* ont observé que les CE dérivées des CSPih ont un niveau de prolifération beaucoup plus faible que les CE-CSEh. Une analyse transcriptomique de ces cellules a révélé que malgré l'absence de différences significatives entre les CSPih et CSEh d'origine, les CE-CSPih expriment des niveaux plus élevés d'inhibiteurs de la prolifération (Li et al., 2011). Cependant, d'autres études sur la différenciation hématopoïétique et endothéliale des CSP et des CSPi chez l'homme et la souris montrent une hétérogénéité de potentiel de différenciation, quelle que soit leur origine somatique ou embryonnaire (Féraud et al., 2016b; Jahan and McCloskey, 2020; Osafune et al., 2008). D'autre part, l'étude des CE primaires telles que les PEC de type ECFC a également montré une hétérogénéité de ces cellules issues de donneurs de SCO et du sang périphérique adulte, ce qui a conduit à une classification des ECFC à haute, moyenne et basse prolifération (Ferratge et al., 2017b). Ces différences ne semblent pas être liées à l'âge du donneur mais pourraient refléter à la fois la variabilité génétique chez l'homme et l'état de santé du donneur (Ferratge et al., 2017b).

Bien que les protocoles de différenciation doivent être robustes et reproductibles pour les différentes lignées de CSPh, il est important qu'ils montrent les différences entre lignées afin de

pouvoir identifier les mécanismes responsables des phénomènes physiologiques et pathologiques dans la modélisation des maladies et la recherche fondamentale. Etudier les potentiels de prolifération de CE-CSPh pourrait éclaircir les bases qui régissent l'hétérogénéité observée entre les ECFC issues de différents donneurs et ainsi permettre d'établir les conditions qui favoriseraient une amplification des CE pertinentes pour la thérapie cellulaire indépendamment de leur origine CSP ou primaire.

Modèles animaux pour établir la pertinence des CE-CSPh

Bien que le modèle le plus souvent utilisé pour démontrer le potentiel angiogénique et thérapeutique des CE-CSPh soit le modèle d'ischémie aiguë du membre inférieur (Lu et al., 2007; Macaskill et al., 2018; Prasain et al., 2014), nous avons décidé d'utiliser le modèle d'ischémie de la chambre dorsale. Ce modèle offre la possibilité de suivre par microscopie confocale en temps réel à la fois, la reperfusion du tissu et l'incorporation des cellules injectées, marquées au préalable (dans notre cas, avec le mcherry) sur la souris vivante. Ce modèle a été largement utilisé chez la souris et le hamster pour analyser l'angiogenèse *in vivo* (Menger et al., 2002; Schreiter et al., 2017). Récemment, notre équipe a démontré le potentiel angiogénique et immunosuppresseur des ECFC à l'aide de la chambre dorsale où une ischémie a été induite (Proust et al., 2020).

Nos études effectués dans le modèle de chambre dorsale suggèrent un potentiel angiogénique *in vivo* des CE-CSPh, un résultat prometteur vers une future application de ces cellules en thérapie cellulaire. Ce potentiel angiogénique semble être, néanmoins, indépendant de l'induction ou non d'une ischémie dans la chambre dorsale, puisque, dans les deux cas, les CE-CSPh ont survécu et se sont incorporées dans les vaisseaux sanguins de la souris. De plus, la quantification des vaisseaux sanguins suivant l'injection a montré une néovascularisation similaire dans les chambres dorsales ischémiques et non ischémiques. D'une part, cette incorporation des CE-CSPh dans les parois des vaisseaux sanguins de la souris sans ischémie peut être le résultat de la régénération physiologique du tissu vasculaire bien que les taux de régénération de ce tissu soient généralement faibles et se situent entre 47 et 23 000 jours en conditions physiologiques (Hobson and Denekamp, 1984; Woywodt et al., 2002). D'autre part, la néovascularisation dans ce modèle pourrait être induite par le processus de cicatrisation généré par le retrait de l'épiderme d'un côté de la chambre dorsale afin de permettre l'imagerie *in vivo* (Kumar et al., 2015; Schneider et al., 2019). Il est également possible que les CE-CSPh soient impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins même en l'absence d'une ischémie. L'analyse de la chambre dorsale chez des souris sans ischémie et sans CE-CSPh pourrait éclaircir si l'angiogenèse observée sans ischémie est induite par la cicatrisation du tissu ou par les CE-CSPh.

Dans la plupart des publications où le potentiel thérapeutique des CE-CSPh ou des CE primaires est analysé *in vivo*, la contribution des CE en l'absence d'ischémie n'est pas souvent déterminée (Lu et al., 2007; Macaskill et al., 2018; Prasain et al., 2014). Bien que le but ultime soit d'utiliser ces cellules en pathologie, il est important d'identifier le comportement des cellules dans des contextes physiologiques pour anticiper les effets secondaires, surtout dans des méthodes qui pourraient permettre la dissémination des cellules dans l'organisme de l'hôte (*e.g.* injection intraveineuse). Dans le cas de la chambre dorsale, les souris avec ou sans ischémie ont survécu jusqu'au 30ème jour et aucune formation de tératome n'a été observée dans la chambre dorsale où les cellules ont été injectées, bien que la dissémination des cellules humaines dans le reste de l'organisme de la souris n'ait pas été vérifiée.

D'autre part, dans les modèles d'ischémie du membre inférieur et d'ischémie dans la chambre dorsale, les cellules sont injectées quelques minutes après que les artères ont été ligaturées ou cautérisées (Niiyama et al., 2009). De plus, l'ischémie est généralement réalisée chez des souris jeunes (6-8 semaines) dont la récupération est généralement plus rapide et les CE de souris sont fonctionnelles au moment de l'injection (Niiyama et al., 2009). Selon ces consignes, ces modèles murins représentent une thérapie cellulaire préventive, loin du scénario envisagé pour la thérapie chez l'homme. Dans le cas d'une ischémie aiguë, la pathologie représentée par ces modèles, le traitement doit s'exécuter en urgence dans les heures qui succèdent le diagnostic (Couture et al., 2019). La mise en place d'une transplantation de PEC ou de CE-CSPh pourrait prendre plus que le temps disponible pour éviter des conséquences néfastes pour le patient (amputation du membre ou même la mort).

Ainsi, la thérapie cellulaire est conçue pour les ischémies critiques chroniques tel que la maladie artérielle périphérique (MAP). Le risque de développer une MAP augmente avec l'âge et la perte de perfusion du membre inférieur se produit progressivement dû à la formation de plaques d'athérome dans les artères (Criqui and Aboyans, 2015). Seuls 20% des patients atteints de MAP présentent des symptômes. Par conséquent, dans de nombreux cas, cette maladie est diagnostiquée tardivement (Criqui and Aboyans, 2015). Dans ces circonstances, la transplantation des CE-CSPh serait donc effectuée dans un environnement ayant subi une ischémie prolongée et en présence d'un endothélium dysfonctionnel. Comment ce microenvironnement hautement ischémique pourrait-il affecter le comportement des CE-CSPh injectées ? Les conditions qui ont induit le dysfonctionnement endothélial chez le patient pourraient-elles le faire avec les CE-CSPh ? À ce jour, le modèle d'ischémie du membre inférieur ou d'ischémie en chambre dorsale ne permettent pas de répondre à ces questions. Macaskill *et al.* ont montré que l'injection de CE-CSPh, 3 jours après la ligature de l'artère fémorale, n'entraînait aucune amélioration de la densité capillaire même 21 jours après l'injection.

Dans la même étude, les CE-CSPh ont participé à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins lorsqu'elles sont injectées minutes après la ligature des artères (Macaskill et al., 2018). Récemment, Krishna *et al.* ont développé un modèle de MAP chez la souris *Apolipoprotein E^{-/-}* (*ApoE^{-/-}*) par occlusion progressive de l'artère fémorale à l'aide de constricteurs améroïdes pendant 14 jours, suivie d'une excision de l'artère fémorale. Les constricteurs améroïdes sont des anneaux en acier avec de la caséine à l'intérieur qui, une fois dans le vaisseau sanguin, gonflent par l'absorption de fluides empêchant le passage du flux sanguin. Les auteurs justifient l'utilisation de souris *ApoE^{-/-}* car elles possèdent moins d'artères collatérales, ce qui rend difficile la récupération du flux sanguin après une ischémie, en plus d'une angiogenèse réduite, se rapprochant ainsi du phénotype des patients atteints de MAP. L'utilisation d'un tel modèle pourrait permettre de définir mieux le potentiel et la sécurité des CE-CSPh dans le possible traitement des maladies cardiovasculaires.

Différenciation hématopoïétique

Avec notre protocole, la différenciation hématopoïétique est effectuée en méthylcellulose enrichie avec des cytokines hématopoïétiques et en absence de sérum. Par cette méthode, des BC peuvent être récupérées entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour de culture, puisque dès le 7^{ème} jour, les premières cellules hématopoïétiques érythro-myéloïdes (BFU-E, CFU-GM et CFU-GEMM) sont observées. Bien que ce protocole puisse être adapté à la thérapie cellulaire selon les BPF, le principal facteur limitant est la génération des vraies CSH capables de générer tous les lignages hématopoïétiques et de reconstituer l'hématopoïèse *in vivo*. Les tests CFC ont démontré la présence de progéniteurs de globules rouges (BFU-E), de cellules myéloïdes (CFU-GM) et de progéniteurs multipotents à l'origine des deux lignages (CFU-GEMM). L'analyse RTqPCR des globines exprimées par les colonies BFU-E et CFU-GEMM a révélé l'expression des globines embryonnaires, fœtales et dans une moindre mesure, adultes. Bien que cela ait longtemps été une mesure du potentiel hématopoïétique primitif ou définitif (Luo et al., 1999; Sankaran and Orkin, 2013), jusqu'à présent aucun protocole de différenciation des globules rouges à partir des CSPh n'a permis d'obtenir des populations de globules rouges exprimant exclusivement la globine β (adulte) *in vitro*. De plus, il a été rapporté qu'un seul érythrocyte peut exprimer les trois globines pendant la différenciation des CSPh (Huang et al., 2015). Néanmoins, la transplantation de ces cellules chez des souris immunodéprimées s'est révélé suffisant pour le passage des hémoglobines à un phénotype adulte (Doulatov et al., 2013; Kobari et al., 2012). Au vu de ces résultats, il est difficile de déterminer quels niveaux d'hémoglobine β sont considérés comme suffisants pour valider une hématopoïèse définitive. Cependant, nous avons vérifié uniquement l'expression des transcrits des globines. L'analyse protéique de ces cellules, par western blot ou cytométrie de flux, pourrait nous donner une idée plus précise de la présence de ces globines et les comparer à d'autres études.

Néanmoins, des études précédentes avec des BC CD143⁺, qui ont été cultivées sur la lignée stromale OP9, ont démontré une augmentation de l'expression des globines β et ils ont permis la différenciation des lignées lymphoïdes telles que les lymphocytes NK et B (Zambidis et al., 2008), suggérant une hématopoïèse définitive à partir des BC.

Nous avons également analysé par RTqPCR l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la TEH de l'hématopoïèse définitive dans les trois populations générées (EB-144⁺, BC, et CE-CSPh). L'expression de GATA2 et de SCL dans les trois populations suggère leur participation à la différenciation endothéliale et hématopoïétique, telle que décrite chez les embryons de souris et humains. Cependant, ces facteurs de transcription participent également à l'établissement de l'hématopoïèse primitive (Kappel et al., 2000; Minegishi et al., 2003; Porcher et al., 1996; Robb et al., 1995; Tsai et al., 1994). L'isoforme c du RUNX1 et le facteur de transcription HOXB4 participent à l'hématopoïèse définitive et sont exprimés par les CSH adultes (Antonchuk et al., 2002; Challen and Goodell, 2010; Ditadi et al., 2015; Ng et al., 2016; Teichweyde et al., 2018). Dans notre système, les BC présentent des niveaux élevés du facteur de transcription RUNX1c par rapport aux EB-CD144⁺ et CE-CSPh. Pour HOXB4, les trois populations expriment des niveaux élevés de ce facteur de transcription par rapport au foie fœtal humain. Il est toutefois surprenant que ce soit les CE-CSPh qui présentent les niveaux les plus élevés pour les trois lignées de CSPh, car elles ne génèrent pas des BC. Dans la littérature, aucun autre rôle d'HOXB4 dans l'endothélium à part la spécification hémogénique n'a été signalé. Cependant, la surexpression d'HOXB4 dans les CSEh ne génère pas seulement des cellules hématopoïétiques, mais aussi des CSM (Liu and Hematti, 2009). Une analyse dans ce domaine pourrait révéler de nouveaux rôles d'HOXB4 dans la lignée endothéliale.

Ainsi, l'ensemble de nos analyses *in vitro* ne sont pas concluantes quant au type de progéniteurs hématopoïétiques que nous générons, primitifs ou définitifs. Choi et al. ont déterminé que la présence ou l'absence des marqueurs CD235 et CD73 permet d'identifier les progéniteurs de l'hématopoïèse primitive (CD144⁺CD73⁻CD235a⁺) et définitive (CD144⁺CD73⁻CD235a⁻) (Choi et al., 2012). Nous avons analysé ces phénotypes chez les EB à 84h. Les EB-CD144⁺, qui donnent naissance à des cellules hématopoïétiques par l'intermédiaire des BC, ne coexpriment pas les CD73 (Figure A). Conformément à ces résultats, les CE-CSPh dérivées de ce progéniteur acquièrent le CD73 durant la différenciation endothéliale, étant une population sans capacité hémogénique. Une sous-population très minoritaire des EB-CD144⁺ coexprime le marqueur CD235a. Ainsi, la population prédominante est donc CD144⁺CD73⁻CD235a⁻, bien qu'il existe des progéniteurs d'une hématopoïèse primitive CD144⁺CD73⁻CD235a⁺. De plus, certaines études suggèrent également que l'expression du marqueur CD43 définit les progéniteurs de l'hématopoïèse primitive (Ditadi et al., 2015; Kennedy et al., 2012). Bien que le progéniteur EB-CD144⁺ n'exprime pas le marqueur CD43, plus de 90% de BC l'expriment.

Cette population de BC CD43⁺, est-elle dérivée du progéniteur CD144⁺CD73⁻CD235a⁺ ? Si c'était le cas, pourrions-nous favoriser l'hématopoïèse définitive à partir de CD144⁺CD73⁻CD235a⁻ en modifiant les conditions de culture ? La plupart des protocoles de différenciation hématopoïétique rapportent l'apparition des progéniteurs hématopoïétiques définitifs à partir du jour 5 de différenciation (Choi et al., 2012; Ditadi et al., 2015; Kennedy et al., 2012). De plus, les seuls protocoles qui ont généré des cellules hématopoïétiques qui reconstituent l'hématopoïèse chez la souris, sans surexpression des facteurs de transcription ou de coculture avec des cellules stromales, ont été faits à partir des EB à jour 16-17 (Féraud et al., 2016b; Guyonneau-Harmand et al., 2017). Nous proposons un protocole qui génère une population hématopoïétique seulement après 84 heures de différenciation. Néanmoins, ce temps de différenciation pourrait être suffisant pour la spécification des progéniteurs primitifs et définitifs, mais s'avérer trop court pour la maturation de la population CD144⁺CD73⁻CD235a⁻. Une culture plus longue en présence des facteurs hématopoïétiques ou de cellules stromales pourrait favoriser la génération des lignages définitifs à partir de la population CD144⁺CD73⁻CD235a⁻.

En outre, une analyse transcriptomique plus détaillée de ces cellules pourrait nous donner une idée plus claire de leur potentiel. C'est pourquoi nous préparons actuellement une analyse transcriptomique pour comparer les différentes populations générées par cette méthode par rapport aux populations endothéliales et hématopoïétiques du foie fœtal humain en collaboration avec la Dr E. Oberlin. Dans cette analyse, nous incluons la population CD144⁺CD45⁺ dérivée des BC afin d'établir la relation entre ces cellules et les progéniteurs hémogéniques humains définitifs décrits par E. Oberlin (Oberlin et al., 2010b).

Reconstitution hématopoïétique

La reconstitution hématopoïétique *in vivo* chez des souris immunodéficientes et irradiées est le seul outil à ce jour permettant de confirmer la présence de CSH dans une population cellulaire. En collaboration avec la Dr F. Louache, nous avons injecté des EB-CD144⁺ chez des souris NSG irradiées afin de confirmer leur potentiel de reconstitution hématopoïétique. Les souris NSG sont issues du croisement de souris NOD-SCID et de souris porteuses d'une mutation nulle de la chaîne gamma du récepteur à l'IL-2 (Shultz et al., 2005). Cette mutation inhibe la différenciation des NK et favorise la transplantation de cellules humaines (Shultz et al., 2005). Des études menées par l'équipe du Dr F. Louache et d'autres auteurs ont confirmé la pertinence de cette lignée pour la reconstitution hématopoïétique (Gori et al., 2015; Sugimura et al., 2017). Nos premières expériences de transplantation des EB-CD144⁺ par voie intraveineuse ont confirmé nos précédents résultats et ceux d'autres équipes qui reportent un échec des transplantations de CSH-CSPH injectées par voie intraveineuse (Féraud et al., 2016b; Wang et al., 2005). L'analyse *in vitro* a confirmé que ces cellules

expriment de très faibles niveaux de CXCR4, comme décrit par d'autres équipes (Reid et al., 2018), ce qui peut empêcher leur migration et le *homing* dans la moelle osseuse. Pour contourner ce problème, nous avons injecté les cellules directement dans le fémur des souris. Cette méthode nous a permis d'obtenir une reconstitution hématopoïétique 3 mois post-injection, bien que beaucoup plus faible par rapport aux cellules CD34⁺ du SCO. Nos résultats peuvent être expliqués par une quantité très réduite de CSH dans la population EB-CD144⁺. Si cela est vrai, nous pourrions augmenter le nombre de cellules injectées (certaines équipes ont rapporté des transplantations d'environ 1-2x10⁶ cellules ; Gori et al., 2015) et compte tenu des analyses par cytométrie en flux et par RTqPCR, l'injection de la population BC pourrait être plus pertinente puisqu'elle est plus hématogène.

Bien que ces résultats soient décourageants, ils s'inscrivent dans le contexte des résultats obtenus par d'autres équipes avec des CSH-CSPh (Demirci et al., 2020; Féraud et al., 2016b; Wang et al., 2005). De manière générale, un grand nombre d'études concluent que les cellules dérivées des CSPh ont souvent un phénotype embryonnaire ou fœtal (Baxter et al., 2015; Camp et al., 2015; Robertson et al., 2013; Shahjalal et al., 2018). Dans le cas des CSH, la colonisation du foie fœtal par les pré-CSH et les CSH est nécessaire pour leur expansion et leur maturation en CSH définitives (Oberlin et al., 2010b). La recréation de ces conditions *in vitro* pourrait favoriser l'acquisition d'un potentiel majeur de reconstitution hématopoïétique aux CSH-CSPh, en plus de permettre l'étude des mécanismes de ce processus. Aujourd'hui, il existe des protocoles permettant de différencier les CSPh en hépatoblastes (Chou and Lodish, 2010), composants essentiels de la niche hématopoïétique du foie (Caron et al., 2019). Ainsi, il est possible de proposer une coculture en 2D ou 3D de ces types cellulaires dérivés de la même lignée de CSPh. Le caractère immature attribué aux cellules du foie dérivées de CSPh confirme leur adéquation à un modèle de telles dimensions. En effet, les cellules du foie fœtal et pas celles du foie l'adulte pourraient être celles qui confèrent la maturation et l'expansion de CSH (Soares-da-Silva et al., 2020; Wang et al., 2020). Une complexité de ce système pourrait être résolu par l'ajout de CE-CSPh (Schweitzer et al., 1996) et de CSM-CSPh (Charbord and Moore, 2005), cellules de la niche hématopoïétique. Avec un tel modèle *in vitro* dérivé complètement des CSPh, on pourrait contourner l'utilisation actuelle de cellules stromales dans la différenciation hématopoïétique.

Définir l'indéfinissable : hémangioblaste, angioblaste, endothélium hémogénique ou mésangioblaste

Tout au long de notre étude, nous avons défini la population de EB-CD144⁺ comme un hémangioblaste grâce à ses propriétés bipotentes. Cependant et loin du débat sur son existence *in*

vivo, la définition de cette population et sa relation avec d'autres populations précédemment décrites comme angioblastes, endothélium hémogénique ou mésangioblastes requiert notre attention bien qu'il s'agisse d'une question aussi sémantique.

Selon les modèles d'hémangioblastes proposés dans la littérature, les hémangioblastes sont des progéniteurs bipotents qui donnent naissance à des CE et des cellules hématopoïétiques (Huber et al., 2004; Kennedy et al., 1997, 2007; Lu et al., 2007; Murray, 1932). La différenciation endothéliale est obtenue par la génération des progéniteurs endothéliaux, les angioblastes (Ambler et al., 2001; Asai et al., 2017). L'identification de l'endothélium hémogénique en tant que progéniteur de l'hématopoïèse primitive et définitive a introduit une confusion dans le terme hémangioblaste (Jaffredo et al., 1998; Oberlin et al., 2002; Tavian et al., 1996). Si la génération de cellules hématopoïétiques passe par un intermédiaire endothélial, l'hémangioblaste serait un progéniteur purement endothélial qui génère, entre autres, l'endothélium hémogénique. Il n'y aurait alors aucune différence entre l'hémangioblaste et l'angioblaste. Toutefois, ces définitions se rapportent à une entité cellulaire et non à une population. Nos analyses ont permis d'identifier une population cellulaire présente dans les EB à 84h caractérisée par l'expression de CD144, CD309, CD34, CD143 et CD31 et par l'absence de marqueurs hématopoïétiques CD43, CD41 ou CD45. Cette population se révèle bipotente puisqu'elle peut générer les lignages endothéliaux et hématopoïétiques. Cependant, nous n'avons pas analysé l'existence d'un vrai progéniteur bipotent à l'échelle unicellulaire. Les niveaux variables de CD31 au sein de cette population, exprimés par entre 20 et 70% des cellules CD144⁺, suggèrent qu'en effet, les EB-CD144⁺ sont un ensemble de progéniteurs endothéliaux, au sein duquel, il peut y avoir des cellules endothéliales hémogéniques. La présence de ces cellules endothéliales hémogéniques est confirmée non seulement par leur potentiel hématopoïétique, mais aussi par la présence de cellules à phénotype intermédiaire à la fois endothélial et hématopoïétique, CD144⁺CD45⁺ dans les BC et par l'expression de facteurs de transcription tels que RUNX1c.

D'autre part, certains auteurs ont défini *in vitro* une population de mésangioblastes, ou cellules d'origine mésodermique capables de générer, en plus des lignées endothéliales et hématopoïétiques, des cellules musculaires lisses et même des cellules musculaires cardiaques (Sampaolesi et al., 2003; Slukvin and Kumar, 2018). Sans aucun doute, l'isolement d'un progéniteur d'une telle importance est intéressant pour les applications thérapeutiques et l'ingénierie tissulaire. Cependant, au niveau sémantique, si le mésangioblaste est défini en tant qu'une population cellulaire, quelle différence existerait-il entre lui et le mésoderme latéral ? Nous n'avons pas étudié la différenciation des EB-CD144⁺ vers d'autres lignages, cependant, nous avons observé dans la différenciation endothéliale, dans certains cas, des populations cellulaires minoritaires ayant une morphologie mésenchymateuse et des agrégats cellulaires différents des BC en méthylcellulose. S'il est confirmé que ces cellules

correspondent à l'un des types de cellules mentionnés précédemment, il ne peut pas être exclu qu'elles proviennent des cellules contaminant la population EB-CD144⁺ purifiée. Des méthodes plus précises de tri cellulaire, par exemple, la cytométrie de flux pourraient confirmer ou non le caractère mésangioblastique de cette population.

Sommes-nous prêts pour les applications cliniques ?

Après 22 ans depuis l'isolement des premières CSEh (Thomson et al., 1998a) et 13 ans depuis les premières cellules somatiques reprogrammées en CSPih (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), sommes-nous prêts pour la thérapie cellulaire à partir des CSPh? Pour répondre à cette question, nous analysons les points clés à prendre en compte lors de la planification d'une thérapie cellulaire en portant une attention particulière à notre protocole.

Culture des CSPh

Les changements de conditions de culture des CSPh pourraient induire des altérations de leur caryotype et de leur potentiel de différenciation (Cho et al., 2018; Draper et al., 2004; Gokhale et al., 2015). C'est pourquoi nous avons décidé de cultiver les CSPh sur MEF avec un milieu sans sérum afin de pouvoir comparer nos résultats avec le protocole dont nous nous sommes inspirés (Lu et al., 2007) et avec les études précédentes menées dans notre laboratoire. Ces conditions de culture des CSPh, néanmoins, limitent la poursuite de leurs dérivés dans les applications cliniques car elles ne sont pas conformes aux BPF. Bien que les MEF soient utilisés depuis l'isolement des CSEh pour soutenir l'expansion des CSPh *in vitro* (Thomson et al., 1998a), la nécessité de conditions de culture *xeno-free* qui permettent une application clinique des dérivés des CSPh a encouragé l'identification de matrices extracellulaires et de milieux qui soutiennent l'expansion des CSPh en absence des couches nourricières. En ce qui concerne les matrices extracellulaires, la plus utilisée est le Matrigel ou le Geltrex provenant de tumeurs murines Engelbreth-Holm-Swarm (Xu et al., 2001a). Bien que leur composition favorise le maintien des CSPh *in vitro* en l'absence de milieux contenant du sérum, elles ne sont pas conformes aux BPF à cause de leur origine animale et leur composition inconnue. Il a été aussi prouvé que les protéines de l'ECM recombinantes telles que la vitronectine ou les laminines, des mélanges définies de protéines de l'ECM, ou des polymères synthétiques, maintiennent les CSPh en culture sans modifier leurs propriétés intrinsèques (Braam et al., 2008; Rodin et al., 2010; Shao et al., 2015). Comme preuve de concept, nous avons cultivé les CSPih sur la vitronectine avec un milieu sans sérum (StemMACS™ iPS-Brew XF). Le changement des conditions de culture a augmenté la différenciation spontanée des CSPih pendant les premiers passages et le passage enzymatique a été remplacé par un passage manuel. Après un mois, la différenciation endothéliale et hématopoïétique de ces cellules, selon le protocole décrit dans cette étude, a montré leur capacité à générer la

population de type hémangioblaste ainsi que sa descendance. Cependant, nous avons remarqué une plus grande variabilité entre les expériences de différenciation consécutives par rapport aux CSPih cultivées sur MEF (Figure A4). Malheureusement, en raison de contraintes de temps et d'argent, nous n'avons pas poursuivi ces expériences. En effet, la mise en place des conditions pour dériver et/ou cultiver des CSPih en conformité avec les BPF est coûteuse et longue. Différents paramètres peuvent alléger le coût de production de CSPih, comme la production à grande échelle, la maintenance sur des biomatériaux synthétiques ou la culture en 3D où les protéines de l'ECM ne sont pas nécessaires. Plusieurs auteurs ont rapporté la culture de CSPh sur des surfaces fonctionnalisées avec des peptides et des polymères synthétiques (Irwin et al., 2011; Klim et al., 2010; Villa-Diaz et al., 2010). C'est le cas de l'étude menée par Klim et al. qui, grâce au criblage à haut débit, ont identifié les peptides liant l'héparine pour le maintien et l'expansion *in vitro* des CSPh pendant une période pouvant aller jusqu'à 3 mois sans modification de leur phénotype (Klim et al., 2010). D'autres équipes ont rapporté l'utilisation d'interfaces d'hydrogels composés d'aminopropylméthacrylamide (APMAAm) ou de poly[2-(méthacryloyloxy)éthyl diméthyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxyde] (PMEDSAH) pour soutenir la culture de CSEh en l'absence de toute autre protéine de l'ECM, fournie avec des milieux sans sérum pour un maximum de 20 et 10 passages, respectivement (Irwin et al., 2011; Villa-Diaz et al., 2010). Cependant, il n'a pas été possible de déterminer clairement si ces surfaces pouvaient permettre l'isolement ou la dérivation des CSP *in vitro*.

La culture en 3D est une alternative à la culture en 2D en évitant le choix de la bonne ECM. Les CSPh peuvent être cultivées en suspension sous forme de sphéroïdes (Chen et al., 2012a; Olmer et al., 2012; Zweigerdt et al., 2011) ou encapsulés par des polymères qui favorisent leur agrégation même à partir d'une suspension initiale de cellules isolées (Siti-Ismail et al., 2008). Il a été démontré que les CSPh cultivées sous forme de sphéroïdes en suspension prolifèrent et maintiennent leur capacités pluripotentes (Chen et al., 2012a; Olmer et al., 2012; Zweigerdt et al., 2011). Afin d'augmenter leur survie et de favoriser la distribution de l'oxygène et des nutriments, ont été conçus des bioréacteurs à cuve agitée (Kropp et al., 2016c, 2016b). Les sphéroïdes peuvent être amplifiés après dissociation en cellules individuelles et réagrégation (Chen et al., 2012a). Bien que la culture CSPh en 3D puisse permettre l'expansion de grandes quantités de cellules indifférenciées en conditions GMP, la différenciation spontanée et l'élimination de ces cellules peuvent limiter l'utilisation de ces systèmes.

Différenciation des CSPh : 2D vs 3D

Dans notre étude, la différenciation des trois lignées de CSPh en mésoderme vasculaire a été réalisée par la formation d'EB en présence de cytokines et d'un agoniste de la voie WNT. Après 84h (3,5 jours), les cellules CD144⁺, représentant en moyenne 15% de la population totale, ont été purifiées (par colonne Miltenyi) et différenciées en cellules CE ou cellules hématopoïétiques. Cependant, la plupart des protocoles actuellement disponibles pour la différenciation endothéliale (y-compris l'endothélium hémogénique) induisent la formation du mésoderme vasculaire en cultivant les CSPh sur des surfaces recouvertes de Matrigel ou en présence des cellules stromales (Ditadi et al., 2015; Kennedy et al., 2012; Montel-Hagen et al., 2019; Patsch et al., 2015; Prasain et al., 2014; Sahara et al., 2014). Après 5 à 12 jours, selon le protocole, des progéniteurs endothéliaux et/ou hématopoïétiques représentant du 2 à 30% des cellules totales sont triés et amplifiées *in vitro* (Ditadi et al., 2015; Lian et al., 2014; Patsch et al., 2015; Prasain et al., 2014; Sugimura et al., 2017). Dans certaines études, les auteurs ont rapporté jusqu'à 70% de ces progéniteurs mais le tri cellulaire a également été suggéré afin d'obtenir une population endothéliale pure (Olmer et al., 2018; Patsch et al., 2015). Le choix de la différenciation en 2D a été largement préférée à la formation d'EB car elle permet aux CSPh une exposition homogène aux nutriments, à l'oxygène et surtout, aux cytokines conduisant, dans la plupart des cas, à une différenciation plus efficace (quantitativement) (McKee and Chaudhry, 2017; Sahara et al., 2014). En outre, la différenciation en 2D facilite le suivi par microscopie optique des populations tout au long du protocole de différenciation et la récupération de la suspension cellulaire. Cependant, elle nécessite la sélection d'un substrat approprié dans lequel les cellules sont cultivées, un choix qui peut entraver les applications ultérieures (McKee and Chaudhry, 2017). Comme dans le cas des CSPh, les protéines recombinantes et les biomatériaux ont démontré leur véritable utilité pour répondre aux exigences des BPF (Hou et al., 2017; Smith et al., 2017; Zhang et al., 2017). Il est intéressant de noter que l'utilisation de biomatériaux pourrait réduire ou éviter l'utilisation de cytokines, ce qui contribuerait à diminuer les coûts de production des cellules différenciées (Smith et al., 2017). Malgré ces résultats prometteurs, la culture en 2D implique l'utilisation de grandes surfaces pour obtenir le nombre de cellules nécessaires à la thérapie cellulaire chez l'homme (McKee and Chaudhry, 2017). Dans ce contexte, certains laboratoires travaillent au développement de systèmes automatisés et à grande échelle qui pourraient faciliter la production de cellules (Archibald et al., 2016; Bernard et al., 2004; Conway et al., 2015; Tristan et al., 2020).

D'autre part, Olmer *et al.* ont rapporté la production de $0,3 \times 10^9$ CE en utilisant une approche EB sur 3 erlenmeyers avec un total de 600 ml de milieu (Olmer et al., 2018). Les auteurs ont discuté le fait que, malgré que leur approche produit moins d'EC par CSPh ensemencées par rapport aux autres protocoles en 2D, l'obtention d'une quantité équivalente de cellules à partir d'une culture adhérente

nécessiterait l'utilisation de 17 flacons de culture T175, ce qui augmenterait les coûts de production des CE (Olmer et al., 2018). Ils ont également montré que leur méthodologie peut facilement être transposée à grande échelle dans des bioréacteurs à cuve agitée (Olmer et al., 2018). Ces dernières années, les études de biologie cellulaire ont mis en évidence la nécessité de complexifier les modèles *in vitro* qui récapitulent les interactions cellule-cellule et cellule-ECM observées *in vivo*. Au cours du développement, les signaux provenant des tissus environnants, les forces mécaniques imposées par l'ECM et les gradients d'oxygène et de cytokines configurent les organes et les tissus (Brickman and Serup, 2017; Fowler et al., 2020). Les systèmes de culture en 3D, y compris les EB, intègrent certains de ces éléments. La preuve en est que, même en absence de cytokines, des CE et des cellules hématopoïétiques sont observées dans les EB (Brickman and Serup, 2017; Levenberg et al., 2002b; Zambidis et al., 2005). Bien que l'efficacité des différenciations soit souvent limitée à cause du faible apport en nutriments et en oxygène au cœur des EB, la différenciation coordonnée en différents types cellulaires peut influencer la maturation des cellules d'intérêt, en plus de l'addition des cytokines qui peut améliorer les rendements. Dans les expériences d'Olmer et al., environ 70% des cellules dans les EB correspondraient aux CE, sans avoir requis au tri cellulaire (Olmer et al., 2018). Dans notre protocole, l'utilisation de l'agoniste de WNT nous a permis d'augmenter le pourcentage de la population CD144⁺ d'environ 2% à 15%, ce qui démontre qu'il est possible de guider la différenciation endothéliale dans l'EB. Dans notre cas, le faible rendement est causé probablement par la formation des EB à partir de petits amas de CSPh conduisant à une taille hétérogène. On peut s'attendre à ce que les cytokines atteignent plus difficilement les cellules au cœur des EB plus gros. Ces contraintes de diffusion pourraient limiter l'efficacité de la différenciation. L'utilisation de méthodes alternatives dans la production des EB, telles que le *hanging drop* ou les *spin-EB* à partir de suspensions de CSPh isolées, pourrait contourner ce problème en générant des EB plus petits et homogènes en taille (Kowalski et al., 2012; Ng et al., 2005, 2008). Enfin, en combinant la culture en 3D des CSPh et la formation en EB, la différenciation des CSPh serait simplifiée (Olmer et al., 2012; Steiner et al., 2010; Zweigerdt et al., 2011). Dans les études visant à cultiver des CSPh sous forme de sphéroïdes dans des bioréacteurs, la différenciation des EB a simplement été réalisée en changeant le milieu de culture, démontrant que cette méthodologie est facilement extensible pour la production en quantités industrielles de cellules différenciées en conformité avec BPF (Kropp et al., 2016b; Olmer et al., 2012; Steiner et al., 2010; Zweigerdt et al., 2011).

Tri cellulaire

Le tri des cellules a été largement utilisé en thérapie cellulaire conformément aux BPF pour la sélection, par exemple, des cellules CD34⁺ de la moelle osseuse ou du sang périphérique mobilisée pour la transplantation chez des patients atteints de maladies hématologiques (Jouault and

Beaujean, 1998). Concernant les CSP, cette technique assure la génération de populations cellulaires pures et empêche la greffe de sous-produits dangereux tels que CSP indifférenciées résiduelles qui peuvent produire des tératomes (Fowler et al., 2020). Dans notre système de différenciation, cependant, le tri cellulaire nécessite la dissociation des EB, une tâche difficile dépendante d'un traitement enzymatique et mécanique pour dissocier les fortes interactions entre les cellules. À la fin de ce processus, les cellules qui restent en amas sont éliminées pour procéder au tri cellulaire et d'autres mourront à cause de la procédure de dissociation rigoureuse. Après le tri cellulaire, les cellules CD144⁺ représentant environ 15% du total des cellules seront conservées. Ainsi, la combinaison de la dissociation des EB et du tri des cellules génère un nombre réduit de cellules, ce qui rend notre système peu efficace.

La dissociation enzymatique de certains types de cellules, y compris les CE, cultivées en conditions 2D s'étant avérée plus facile par rapport aux EB, certains auteurs ont rapporté la culture d'EB en conditions 2D pendant quelques heures ou quelques jours avant le tri des cellules (Sahara et al., 2014). Malheureusement, ces approches soulèvent de nouveau le besoin de ECM compatibles avec les BPF. Sahara *et al.* ont différencié les PSCh en progéniteurs mésodermiques par la formation des EB pendant 3 jours. Ces EB ont ensuite été engagés vers des progéniteurs vasculaires en les cultivant sur Matrigel pendant 4 jours supplémentaires, pour finalement trier les cellules CD144⁺CD31⁺ (Sahara et al., 2014). Bien qu'ils aient probablement augmenté le nombre de cellules disponibles par ce tri cellulaire, cette méthode n'a pas montré d'autres avantages par rapport à la différenciation directe des CSPh sur Matrigel. Les auteurs ont donc poursuivi les expériences avec un protocole de différenciation en culture complètement adhérente dès j0. Nous avons également essayé une variante de notre protocole de différenciation sur la fibronectine. Étonnamment, ces conditions n'ont pas modifié le pourcentage de cellules CD144⁺ positives obtenues après 84 heures de différenciation. Cependant, nous n'avons pas réussi à générer des BC à partir de cette population, ce qui suggère que la formation d'EB favorise la spécification d'un endothélium homogène. Néanmoins, le choix d'une ECM plus adéquate pourrait permettre d'obtenir un progéniteur bipotent à travers la différenciation des CSPh en 2D.

L'amélioration des méthodes de dissociation des EB à grande échelle pourrait être une solution pour augmenter la quantité des cellules différenciées obtenues ayant une bonne viabilité avant le tri cellulaire. Concernant notre protocole de différenciation, l'utilisation des antagonistes et agonistes de voies de signalisation, pourrait entraver la différenciation d'autres lignages indésirables et enrichir notre population d'hémangioblastes afin de compenser la perte par dissociation (Hill et al., 2010; Olmer et al., 2018; Patsch et al., 2015; Sahara et al., 2014). Olmer et al. ont démontré qu'il est possible d'obtenir un bon rendement de CE, par la formation des EB en utilisant l'activateur de la

protéine kinase A (>70%) (Olmer et al., 2018). D'autres auteurs ont utilisé du TGF- β pour inhiber la différenciation péricytaire et cardiaque et promouvoir la différenciation endothéliale (Patsch et al., 2015; Sahara et al., 2014). Cependant, lorsque l'on travaille avec une population bipotente, il existe le risque que de petits changements biaisent la différenciation ultérieure vers les lignées à différencier, dans notre cas, endothéliales ou hématopoïétiques.

Enfin, il existe la possibilité d'accepter et de tirer profit de la variabilité cellulaire au sein des EB. Les EB sont souvent composés de différents types de cellules. En thérapie cellulaire et dans d'autres applications, de nombreux types cellulaires sont requis. Des études précédentes ont décrit la co-différenciation des CE avec des lignages cardiaques (Palpant et al., 2017), péricytes (Orlova et al., 2014), cellules de muscles lisses (Patsch et al., 2015) ou même des cellules du rein (Takasato et al., 2015), toutes dérivées du mésoderme. La co-différenciation des lignages endothéliaux et de cellules du rein ont conduit à l'établissement d'organoïdes rénaux vascularisés entièrement dérivés des CSPh (Freedman et al., 2015; Homan et al., 2019b; Takasato et al., 2015). La coculture de péricytes, de cellules musculaires lisses et de CE peut être utile également pour la génération de greffons vasculaires (Generalì et al., 2019). Nous avons aussi décrit que la culture des EB dissociées générées par notre méthode, sans tri cellulaire préalable, génère une population d'environ 60% de CE avec un phénotype CD144⁺CD31⁺ et 40% de cellules exprimant des marqueurs mésenchymateux tels que CD90, CD146, CD73 ou CD105 (ces marqueurs sont partagés avec les CE mais les CSM n'expriment pas le marqueur CD144 ou le CD31) (Maleki et al., 2014). En l'absence de VEGF, nous avons réussi à obtenir une population homogène de ces cellules de type CSM très prolifératives. Ces cellules se sont révélées utiles pour l'établissement d'organoïdes du foie dérivés des CSPih. Par conséquent, maximiser l'utilisation des populations présentes au sein des EB peut ouvrir la possibilité de réduire les coûts de production des cellules différenciées à partir des CSPh.

Hétérogénéité des CSPh

Outre les limitations liées aux conditions de culture et de différenciation des CSPh, l'hétérogénéité entre les CSPh représente un problème lors de l'établissement de protocoles de différenciation reproductibles. La capacité de différenciation des CSPih a été liée à la mémoire épigénétique qu'elles peuvent conserver des cellules somatiques d'origine (Kim et al., 2010; Noguchi et al., 2018; Papp and Plath, 2013; Phetfong et al., 2016). Dans le cas des CSEh, l'hétérogénéité pourrait provenir de leur état amorcé qui privilège certains lignages cellulaires (Davidson et al., 2015; De Los Angeles et al., 2015; Weinberger et al., 2016). De plus, la variabilité génétique entre les CSPh pourrait contribuer aux différences entre les cellules différenciées (Kilpinen et al., 2017; Skelly et al., 2019). Afin de contourner ce problème, plusieurs auteurs ont signalé l'adaptation des protocoles de

différenciation selon la lignée de CSPh utilisée (Jahan and McCloskey, 2020). Cependant, en clinique, l'établissement de protocoles de différenciation personnalisés pourrait retarder leur transplantation et en augmenter les coûts de cette thérapie. D'autre part, la dérivation de cellules CSPh naïves pourrait éliminer complètement les marques épigénétiques des CSPih et diminuer la variabilité entre les CSPh. Aujourd'hui, plusieurs équipes ont réussi à induire l'état naïf dans les CSPh (Gafni et al., 2013; Hanna et al., 2010; Valamehr et al., 2014; Weinberger et al., 2016), cependant, les études transcriptomiques et épigénétiques révèlent aussi une hétérogénéité au sein de ces cellules (Messmer et al., 2019; Yan et al., 2013). Des études sur des CSE naïves murines ont démontré que, malgré leur état naïf, la variabilité génétique entre lignées continue à se traduire en différences du potentiel de différenciation (Ortmann et al., 2020).

Coût de la thérapie cellulaire.

Dans un des exemples de l'application des CSPh, nous avons mentionné la quantité de CE utilisées pour vasculariser un foie ou un rein de rat, soit environ 45×10^6 CE-CSPh (Ciampi et al., 2019; Takeishi et al., 2020). Imaginons combien de cellules seraient nécessaires pour un organe humain. En thérapie cellulaire, les essais cliniques avec les PEC actuellement en cours requièrent entre 20 et 360×10^6 des cellules, selon la méthode de transplantation et le poids du patient (Arici et al., 2015; De Rosa et al., 2013; Wang et al., 2007). Dans le cas de la greffe de moelle osseuse pour le traitement des maladies hématologiques, les patients reçoivent entre 120 et 160×10^6 cellules CD34⁺, selon l'étude (Jouault and Beaujean, 1998). La production d'un tel nombre de cellules à partir de CSPh nécessite un important investissement en temps et en argent. Ces deux paramètres peuvent être encore plus affectés si l'on considère une thérapie autologue qui inclut une reprogrammation des cellules somatiques du patient et même une correction génétique *in vitro* (Prescott, 2011). Il est estimé que le coût total de la production d'une lignée de CSPih en conformité aux BPF est d'environ 800 000\$ dans un processus qui nécessite entre 9 et 15 mois pour produire les quantités de cellules différenciées requises pour la thérapie cellulaire (Huang et al., 2019). S'il est vrai que la thérapie cellulaire avec des cellules dérivées des CSPh est très coûteuse, le traitement des maladies chroniques au cours de la vie d'un patient peut largement dépasser ce chiffre. Par exemple, dans le cas du diabète, le Royaume-Uni consacre 10% de son budget annuel de santé au traitement des patients atteints de diabète et de ses complications (Prescott, 2011).

Face à ces chiffres, la création de banques CSPih pourrait permettre de diminuer les coûts d'une telle thérapie cellulaire. Les transplantations allogéniques pourraient être assurées à partir d'un nombre réduit des lignées compatibles avec un grand nombre de patients. De plus, la caractérisation de CSPih au sein de ces banques pourrait permettre d'identifier les lignées avec un potentiel de

différenciation adéquat afin de maximiser la production de cellules différenciées souhaitées (Huang et al., 2019).

Maturation des cellules différenciées à partir des CSPh

Comme mentionné ci-dessus, une caractéristique commune de la plupart des types cellulaires issus de la différenciation des CSPh est leur niveau de maturation qui récapitule les fonctionnalités des cellules fœtales, mais pas celles des adultes (Baxter et al., 2015; Camp et al., 2015; Robertson et al., 2013; Shahjalal et al., 2018). Toutefois, des expériences *in vivo* suggèrent que ces organoïdes peuvent atteindre un niveau de maturité similaire aux organes adultes (van den Berg et al., 2018; Doulatov et al., 2013; Dye et al., 2016; Kobari et al., 2012; Mansour et al., 2018a; Ramanathan et al., 2015; Watson et al., 2014b). L'objectif ultime de la thérapie cellulaire exige que ces cellules soient injectées à des patients dont l'homéostasie tissulaire est, souvent, altérée. Dans ces circonstances, les cellules issues des CSPh pourraient-elles acquérir les caractéristiques de cellules physiologiques matures ou acquerraient-elles des propriétés pathologiques qui compliqueraient l'état de santé de l'hôte ? L'alternative est donc d'identifier les mécanismes qui conduisent à la maturation de ces cellules *in vivo* afin de pouvoir induire la maturation *in vitro*. La dérivation d'organoïdes à partir des CSPh s'est avérée utile étant un système en 3D complexe qui représente mieux les caractéristiques des organes que la culture classique en 2D (Liu et al., 2018; Logan et al., 2019; Yabe et al., 2017). Ainsi, une étude récente avec des progéniteurs hématopoïétiques a montré la génération de lymphocytes T avec des caractéristiques adultes après la coculture avec des cellules stromales en 3D (Montel-Hagen et al., 2019). La culture de progéniteurs hépatiques dérivés des CSPh en 3D a permis d'obtenir des hépatocytes plus matures que ceux issus des protocoles classiques de différenciation en 2D (Meier et al., 2017). Cependant, dans les nombreux exemples d'organoïdes dérivés des CSPh, la diffusion des nutriments et de l'oxygène est le facteur limitant de leur survie et de leur prolifération (Amiri et al., 2018; Camp et al., 2017; Dye et al., 2016). La vascularisation de ces organoïdes est proposée comme la réponse à cette problématique en plus de jouer un rôle très important dans la maturation des types de cellules comme elle le fait *in vivo* pendant l'organogenèse (Vargas-Valderrama et al., 2020).

Comme preuve de concept, nous avons effectué une coculture des CE-CSPih avec des hépatoblastes dérivés de la même lignée de CSPih en collaboration avec l'équipe du Dr A. Dubart-Kupperschmitt sans utiliser de protéines de l'ECM. Sans aucun doute, établir les conditions de coculture qui favoriseraient la différenciation de toutes les lignées cellulaires, à savoir les hépatocytes, les cholangiocytes et les LSEC a été un défi. Lors de l'établissement des conditions de

coculture, nous avons pu observer une agrégation réduite et instable. Comme les cellules d'origine mésenchymateuse ont été décrites dans le parenchyme hépatique (Kholodenko et al., 2019), nous avons décidé d'incorporer cellules de type CSM dérivées de la même lignée CSPih. L'ajout de seulement 5% de ces cellules à la coculture totale a permis de générer des sphéroïdes plus stables. Bien que nous ne connaissions pas le mécanisme par lequel ces cellules induisent la réorganisation et la stabilisation de ces organoïdes, les analyses de coupes des organoïdes ont révélé la présence des CSM à l'intérieur des organoïdes à jour 10. L'ECM est cruciale pour la migration, l'organisation et le maintien des populations cellulaires (Hansen et al., 2015). La caractérisation de cette ECM pourrait nous aider à comprendre les mécanismes qui régissent l'auto-organisation de ces organoïdes et l'interaction entre les composants cellulaires et l'ECM.

D'autre part, après 10 jours de coculture, en plus des CE, des populations d'hépatocytes et de cholangiocytes, les lignages hépatiques définitifs issus des hépatoblastes étaient visibles. Bien que d'autres auteurs aient signalé la dérivation d'organoïdes hépatobiliaires à partir de CSPh contenant des hépatocytes et des cholangiocytes (Guan et al., 2017; Wu et al., 2019), à notre connaissance, aucun travail n'a signalé l'incorporation de CE. L'albumine a été détectée dans le cytoplasme et dans le milieu de culture attestant la maturation des hépatocytes. Les niveaux d'albumine sécrétés dans le milieu ont augmenté progressivement jusqu'au jour 10 étant significativement plus élevés que le contrôle. Les cholangiocytes ont été détectés grâce à l'expression d'ASBGT formant des réseaux à l'intérieur des organoïdes. Ainsi, nos résultats montrent que notre système de coculture favorise la maturation des lignages hépatiques. Les CE-CSPh ont également été détectées à jour 10 par RTqPCR et immunohistochimie. Nous avons détecté des transcrits propres au LSEC tel que *LYVE*, *F8* ou *STAB2*. Malgré la présence de ces cellules dans les organoïdes, nous n'avons pas mis en évidence la formation d'une structure capillaire à l'intérieur, bien que nous ayons observé un certain alignement des CE-CSPh. Ces résultats attirent notre attention puisque les CE-CSPh ont montré une participation dans l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*. Les facteurs de croissance ajoutés pour favoriser la différenciation des hépatoblastes tels que l'HGF et l'oncostatine M, favorisent également l'angiogenèse. Cependant, la dexaméthasone, qui participe à la maturation des hépatocytes (Michalopoulos et al., 2003), a été décrit également comme un agent inhibiteur de l'angiogenèse médié par la diminution de l'inflammation (Nakao et al., 2007). Néanmoins, une étude *in vivo* a révélé que l'ajout de VEGF avec la dexaméthasone peut compenser ses effets anti-angiogéniques (Patil et al., 2007). D'autres auteurs ont montré qu'il est possible de générer un réseau vasculaire dans les organoïdes du foie à partir des HUVEC ou des CE-CSPh en présence de la dexaméthasone (Takebe et al., 2013, 2017). Leur transplantation chez la souris a démontré que ce réseau peut se

connecter au réseau vasculaire de l'hôte. Cependant, au contraire de notre système, ils ont utilisé le Matrigel pour générer des organoïdes (Takebe et al., 2013, 2017).

Compte tenu de l'importance du flux sanguin, en particulier de la force de cisaillement (Galie et al., 2014), dans la formation et le maintien des vaisseaux sanguins, nous émettons l'hypothèse que l'incorporation d'un flux dans notre système favoriserait la formation d'un réseau vasculaire au sein des organoïdes. Plusieurs auteurs ont proposé des méthodes pour cultiver les organoïdes sous flux (Homan et al., 2019a; Sidar et al., 2019). Homan *et al.* ont démontré que la culture sous flux des organoïdes du rein augmente la prolifération des CE et induit la formation d'un réseau vasculaire entouré par des péricytes (Homan et al., 2019a). Skylar-Scott et al. ont bio-imprimé de la gélatine sur un tissu compact formé par des EB ou des organoïdes cardiaques. La fusion de la gélatine à 37°C a générée des canaux pouvant être recouverts par des HUVEC et soumis aux flux sanguins à l'intérieur. Ce système est une preuve de la génération des tissus vascularisés de grande taille (4 mm) à partir des unités d'organoïdes dérivés partialement à partir de CSPh (Skylar-Scott et al., 2019).

Finalement, ce système de foie pourrait être utilisé pour étudier les interactions entre pré-CSH et CSH-CSPh à travers, par exemple, la coculture des EB-CD144⁺ ou des BCs dérivés par notre méthode et les hépatoblastes. Cette coculture pourrait également être utile pour incorporer les macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer d'origine hématopoïétique (Dixon et al., 2013). Ainsi, à partir des deux progéniteurs bipotents dérivés d'une seule lignée des CSPih, on pourrait envisager un système multicellulaire complexe en 3D.

Les essais cliniques en cours confirment la sécurité de ces cellules *in vivo*, l'avenir des CSPh en clinique semble prometteur. L'utilisation des CSPh en combinaison avec les technologies d'édition génique telles que CRISP-Cas9 et les progrès en matière de l'ingénierie tissulaire et de biomatériaux, permettront dans les années à venir d'établir des protocoles plus efficaces et moins coûteux. Dans le même temps, la biologie cellulaire évolue vers la création de systèmes biologiques *in vitro* complexes. Dans ces systèmes, l'assemblage de divers types de cellules dérivées de la CSPh pourrait contribuer à leur maturation sans avoir besoin de cellules stromales.

ANNEXES

Annexes

Annexe I : Figures supplémentaires

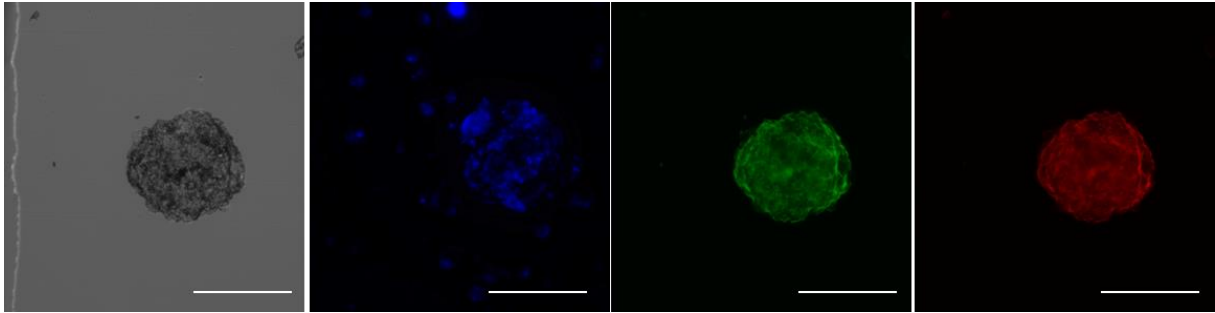


Figure A1. Sphéroïdes de CE-CSPih. Images représentatives au microscope à contraste de phase et fluorescence des sphéroïdes de CE-CSPih. Dapi en bleu, CD31 en vert et CD144 en rouge. Barre d'échelle :75 μ m.

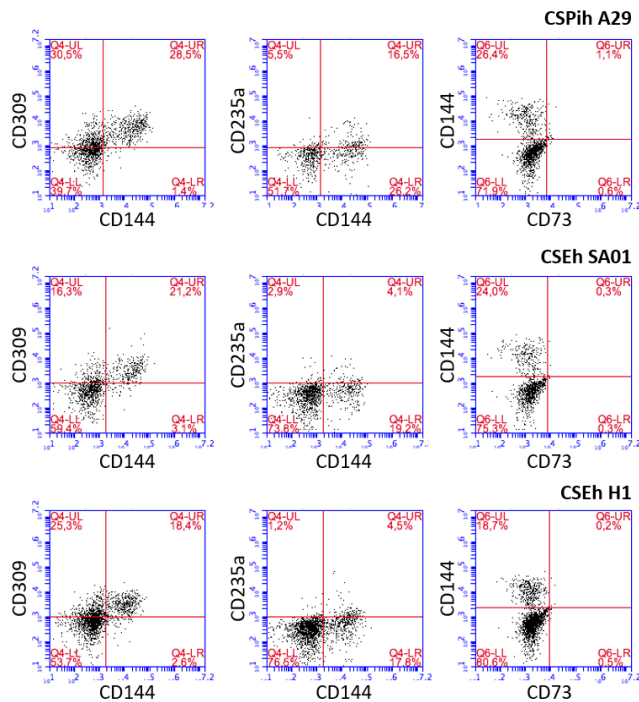


Figure A2. Analyse par cytométrie de flux des EB à 84h. Images représentatives de l'analyse par cytométrie des populations $CD144^+CD309^+$, $CD144^+CD235a^+$ et $CD144^+CD73^+$ des EB à 84h pour chaque lignée de CSPh.

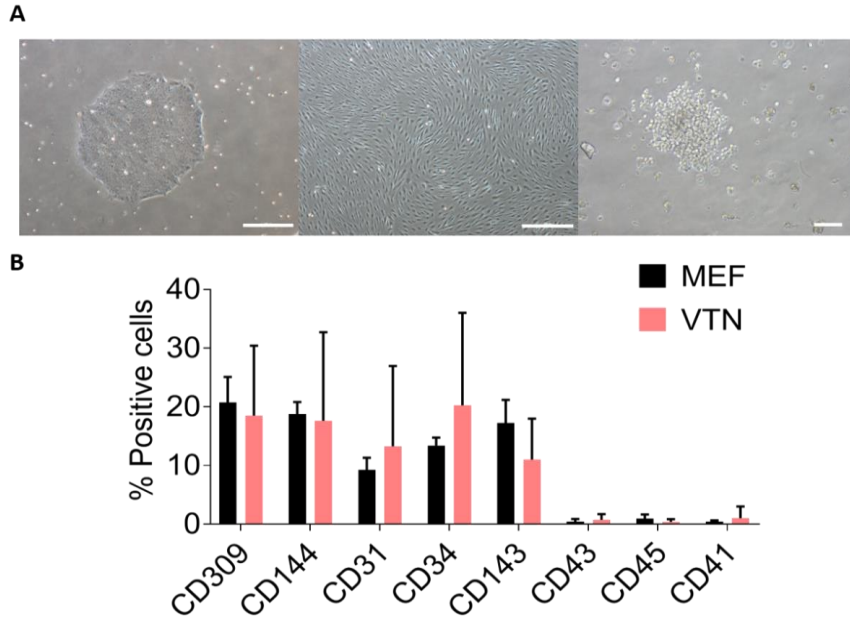



Figure A3. Différenciation des CSPih cultivées sur vitronectine (VTN). **A.** Images en phase-contraste d'une colonie de CSPih cultivée en vitronectine, des CE et des BC dérivées à partir de ces cellules. Barre d'échelle pour la colonie de CSPih et pour les CE-CSPih : 500 μ m et barre d'échelle pour les BC : 100 μ m. **B.** Analyse par cytométrie de flux des EB à 84h de différenciation, dérivées des CSPih cultivées sur MEF et VTN.



The endothelium, a key actor in organ development and hPSC-derived organoid vascularization

Alejandra Vargas-Valderrama^{1,2*} , Antonietta Messina^{2,3}, Maria Teresa Mitjavila-Garcia^{1,2†} and Hind Guenou^{1,2,4†}

Abstract

Over the last 4 decades, cell culture techniques have evolved towards the creation of in vitro multicellular entities that incorporate the three-dimensional complexity of in vivo tissues and organs. As a result, stem cells and adult progenitor cells have been used to derive self-organized 3D cell aggregates that mimic the morphological and functional traits of organs in vitro. These so-called organoids were first generated from primary animal and human tissues, then human pluripotent stem cells (hPSCs) arose as a new tool for organoid generation. Due to their self-renewal capacity and differentiation potential, hPSCs are an unlimited source of cells used for organoids. Today, hPSC-derived small intestinal, kidney, brain, liver, and pancreas organoids, among others, have been produced and are promising in vitro human models for diverse applications, including fundamental research, drug development and regenerative medicine. However, achieving in vivo-like organ complexity and maturation in vitro remains a challenge. Current hPSC-derived organoids are often limited in size and developmental state, resembling embryonic or fetal organs rather than adult organs. The use of endothelial cells to vascularize hPSC-derived organoids may represent a key to ensuring oxygen and nutrient distribution in large organoids, thus contributing to the maturation of adult-like organoids through paracrine signaling.

Here, we review the current state of the art regarding vascularized hPSC-derived organoids (vhPSC-Orgs). We analyze the progress achieved in the generation of organoids derived from the three primary germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) exemplified by the pancreas, liver, kidneys and brain. Special attention will be given to the role of the endothelium in the organogenesis of the aforementioned organs, the sources of endothelial cells employed in vhPSC-Org protocols and the remaining challenges preventing the creation of ex vivo functional and vascularized organs.

Keywords: Endothelial cells, Vascularized organoids, hPSCs, Liver, Kidney, Brain, Pancreas

* Correspondence: alejandra.vargas-valderrama@inserm.fr

† Maria Teresa Mitjavila-Garcia and Hind Guenou contributed equally to this work.

¹INSERM UMRS-MD 1197, Université Paris Sud-Université Paris-Saclay. Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

²DHU Hépatinov, Villejuif, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

In the twentieth century, the isolation and in vitro maintenance of animal and human tissues led to the establishment of most of the current cell culture techniques. In vitro two-dimensional (2D) cell culture has become widely used for fundamental cell biology research and preclinical testing. However, during recent decades, diverse studies have shown that 2D cell cultures are not fully representative of the in vivo responses of tissues and organs [1–3]. Cells growing in monolayers on a flat and rigid surface do not experience the highly complex three-dimensional (3D) environment that modulates cellular behavior and organ development through the highly complex cell-extracellular matrix (ECM) and cell-cell interactions [1, 3]. As an alternative, new cell culture techniques aiming to grow 3D cellular structures have been developed [1, 4]. At the end of the twentieth century, several publications adopted the term *organoids* to refer to 3D cell aggregates derived from animal and human cells and tissues with in vitro organ-like structures and functions [2, 5]. Despite numerous promising results [5], the shortage of human tissues and the difficulty in accessing them, together with the great heterogeneity among donors are limiting factors in the establishment of organoids from primary human cells to use as in vitro models of human organs.

The isolation of human embryonic stem cells (ESCs) in 1998 [6] and the consequent derivation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from adult somatic cells [7, 8] in 2007 revealed new virtually unlimited sources of cells for organoid generation thanks to the self-renewal capacity of these cells and their potential to differentiate into the three germ layers. Since then, the term organoid has been redefined to include the new sources of cells employed in organoid generation (human pluripotent stem cells (hPSCs), hESCs and hiPSCs, and adult stem cells) [9]. Hence, organoids can be defined today as 3D cell aggregates derived from stem cells or organ progenitors that are able to differentiate into organ-specific cell types and self-organize into structures mimicking the in vivo tissue arrangement, compartmentalization and functionality [2, 5, 10]. To date, hPSC-derived organoids (hPSC-Orgs) have been generated that resemble the small intestine [11], kidneys [12], brain [13], liver [14], pancreas [15], and others. These organoids are considered a promising model suitable for studying the mechanisms underlying human development, drug discovery, modeling diseases and regenerative medicine [9, 16, 17]. However, two main limitations remain: i) the size of the organoids is limited to a couple of millimeters due to the passive diffusion of nutrients and oxygen that threatens the survival of the cells at the organoid core, and ii) the functionality of hPSC-Orgs remains immature and resembles embryonic and fetal tissues rather than adult organs, probably due to missing developmental cues that are still unknown [13, 15, 18].

Endothelial cells (ECs) may play a key role in overcoming the aforementioned limitations.

Here, we review the progress achieved in the generation of hPSC-Orgs derived from the three primary germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm), which are exemplified by the pancreas, liver, kidneys and brain. We discuss the role of ECs during tissue and organ development, and we analyze the state of the art in vascularized hPSC-Orgs (vhPSC-Orgs), the source of ECs employed for this purpose and the challenges remaining in the creation of ex vivo functional and vascularized organs.

hPSC-derived organoids and lack of maturation

Most current hPSC differentiation protocols are based on the events of in vivo embryonic development that lead to organ formation [18]. Addition of exogenous cytokines at a precise dose and time drives sequential differentiation of hPSC into a germ layer, which followed by organ-specific cell lineage commitment and cell maturation. The latter is crucial for obtaining fully functional cell types representative of in vivo human adult tissues [9]. Although there have been great advances in understanding the regulatory mechanisms underlying organogenesis, many of these are still elusive. Hence, hPSC-derived cells often have embryonic or fetal-like characteristics that are far from the much-desired mature adult cells [19–21]. The derivation of hPSC-Orgs and the consequent generation of a complex three-dimensional environment have been shown to improve the differentiation and maturation of numerous cell types [9, 15, 19, 22]. However, transcriptomic and functional analysis revealed that hPSC-Orgs are more closely related to human fetal organs [23–25], and this is true even in long-lasting cultures, such as cerebral (> 3 months of culture) [26, 27], small intestine (> 2 months) [28] or kidney organoids (> 1 month) [29].

To overcome this limitation, hPSC-Orgs of the brain [30], kidney [31], small intestine [28] or lungs [32] have been transplanted into immunodeficient mice. An increase in the size of the transplanted organoids compared to the in vitro control was observed in all these independent studies. Interestingly, brain organoids only survived in vivo when they were vascularized by the host, and their growth coincided with the beginning of organoid vascularization [30]. Perfused blood vessels of mouse origin were also found in transplanted kidney, intestine or lung organoids [28, 31, 32]. All the hPSC-Orgs showed a higher maturation in vivo, as evidenced by the following: functionality (e.g., Ca^{2+} pattern or neuronal activity in transplanted cerebral organoids resembled early postnatal brain, while in vitro organoids represented an earlier embryonic stage), structural organization (e.g., highly organized pseudostratified epithelium polarized with apical and basal surface similar

to adult airways were only observed in transplanted lung organoids), increased expression of markers of maturation (e.g., transplanted intestinal organoids showed an increased mRNA and protein expression markers of differentiated enterocytes, Paneth, enteroendocrine and goblet cells) and/or differentiation of cell populations not observed in the *in vitro* organoids (e.g., fenestrated glomerular endothelium in the transplanted kidney organoids) [28, 30–32]. These results highlight the absence of all the necessary signals for proper maturation of the hPSC-Orgs *in vitro*. It may also be argued that *in vivo* organoid maturation is a consequence of longer *in vivo* survival (between 6 weeks and 8 months) compared to that of normal *in vitro* organoid cultures (between 15 and 40 days). However, prolonged cultures of similar length as transplanted organoids did not show the same maturation state than *in vivo* organoids of the small intestine [28], brain [30] or kidney [31] and the two latter, exhibited necrosis, expression of stress markers and reduced growth, probably due to insufficient oxygen and nutrient diffusion *in vitro* [13, 29–31]. Incorporation of ECs into organoids and the consequent *in vitro* vascularization could help organoid maturation in two ways: i) by favoring longer survival of organoid cultures thanks to the active distribution of oxygen and nutrients throughout the organoids and ii) by paracrine support of the differentiation and maturation of organ-specific cell types.

Role of endothelial cells in the development of tissues

The cardiovascular system is the first functional organ developed during human embryogenesis beginning at approximately the third to fourth week of gestation in humans [33–35]. The formation of blood vessels and subsequent blood flow ensure the survival and development of the embryo. Far from being mere pipes supplying oxygen and nutrients to all the organs and tissues throughout the body, blood vessels are lined by a layer of mesodermal epithelial cells called endothelial cells that participate actively in several physiological processes, including organogenesis. Two nonexclusive mechanisms are responsible for tissue and organ vascularization: vasculogenesis and angiogenesis [36]. Vasculogenesis is the *de novo* formation of blood vessels from endothelial progenitors, the angioblasts, which converge to form a capillary plexus. This process is principally active during the first stages of embryogenesis. In contrast, angiogenesis is the process by which new blood vessels sprout from pre-existing vessels, and it is dominant in later stages of the embryonic development and in the adult stage [36]. In the kidneys, the first blood vessels sprout from the dorsal aorta and the common iliac artery as soon as the uretic bud (UB) invades the metanephric mesenchyme (MM) at E11.5 in mice. This

process is followed by the association of all the artery stems to form the renal artery at E15.5 [37]. In addition, some studies suggest that *in situ* angioblasts may contribute to the formation of nephron capillaries that will next fuse to the kidney vasculature [38, 39]. In contrast, the central nervous system (CNS) remains avascular until the formation of the neural compartment. In mice, from E8.5 to E10, the perineural plexus (PNVP) surrounds the developing CNS without invading it. At E11.5, the periventricular plexus (PVP) branches into the subventricular zone (SVZ). The PNVP invades the neocortex at E12.5, and the new vessels fuse with the previously formed capillaries that are of PNVP origin [40, 41].

This close proximity between the endothelium and the nascent organs suggests an important role of ECs in the maturation and patterning of tissues and organs. In 2001, Lammer et al. [42] studied the role of the endothelium in the differentiation of pancreatic β -cells responsible for insulin production. An *ex vivo* coculture of isolated murine endoderm explants with different tissues showed that only the presence of the aortic endothelium enhanced insulin production in scattered cells. VEGFR-2 (Flk1, CD309 or KDR)^{-/-} mouse embryos, which lack blood vessels, formed a dorsal pancreas, confirmed by the presence of pancreatic progenitors (Pdx1-positive cells), but fail to grow and differentiate [43]. As a result, the dorsal pancreatic bud did not develop, the number of Pdx1-positive cells decreased over time, and no insulin nor glucagon were detected in the mutant embryos. Interestingly, the ventral pancreas showed a similar phenotype in mutant mice compare to the wildtype, suggesting ECs play an important role in the development of the dorsal but not of the ventral pancreas [43]. In addition, ectopic expression of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in the stomach epithelium resulted in hypervascularized areas where insulin-expressing pancreatic cells were observed [42].

The same year, Matsumoto et al. [44] detected the presence of CD31 (PECAM-1)⁺VEGFR-2⁺ ECs within the septum transversum specifically located next to the nascent hepatic cells. Using VEGFR-2^{-/-} mouse embryos and *ex vivo* tissue culture, the authors demonstrated that ECs not only contribute to the formation of future liver sinusoidal capillaries but also are necessary for the migration and outgrowth of the liver bud into the surrounding mesenchymal tissue. ECs have also been shown to induce hepatic specification from the endoderm as a result of the cell-cell interactions between hepatic progenitors and ECs; the latter is induced by inhibition of the Notch and WNT signaling pathways [45]. In addition, the growth of mature bile ducts alongside the vein from the core of the liver lobes towards their periphery suggests crosstalk between cholangiocyte progenitors and portal vein cells (ECs and perivascular cells) [46].

In the neocortex, the cerebral endothelium has been shown to play an active role during embryonic neurogenesis [47], favoring the differentiation of progenitors into neurons [48] and synthesizing ECM to allow neuron migration [49]. Other studies suggest that ECs may exert a niche function participating in the maintenance and self-renewal of both embryonic and adult neural stem cells (NSCs) [47], particularly at the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ), which is caused by the secretion of soluble factors (e.g., BDNF) [50] and ECM [51], cell-to-cell interactions [52] and the transport of stem cell-supporting substances through the bloodstream [53].

Finally, organotypic vasculature adapts to organ-specific nutrient and oxygen requirements and functionality, generating great heterogeneity along the endothelium. Together with Kupffer cells, liver sinusoidal ECs (LSECs) work as scavenger cells, taking up a variety of soluble macromolecular waste products presents in the blood (e.g., fragments of collagen, hyaluronan and oxLDL), through receptor-mediated endocytosis. For this process, the liver sinusoidal capillaries have adapted with fenestrations and lack an underlying basal lamina, that is a porous endothelial barrier, which assures that solutes and colloids are delivered to the liver lobes [54]. Similarly, in the kidney, the cross talk of podocytes (i.e., glomeruli epithelial cells), stromal cells and ECs generate morphologically adapted blood vessels. Thus, fenestrated capillaries without diaphragms participate in blood filtration at the glomeruli; peritubular capillaries that surround the nephron tubule and the ascending vasa recta, which are characterized by a fenestrated endothelium with diaphragms, contribute to reabsorption of water and electrolytes; and the descending vasa recta is lined by a continuous endothelium that tightly regulates the exchange of nutrients, water and gases [55]. In contrast, the ECs lining blood capillaries of the cerebral parenchyma are highly specialized cells constituting the blood brain barrier (BBB) which prevents the free passive flow of potentially harmful substances from the bloodstream to the brain. Brain or cerebral ECs (BECs or CECs) of the BBB are polarized cells characterized by complex tight junctions (TJs), principally ZO-1, claudins and occludins, membrane solute carriers and ABC-type efflux transporters. CECs are surrounded by a basement membrane, astrocyte cytoplasmic extensions and pericytes and have an estimated total surface coverage of 99%. Dysfunctional ECs appeared to contribute to the development and maintenance of pathological phenotypes such as cerebral ischemia [56] or neurological disorders [57, 58].

Pancreas organoids and vascularization

Several different protocols for β -cell differentiation from hPSCs have been published, yet they all yield immature cells that produce low levels of insulin regardless of the

chosen 2D [59, 60] or 3D [15, 61] approach [21]. In 2014, Jaramillo et al. showed that a 2D coculture of hESC-derived pancreatic progenitors (PPs) with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and rat heart microvascular endothelial cells (RHMVECs) could improve PP maturation, as evidenced by higher insulin levels than what was observed in mono-cell culture or fibroblast-PP coculture. Remarkably, PP endothelial-mediated maturation was more efficient when ECs and PPs were in direct contact, suggesting a cell-to-cell interaction as the basis of β cell differentiation [62].

The first attempt to generate vascularized pancreatic organoids was reported by Takahashi et al. in 2018. Murine β cells (MIN6) [63, 64] and human isolated islets [14] formed pancreatic organoids by self-condensation together with HUVECs and mesenchymal stromal cells (MSCs). After 4 days of coculture on a Matrigel coated dish, MSC-mediated condensation of 3D self-organized aggregates was obtained. Remarkably, after being transplanted in mice, only organoids containing HUVECs developed microvasculature that was connected to the host circulatory system. Compared to the mono-culture control, the mRNA expression of multilineage human organoids was more similar to that of freshly isolated adult islets. In addition, vascularized islets outperformed non-vascularized islets in an immunodeficient mouse model of fulminant diabetes. The levels of human insulin in blood and glucose-responsive insulin secretion were higher for mice injected with coculture organoids than they were for monoculture controls.

Despite these encouraging results with primary cells, to the best of our knowledge, only one protocol for vascularizing hPSC-derived organoids has been published since then. Candiello et al. generated self-organized organoids from hPSC-derived PPs and HUVECs grown on a hydrogel. The addition of HUVECs reduced the rate of aggregation of the spheroids and their compaction. However, ECs, characterized by the expression of von Willebrand factor (vWF), did not form endothelial networks but appeared to increase the differentiation of PPs into β -cells, as evidenced by the upregulation of pancreatic islet-specific genes, PDX1 and NKX-6.1, and the β -cell insulin gene INS. The analysis of ECM proteins revealed that HUVEC-containing organoids possessed a homogeneous ECM distribution composed of Laminin, Fibronectin and Collagen IV present at both the core and the periphery of the organoids, whereas the ECM in HUVEC-devoid organoids was scarce and constrained to the outer layer of the aggregates [65].

Liver organoids and vascularization

In 2013, Takebe et al. generated the first vascularized liver buds (LB) comprising hiPSC-derived hepatic endoderm, HUVECs and bone marrow MSCs. Following a

similar approach to the one used for generating pancreatic organoids, the coculture of these three lineages on Matrigel resulted in the formation of self-organized 3D spheroids where CD31⁺ vascular networks were visible after 6 days of culture. Although these hiPSC-LBs had a fetal transcription profile, their structural configuration more closely resembled that of adult human liver than what was achieved by human hepatocytes derived from hiPSCs through other methods [66, 67]. In vivo, in a cranial window mouse model, the transplanted hiPSC-LBs underwent further maturation as confirmed by the presence of albumin positive cells (by flow cytometry) and by the detection of secreted human albumin in the serum of mice (by ELISA) 45 days after transplantation. More interestingly, 48 h after transplantation, anastomosis between human and mouse blood vessels was evident, and the resulting new vessels (12 μ m in diameter) were perfused by the host [64, 67, 68]. The survival of ECs in vivo and their supportive role in hepatocyte transplantation have also been shown by other teams in a rat model of acute liver failure [32, 33] and implants of LBs under the kidney capsule of immunodeficient mice [69]. In all these studies, the control hiPSC-LB lacking ECs failed to engraft.

Other approaches attempting to vascularize LBs have been based on the use of human adipose microvascular endothelial cells (HAMECs) as a source of human ECs [70]. Recently, some studies have succeeded in generating LBs entirely from hPSCs by either a codifferentiation approach [71] or an independent differentiation of hPSCs into ECs, MSCs and hepatoblasts and their subsequent coculture [72–74]. Similar to HUVECs and HAMECs, hPSC-derived ECs have been shown to improve the maturation of hepatocytes and the engraftment of hPSC-hepatocytes in in vivo models (Ramanathan et al. 2015) [70–72, 75]. Their characterization is, in most cases, limited to the panendothelial markers VEGFR-2, CD144 (VE-Cadherin) and CD31, which hampers further comparison among the different published studies. Transcriptomic analysis of hiPSC-LBs derived by Takebe et al. revealed a heterogeneity of ECs within the resulting LBs, suggesting that ECs undergo further endothelial differentiation during coculture [24].

Recently, Goulart et al. showed that the source of ECs and MSCs used for the formation of hPSC-LBs could significantly modify the functionality of the liver organoids. Notably, they observed a higher hepatic metabolic rate in hPSC-LBs composed of hPSCs-derived ECs and dental pulp-derived MSCs (dpMSCs) compared to hPSC-LBs formed by human aortic endothelial cells (HAECs). Proteomic analysis of four different types of hPSC-LBs (HAEC/dpMSCs; HAEC/hPSC-derived MSCs; hPSC-derived ECs/dpMSCs and entirely hPSC-derived

LB) revealed differences in the WNT and TGF- β pathways among the four groups. The high TGF- β expression in HAECs was related to impaired hepatocyte differentiation from hepatoblasts as shown by a decrease in hPSC-LB albumin production, which was probably caused by remodeling of the ECM [73]. In accordance with this, Kouji et al. showed that hPSC-derived LSECs and hPSC-derived MSCs improved expansion, maintenance and metabolic rate of hPSC-derived hepatocytes compared to that of their primary counterparts (HUVECs and MSCs) in a 2D-coculture [74].

Kidney organoids and vascularization

Protocols for the formation of hPSC-derived kidney organoids rapidly included hPSC-derived ECs, probably because of their shared mesoderm origin with UBs and MMs, allowing their codifferentiation. In 2014, the studies carried out by Taguchi et al. [76] combining in vivo lineage tracing in mouse embryos, ex vivo cell culture of mouse kidney progenitors and differentiation of mouse and human PSCs defined the basis for in vitro differentiation of hPSCs into kidney cell lineages and organoid formation. Their developmental approach generated embryoid bodies (EBs) and kidney hPSC-Orgs containing nephric tubules and glomeruli. Later, in 2015, a new hPSC differentiation approach based on the 2D generation of nephron progenitors that self-aggregate to form metanephric organoids was published by Morizane et al. [12]. Remarkably, although none of these studies analyzed the contribution of ECs to the final organoid phenotype, they evidenced the existence of uncharacterized cells in the interstitial space of the kidney organoids, some of which corresponded to ECs [77] as it was later confirmed by a transcriptomic study comparing these two protocols [29].

Since then, many efforts have been made to vascularize kidney hPSC-Orgs. In 2017, Freedman et al. designed a 3D hPSC differentiation protocol that yielded tubular organoids expressing nephron progenitor (NP) markers (PODXL and WT1) in capsule-like structures followed by proximal (LTL⁺) and distal (E-Cad⁺)-like tubules. Interestingly, 80% of these organoids contained CD31⁺ vWF⁺ ECs that formed cords around the tubular and capsule structures. While these organoids seemed to exhibit some of the tissue-specific markers and transport characteristics, they were limited to MM-derived lineages and did not contain collecting ducts derived from UBs. This very encouraging first approach towards the generation of hPSC-derived vascularized kidney organoids provided a path for new experimentation approaches [78]. In 2015, Takasato et al. published a new method aiming to incorporate the UB lineage that was missing in the previously described kidney organoids. Organoids of 6 mm in diameter were composed of

approximately 500 nephrons made of glomeruli ($WT1^+$), proximal (LTL^+E-Cad^-) and distal tubules ($GATA3^-LTL^-E-Cad^+$) connected to a collecting duct ($GATA3^+E-Cad^+$). The proximal tubule took up dextran in a size-selective way and showed a nephrotoxic response to a two known nephrotoxicants, cisplatin and gentamicin; however, their expression profile appeared to mimic that of fetal human kidney. These organoids also contained $PDGFR\alpha^+$ stromal cells and $CD31^+VEGFR-2^+SOX17^+$ endothelial networks endowed with a lumen after 18 days of 3D culture. Remarkably, although some glomeruli contained endothelial networks, other remained avascular. In the latter group, GBM composed of laminin was observed, yet no comparison with vascularized glomeruli was performed. As in the preceding study, no further characterization of ECs or their contribution to organoid development was assessed [79, 80].

Interestingly, none of the aforementioned protocols used exogenous VEGF-A to maintain the hPSC-derived endothelial population within the organoids, suggesting an endogenous source of this growth factor. A recent study analyzed the contribution of the different renal hPSC-derived populations in the maintenance of the organoid vasculature. Low et al. showed that VEGF-A mRNA expression and the consequent protein secretion increased throughout hPSC renal differentiation and was maintained at high levels from day 14 forward. The direct comparison between podocyte-devoid ($PODXL^-$) organoids and $PODXL^+$ -containing organoids revealed that the latter displayed a tenfold increase in VEGF-A expression, suggesting an important role for podocytes in VEGF secretion and EC maintenance. The role of VEGF-A in the formation of organoid vasculature was further confirmed by testing VEGFR inhibitors. When an antagonist was used, the $CD31^+$ networks were disrupted, while the expected development was observed in the positive controls. Variation in the total number of $CD31^+$, $VEGFR-2^+$, $CD34^+$ ECs, however, was not evaluated. In this study, single-cell RNA sequencing and flow cytometry analyses revealed that $VEGFR-2^+$ -ECs present in organoids may originate from NPs ($SALL1^+SIX1^+$) and then acquire more mature endothelial characteristics, such as venous or arterial phenotypes, after extended culture. Finally, transplantation of these organoids beneath the renal capsule in NSG mice not only helped the maturation of the organoids but also triggered the formation of perfused glomerular capillaries with fenestrations formed by human and mouse ECs [39].

Recently, Homan et al. cultured d11-d14 hPSC-derived kidney organoids on a milli-fluidic device engineered with a supportive ECM to enhance the maturation of organoid vasculature. Remarkably, despite the efforts to include exogenous primary ECs such as HUVECs or human glomerular microvascular ECs, ECs succeeded in forming a

vascular network within the organoids only when codifferentiated with MMs from hPSCs. In these experiments, Homan et al. showed that organoids subjected to superfusion (flow over their top surface) significantly increased the percentage of KDR^+ -endothelial progenitors and the $CD31^+$ vessel percent area compared to static cultures in the absence of exogenous VEGF. EC network structures in contact with LTL^+ tubules were increased by three-fold compared to organoids grown under static conditions. Likewise, vascular invasion of $PODXL^+$ glomeruli-like compartments was enhanced in organoids under flow conditions, and capillary loops observed were similar to those found in glomeruli from E14.5 mouse kidneys. Interestingly, some of the endothelial networks were perfused through their own lumen. Together, these results suggest that microfluidics may contribute to the development and maturation of an organotypic kidney vasculature in *vhPSC-Orgs* [81].

Brain organoids and vascularization

In 2013, Lancaster et al. showed that human cerebral organoids (hPSCs-COrgs) could be derived from hPSCs using a two-step differentiation process in which EB formation is followed by a neural differentiation process in Matrigel droplets maintained in a bioreactor. The expression of specific markers of the hindbrain, midbrain and forebrain highlighted that these organoids could recapitulate the morphology and partial function of the human neocortex. Despite the fact that these hPSC-COrgs were kept in culture for up to 10 months, brain development was restricted to the outer layers and extensive cell death was observed in the inner core [13], highlighting the need for vascularization to distribute nutrients and oxygen throughout the organoids.

In 2018, Mansour et al. transplanted hPSC-COrgs in a murine model and confirmed that vascularization of these organoids by the host could increase their *in vivo* survival [30]. Today, there exist methods to vascularize hPSC-COrgs *in vitro* and they can be grouped in two main strategies. First, hPSC-COrgs have been vascularized by the addition of ECs to previously formed neural progenitor cell (NPC) spheroids. Pham et al. differentiated hPSCs into ECs and added them to 34-day-old (d34)-hPSC-COrgs. An endothelial $CD31^+$ network was evidenced in the outer layer of the vascularized hPSC-COrgs (*vhPSC-COrgs*). At day 54 of hPSC-COrg formation, hPSC-COrgs and *vhPSC-COrgs* were engrafted into mouse brains. Only *vhPSC-COrgs* survived and grew after 2 weeks of transplantation [82]. Song et al. fused hPSC-derived EC spheroids to d14 hPSC-derived NPC spheroids in the presence of primary human MSCs. Neurogenesis and spheroid regionalization were evidenced by the expression of *TBR1* and *MAP 2* neuron markers and *GFAP*⁺ glial progenitors. Inward and

outward currents during voltage-clamp recording and spontaneous postsynaptic currents were detected suggesting the presence of functional neurons [83]. ECs within the vhPSCs-COrgs expressed BBB markers such as ZO-1 protein as well as GLUT1, BCRP and PGP mRNA.

In contrast, other studies showed the codifferentiation of hPSCs towards endothelial and neural lineages following EB formation [84, 85]. In the presence of exogenous VEGF, hPSC differentiation by Ham et al. generated vhPSC-COrgs expressing markers of diverse cortical layers (e.g., SOX2⁺ NSCs, DCX3⁺ or TUJ-1⁺ neurons) alongside the confirmed presence of tubular-like structures expressing ECs and CEC markers (e.g., CD31, vWF, CLDN5) surrounded by α -SMA pericytes [84]. Similarly, Cakir et al. generated vascular-like CD144⁺CD31⁺vWF⁺VEGFR-2⁺ cells within brain organoids by inducing the expression of the endothelial transcription factor ETV2 at d18 of EB formation. ECs underwent further differentiation and acquired a CEC phenotype, as evidenced by TJs, which were observed by electron microscopy, immunohistochemistry (ZO-1 and OCLDN) and mRNA analysis (CLDN5 and TJP1). CEC functionality was also assessed by the expression of membrane transporters (ABCB1 and GLUT1) and a higher transendothelial electrical resistance (TEER) compared to that of hPSC-COrgs. Remarkably, although both avascular and vascularized organoids exhibited a well-organized SOX2⁺ VZ and TBR1⁺ SVZ around the lumen after 4 months in culture, vhPSC-COrgs showed higher neuronal activity, which was almost absent in hPSC-COrgs. The role of ECs in neurogenesis was further assessed by single cell RNA-sequencing analysis, revealing that vhPSC-COrg-derived neurons were more mature than those present in hPSC-COrgs. In fact, vhPSC-COrg-derived neurons showed a transcription profile similar to that of human neurons at gestational week 16–19. In vitro vascularization also seemed to be important for successful transplantation of vhPSC-COrgs in a hind-limb mouse model. The injection of dextran-FITC in the mouse bloodstream and the confocal imaging of the hPSC-COrgs and vhPSC-COrgs once explanted, confirmed that transplanted hPSC-COrgs displayed a reduced amount of perfusion although they exhibited more permeable blood vessels than the vhPSC-COrgs [85].

Future directions

As expected from the role that ECs play during tissue and organ development in human and mouse embryos, the addition of ECs to hPSC-Orgs improved the in vitro survival of organoids and decreased the number of dead cells in the inner core. ECs also promoted the maturation of the vhPSC-Orgs, improving their metabolism and functionality by secreting soluble growth factors and ECM proteins. In vivo, the presence of human ECs

enabled, in most cases, the success of the engraftment and the survival of the organoids by anastomoses between human and host vasculature. Nevertheless, the endothelial networks formed within hPSC-Orgs remained poorly characterized in most of the organoid examples reviewed herein, except for hPSC-COrgs (Table 1). The limited knowledge of organ-specific EC markers hampers the study of further endothelial differentiation and maturation, which is often reduced to the expression of panendothelial markers. Further characterization of ECs within organoids may shed some light on the mechanisms underlying EC-driven organoid maturation and EC specification.

The generation of fully hPSC-derived organoids may be advantageous for the creation of in vitro human organ models with a homogeneous genetic background, and opens the possibility of using organoid autografts in regenerative medicine; however, currently, many vascularized organoids are made of primary ECs (e.g., HUVEC or HAECs) partly because of their great potential for in vitro proliferation, allowing the generation of large quantities of cells. Despite this, the use of EC derived from hPSCs have been proven to be more suitable for organoid maturation. Two independent studies showed that different sources of ECs can result in different hepatocyte maturation [73, 74], with hPSC-derived ECs being the most advantageous source. This was partially explained by the fact that hPSC-derived ECs used in these studies were differentiated into liver-specific ECs, LSEC, from hPSCs prior to organoid formation [74]. Other studies suggested that hPSC-derived ECs may have an immature endothelial progenitor-like phenotype, and thus, the addition of exogenous molecules or the coculture with organ-specific cells could induce further organotypic vascular specification [74, 86–88].

Efforts made in vascularizing hPSC-Orgs with hPSC-ECs have followed two main approaches which are summarized in Fig. 1. In one approach, hPSCs are independently differentiated towards either endothelial progenitors or tissue-specific ECs (e.g., LSECs or CECs) and tissue-specific cell types (e.g., hepatocytes, NPs or UBs, NPCs). Their further coculture allows the control of the initial cell type ratio in each organoid and the incorporation of scaffolds. This approach, however, raises the question about timing of coculture: should it be performed with tissue progenitors or should ECs be added once the tissue organoids are established? In the other approach, hPSCs are codifferentiated towards all organ-specific cell types, including ECs, which typically follows EB formation. In this approach, organoid self-organization aims to mimic human embryonic development, but the percentage of ECs and the organoid architecture can hardly be controlled. In addition, this methodology is not compatible with differentiation

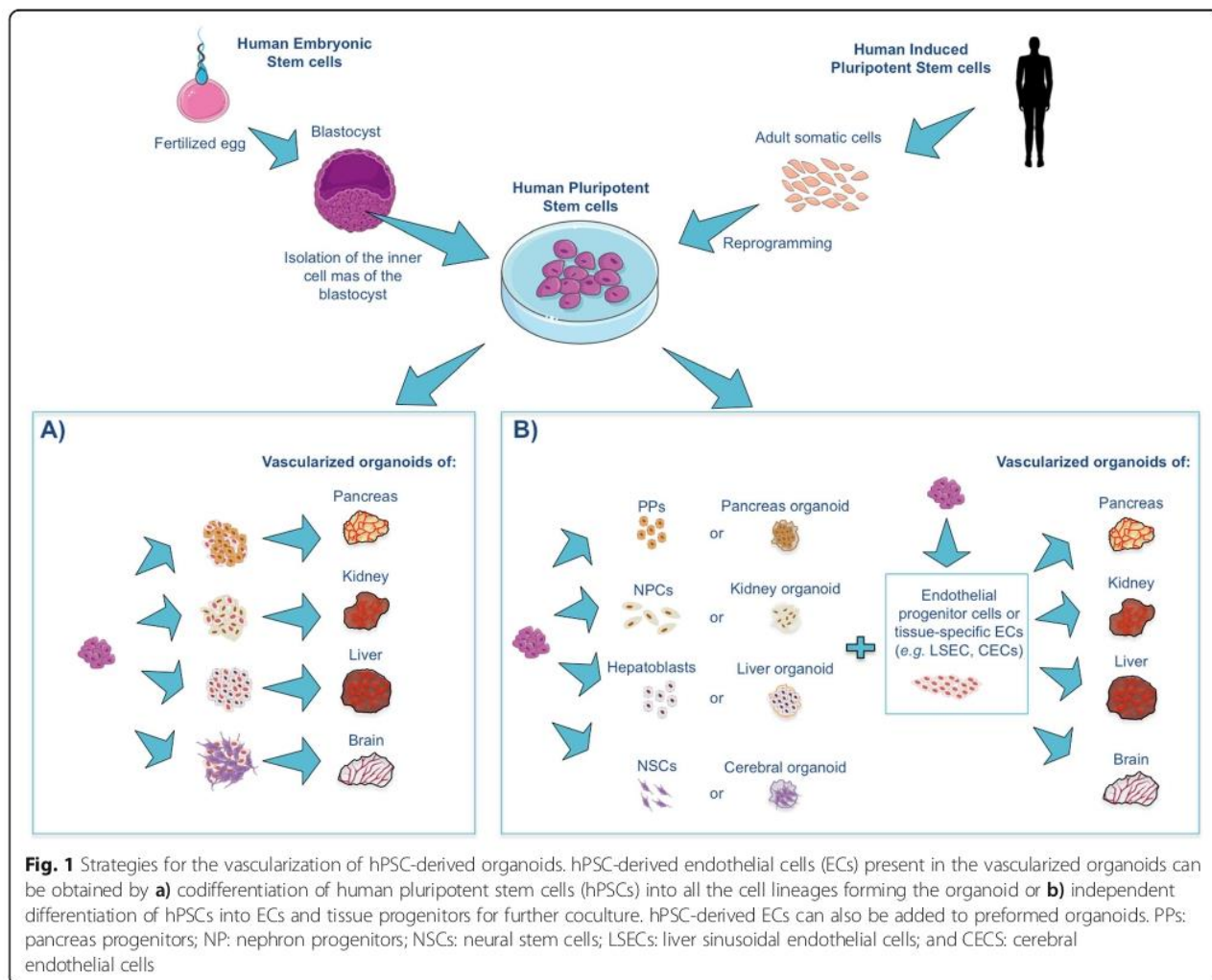
Table 1 Summary of the current published protocols for vascularized hPSC-derived organoids

Organoid	ECs	Vascularization strategy	Endothelial characterization (Phenotype)	FBS	Ex. VEGF	Commentaries	Ref
Pancreas*	HUVEC	Coculture of HUVEC, MSCs and hPSC-derived PP progenitors. MSC-driven condensation on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • IF: CD31 • In vivo: Anastomosis of human CD31⁺ networks with mouse blood vessels 	+	+	Initial % EC: 36% In vivo reperfusion and non-leaky vessels	[14, 63]
	HUVEC	Coculture of HUVEC and hPSC-derived PP progenitors on a hydrogel ("amikagel").	<ul style="list-style-type: none"> • IF: vWF 	+	-	Initial % EC: 50% Final % EC: 45-50%	[65]
	HUVEC	Coculture of HUVEC, MSCs and hPSC-derived hepatic progenitors. MSC-driven condensation on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • IF: CD31 • In vivo: Anastomosis of human CD31⁺ networks with mouse blood vessels 	+	+	Failure of non-vascularized (in vitro) organoids to engraft. Initial % EC: 11%	[67, 68]
	hPSC-EC	Codifferentiation of hPSC into hepatobiliary and endothelial lineage on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • IF and FACS: CD34, CD31 • IF: CD144, CD146 • mRNA expression: JAG1, NOTCH2, HES1 	-	-		[71]
Liver**	HAMEC	EB differentiation of hepatic cells in the presence of HAMEC.	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial rosettes • IF: CD31⁺ • mRNA expression: Factor VIII, vWF and other coagulation cascade and fibrinolysis genes • In vivo: Human CD31⁺ in the rat spleen without migration to the liver. 	+	-	Only vascularized organoids supported a sustained production of albumin in vivo up to 14 days after transplantation. Initial % EC: 30% Initial % EC: 15%	[70]
	HUVEC	Coculture of HUVEC, MSCs and hiPSC-derived hepatic progenitors. MSC-driven condensation on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • IF: CD31 • RNA-seq analysis • Protein analysis of the culture supernatants 	+	+	Initial % EC: 45% Surface contact of HE-IPSCs with non-parenchymal cells (HUVECs and MSCs) is required for organoid morphogenesis.	[69]
	hPSC-EC HAEC	Coculture of HAEC or iEC, MSCs or iMSC and hiPSC-derived hepatic progenitors. MSC-driven condensation on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • FACS: CD34, CD31, CD144 at t0 • Proteomic analysis 	+	+	Initial % EC: 40% Differences on the organoid metabolic rate and TGF-β and Wnt signaling pathways were observed depending on the source of EC and MSC used.	[73]
	hPSC-EC	Coculture of iEC, iMSCs and hiPSC-derived hepatic progenitors. iMSC-driven condensation on Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks • IF: CD144, CD31 • scRNA-seq analysis • In vivo: Anastomosis with host mouse blood vessels surrounded by pericytes 	+	+	Completely hiPSC-derived liver organoids outperformed their counterpart made of HUVEC and MSCs. Inhibition of KDR decreased the number of endothelial networks and hampered hepatocyte maturation.	[24, 72]
Kidney	hPSC-EC	Co-differentiation of hiPSC into kidney and endothelial lineage and self-assembling on transwells .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks with lumen • IF: KDR, CD31, SOX17 	-	-		[79, 80]
	hPSC-EC HUVEC	Co-differentiation of hiPSC into kidney and endothelial lineage.	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks with lumen • IF: KDR, CD31, CD34 	+	-	Maximum 3% of EC at d14	[39]

Table 1 Summary of the current published protocols for vascularized hPSC-derived organoids (Continued)

Organoid	ECs	Vascularization strategy	Endothelial characterization (Phenotype)	FBS	Ex. VEGF	Commentaries	Ref
			<ul style="list-style-type: none"> • scRNA-seq analysis: Different subsets of EC • In vivo: Perfused and fenestrated vessels 				
		Self-assembling in low-attachment plates and further culture on transwells .					
		Co-differentiation of human pluripotent epiblast spheroids into kidney and endothelial lineage on Matrigel/Collagen gels .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial cords around capsule and tubular structures • IF: CD31, vWF 	-	-	Organoids survived for up to 2 months.	[78]
		Co-differentiation of hiPSC into MM and endothelial lineage in suspension. From d11 to d14, organoids were culture on perfused chips .	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelial networks with lumen • IF and FACS: CD31, MCAM and KDR • mRNA expression: CD31 	+	-		[81]
Brain		EB co-differentiation of neural progenitors and endothelial cells.	<ul style="list-style-type: none"> • Vascular-like structures at d30; • IF: CD144, CD31, vWF, KDR and tight junctions: OCLN, aZO-1 • EM: Tight junctions • mRNA expression: CD144, CD31, KDR, TEK, vWF, OCLN, CD34, CLDN5, OCLN, TJ1, ABCB1 and GLUT1 • In vitro perfusion with Dextran-FITC. • TEER: $351 \pm 10 \Omega \text{ cm}^{-2}$ • scRNA-seq analysis • In vivo: Anastomosis of human CD31⁺ networks with mouse blood vessels 	+	-	EC came from modified hiPSC expressing ETV2 from day 18 of differentiation. Organoids survived up to 4 months and reached 3.5–4 mm of diameter. Vascularized organoids displayed better neural differentiation and neural functions.	[85]
		EB co-differentiation of neural progenitors and endothelial cells in low-attachment plates and further, embedded in Matrigel droplets .	<ul style="list-style-type: none"> • Tubule-like structures • IF: CD31, vWF, CLDN5 • mRNA expression: ANGPT1, CD31 • RNA-seq analysis: 106 TJ-related genes and GPR124 	+	+	Organoids survived up to 4 months. α -SMA pericytes surrounded CD31 ⁺ EC.	[84]
		Fusion of hPSC-derived cortical and vascular spheroids .	<ul style="list-style-type: none"> • IF: CD31, CD144, ZO-1 • FACS: CD31 • mRNA expression: BCRP, PGP, GLUT-1 	-	-	NPSC: EC: hMSC (1:2:3) Organoids survived up to 2 months.	[83]
		Co-culture of d34-brain organoids with ECs in Matrigel .	<ul style="list-style-type: none"> • Tubular structures • IF: CD31 • In vivo: human CD31⁺ vessels. 	+	+	Organoids survived up to 2 months. Only in vitro vascularized organoids survived in vivo 2 weeks after transplantation.	[82]

Organ, endothelial cell source, vascularization strategy, endothelial characterization, use of fetal bovine serum (FBS) and exogenous VEGF (Ex. VEGF) are described for every vHPSC-Orgs protocol. IF: Immunofluorescence. FACS: fluorescence activated cell sorting. scRNA-seq analysis: single cell RNA sequencing analysis. *For pancreas organoids, authors often refer to pancreatic islet organoids because of the missing exocrine compartment. ** Liver organoids are also known in most cases as liver buds (LB)



protocols where inhibitors of mesoderm differentiation (e.g. NOGGIN) are required (Fig. 1).

It is worth mentioning that although we have described hPSC-Orgs containing EC networks, none of them has been perfused in vitro and therefore, cannot be considered completely vascularized. Recently, an American research team engineered perfused in vitro high cellular density tissues derived from avascular hPSC-EBs, cerebral organoids and cardiac spheroids embedded in ECM. Using a 3D printing method (sacrificial writing), they printed gelatin into organoid or EB-derived functional tissues at 4 °C. At 37 °C, the gelatin melted leaving behind tubular channels that could be perfused, in between highly packed EBs or organoids whose morphology was not affected. This method ensured the in vitro survival of large tissues (>2.5 ml in volume and ≈4mm in thickness) with maintained functionality, but they lacked ECs [89]. The authors claimed that the generated vascularized cardiac tissues had higher contractility, enhanced beating capability and improved beating synchronization. These tissues also responded to

perfused molecules known to increase the beating frequency or reduce the contractile amplitude. These results, together with the fact that in vivo perfusion has been related to successful organoid engraftment, survival and maturation, suggest that technologies making possible in vitro perfusion of hPSC-Orgs (e.g. tissue-engineered blood vessels, scaffolds or bioreactors) may contribute to the production of large vhPSC-Orgs [81, 90, 91]. Additional fine-tuning of shear stress and use of mural cells may help with generating and stabilizing specific organotypic vasculature within vhPSC-Orgs.

Finally, the production of vhPSC-Orgs with a size suitable for therapeutic use in humans depends on the development of cost-efficient technologies. The maintenance of hPSCs and their differentiation into the desired vhPSC-Orgs often requires the use of expensive growth factors, cytokines and proteins. In recent decades, encouraging cytokine-free protocols for hPSC differentiation to some lineages have been achieved using small molecules [92, 93]. In this review, we also showed some examples in

which the ECs and stromal cells of vHPSC-Orgs synthesized their own ECM, which could replace use of exogenous ECM proteins in the future [65, 79, 85]. New methods to grow and differentiate hPSCs at a large scale in bioreactors are now also possible [94]. Hence, the creation of cost-efficient and large-scale vHPSC-Orgs seems to be a real possibility in the near future.

Conclusion

In conclusion, the studies reviewed herein suggest an encouraging future for the generation of vascularized hPSC organoids not only for the aforementioned organs but also for the intestine, heart, skin or lungs. Further investigations are necessary to determine organ-specific markers of ECs that may be used in the identification of an organotypic vasculature differentiated within the vHPSC-Orgs. Tissue engineering technologies, such as scaffolds, bioprinting or organoids-on-a-chip devices, could help to the development of these physiological and pathological models relevant for fundamental and clinical research, regenerative medicine and pharmacology.

Abbreviations

2D: Two-dimensional; 3D: Three-dimensional; BBB: Blood brain barrier; BECs: Brain endothelial cells; BMP: Bone morphogenetic protein; CECs: Cerebral endothelial cells; CKD: Chronic kidney disease; CNS: Central nervous system; dpMSCs: Dental pulp-derived MSCs; E: Embryonic day; EB: Embryoid body; ECM: Extracellular matrix; ECs: Endothelial cells; GBM: Glomerular basement membrane; HAEC: Human aortic endothelial cells; HAMEC: Human adipose microvascular endothelial cells; hESCs: Human embryonic stem cells; hiPSCs: Human induced pluripotent stem cells; hPSC-COrgs: hPSC-derived cerebral organoids; hPSC-Orgs: hPSC-derived organoids; hPSCs: Human pluripotent stem cells; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells; LB: Liver buds; LSECs: Liver sinusoidal endothelial cells; MM: Metanephric mesenchyme; MSCs: Mesenchymal stromal cells; NP: Nephron progenitors; NPCs: Neural progenitor cells; NSCs: Neural stem cells; PNVP: Perineural plexus; PP: Pancreatic progenitors; PVP: Periventricular plexus; RHMVECs: Rat heart microvascular endothelial cells; SGZ: Subgranular zone; SVZ: Subventricular zone; TEER: Transendothelial electrical resistance; TJs: Tight junctions; UB: Uretic bud; VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A; VEGFR-2: Vascular endothelial growth factor receptor-2; vHPSC-COrgs: Vascularized hPSCs-derived cerebral organoids; vHPSCs-Orgs: Vascularized hPSC-derived organoids; vWF: von Willebrand factor

Acknowledgments

We thank Robin Van Havermaet for his comments that greatly improved the manuscript.

Authors' contributions

Writing original draft preparation, AW. Review and editing, AVW, AM, MTMG and HG. Funding acquisition, MTMG and HG. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was partially supported by the *Société Française d'Hématologie* and the RHU program "iLite" on "Innovations for Liver Tissue Engineering" granted by PAI2 through ANR-16-RHUS-005.

Availability of data and materials

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author details

¹INSERM UMRs-MD 1197, Université Paris Sud-Université Paris-Saclay. Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France. ²DHU Hépatinov, Villejuif, France. ³UMR_S1193 Inserm. Université Paris-Saclay, Villejuif, France. ⁴Université d'Evry-Val-d'Essonne. Université Paris-Saclay, Evry, France.

Received: 2 March 2020 Accepted: 14 May 2020

Published online: 22 May 2020

References

- Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266–77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- Simian M, Bissell MJ. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol*. 2016;216(1):31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>.
- Koledova Z. 3D cell culture: an introduction BT - 3D cell culture: methods and protocols. Koledova Z. New York: Springer New York; 2017. p. 1–11. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_1.
- Sugimoto S, Sato T. In: Koledova Z, editor. Establishment of 3D intestinal Organoid cultures from intestinal stem cells BT - 3D cell culture: methods and protocols. New York: Springer New York; 2017. p. 97–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_7.
- Lou YR, Leung AW. Next generation organoids for biomedical research and applications. *Biotechnol Adv*. 2018;36(1):132–49. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.005>.
- Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–8.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917 LP–1920.
- Clevers H. Modeling development and disease with Organoids. *Cell*. 2016; 165(7):1586–97.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014; 345(6194):1247125.
- Münera JO, Wells JM. In: Tsuji T, editor. Generation of gastrointestinal Organoids from human pluripotent stem cells BT - organ regeneration: 3D stem cell culture & manipulation. New York: Springer New York; 2017. p. 167–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_12.
- Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol*. 2015;33(11):1193–200. <https://doi.org/10.1038/nbt.3392>.
- Lancaster MA, Renner M, Martin C, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373–9. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T, Taniguchi H. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Rep*. 2018;23(6):1620–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.123>.
- Yabe SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H. Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. *J Diabetes*. 2017;9(2):168–79. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12400>.
- Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med*. 2017;95(7):729–38. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>.
- Fujii M, Clevers H, Sato T. Modeling human digestive diseases with CRISPR-Cas9-modified Organoids. *Gastroenterology*. 2019;156(3):562–76. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.048>.

18. McCauley HA, Wells JM. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Dev*. 2017;144(6):958–62.
19. Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, Wu JC. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*. 2018;145(5):dev156166.
20. Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz C-P, Zhang F, Atkinson-Dell R, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*. 2015;62(3):581–9.
21. Shahjalal HM, Abdal Dayem A, Lim KM, Jeon T-I, Cho S-G. Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):355.
22. Logan S, Arzua T, Canfield SG, Seminary ER, Sison SL, Ebert AD, et al. Studying human neurological disorders using induced pluripotent stem cells: from 2D monolayer to 3D organoid and blood brain barrier models. *Comprehensive Physiol*. 2019:565–611. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180025>.
23. Amiri A, Coppola G, Scuderi S, Wu F, Roychowdhury T, Liu F, et al. Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. *Science*. 2018;362(6420):eaat6720.
24. Camp JG, Sekine K, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, et al. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature*. 2017;546(7659):533–8.
25. Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, Tsai Y-H, Nagy MS, Dyal R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Rossant J, editor. Elife*. 2015;4:e05098. <https://doi.org/10.7554/eLife.05098>.
26. Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature*. 2019;570(7762):523–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1289-x>.
27. Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Brauning M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):15672–7.
28. Watson CL, Mahe MM, Múnica J, Howell JC, Sundaram N, Poling HM, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1310–4.
29. Wu H, Uchimura K, Donnelly EL, Kirita Y, Morris SA, Humphreys BD. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics. *Cell Stem Cell*. 2018;23(6):869–881.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.010>.
30. Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Johnston S, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol*. 2018;36(5):432–41. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>.
31. van den Berg CW, Ritsma L, Avramut MC, Wiersma LE, van den Berg BM, Leuning DG, et al. Renal subcapsular transplantation of PSC-derived kidney Organoids induces neo-vasculogenesis and significant glomerular and tubular maturation in vivo. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):751–65.
32. Dye BR, Dedhia PH, Miller AJ, Nagy MS, White ES, Shea LD, et al. A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *Elife*. 2016;5:1–18.
33. Garcia MD, Larina IV. Vascular development and hemodynamic force in the mouse yolk sac. *Front Physiol*. 2014;5:308.
34. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The development of the vascular system: a historical overview BT - vascular morphogenesis: methods and protocols. In: Ribatti D, editor. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1462-3_1.
35. Cleaver O, Krieg PA. In: Rosenthal N, Harvey RPB-TD and R, editors. Chapter 8.2 - Vascular Development. Boston: Academic Press; 2010. p. 487–528.
36. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*. 1989;251(2):224–31. <https://doi.org/10.1002/jez.1402510210>.
37. Abrahamson DR, Robert B, Hyink DP, St. John PL, Daniel TO. Origins and formation of microvasculature in the developing kidney. *Kidney Int*. 1998;54: S7–11. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06702x>.
38. Dekel B, Hochman E, Sanchez MJ, Maharshak N, Amariglio N, Green AR, et al. Kidney, blood, and endothelium: developmental expression of stem cell leukemia during nephrogenesis. *Kidney Int*. 2004;65(4):1162–9.
39. Low JH, Li P, Chew EGY, Zhou B, Suzuki K, Zhang T, et al. Generation of human PSC-derived kidney Organoids with patterned nephron segments and a De novo vascular network. *Cell Stem Cell*. 2019:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.06.009>.
40. Vasudevan A, Long JE, Crandall JE, Rubenstein JLR, Bhide PG. Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. *Nat Neurosci*. 2008;11(4):429–39.
41. Stewart G. The development of the blood supply to the human embryo basal ganglia. Canada: University of Alberta; 1955.
42. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*. 2001;294(5542):564 LP–567.
43. Yoshitomi H, Zaret KS. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development*. 2004;131(4):807 LP–817.
44. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science*. 2001; 294(5542):559–63.
45. Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JAM. Origin of the vertebrate endothelial cell lineage. *Ontogeny and Phylogeny Hear Dev Regen*. 2010;1:465–86.
46. Ober EA, Lemaigre FP. Development of the liver: insights into organ and tissue morphogenesis. *J Hepatol*. 2018;68(5):1049–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.005>.
47. Karakatsani A, Shah B, De Almodovar CR. Blood vessels as regulators of neural stem cell properties. *Front Mol Neurosci*. 2019;12(April):1–11.
48. Lange C, Turrero Garcia M, Decimo I, Bifari F, Eelen G, Quaegebeur A, et al. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J*. 2016;35(9):924–41. <https://doi.org/10.15252/embj.201592372>.
49. Segarra M, Aburto MR, Cop F, Llaó-Gid C, Härtl R, Damm M, et al. Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science*. 2018;361(6404):eaao2861.
50. Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*. 2002; 34(6):945–60. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00722-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00722-5).
51. Rosa AI, Grade S, Santos SD, Bernardino L. Heterocellular Contacts with Mouse Brain Endothelial Cells Via Laminin and $\alpha 6 \beta 1$ Integrin Sustain Subventricular Zone (SVZ) Stem / Progenitor Cells Properties. *Front Cell Neurosci*. 2016;10(December):1–14.
52. Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, et al. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol*. 2014;16(11):1045–56. <https://doi.org/10.1038/ncb3045>.
53. Shingo T, Gregg C, Erwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, et al. Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. *Science*. 2003;299(5603):117 LP–120.
54. Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1751–74.
55. Stolz DB, Sims-Lucas S. Unwrapping the origins and roles of the renal endothelium. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(6):865–72. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2798-3>.
56. Zille M, Ikhsan M, Jiang Y, Lampe J, Wenzel J, Schwaninger M. The impact of endothelial cell death in the brain and its role after stroke : A systematic review. *Cell Stress*. 2019;3(11):330–47. <https://doi.org/10.15698/cst2019.11.203>.
57. Wenzel J, Hansen CE, Bettoni C, Vogt MA, Lembrich B, Natsagdorj R, et al. Impaired endothelium-mediated cerebrovascular reactivity promotes anxiety and respiration disorders in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117(3):1753–61.
58. GP B, Angelo S, BS E, Charles D, GS M, Costantino I, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Stroke*. 2011;42(9): 2672–713. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182299496>.
59. Eshpeter A, Jiang J, Au M, Rajotte RV, Lu K, Lebkowski JS, et al. In vivo characterization of transplanted human embryonic stem cell-derived pancreatic endocrine islet cells. *Cell Prolif*. 2008;41(6):843–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00564.x>.
60. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*. 2009;19:429. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.28>.
61. Manzar GS, Kim E-M, Zavazava N. Demethylation of induced pluripotent stem cells from type 1 diabetic patients enhances differentiation into functional pancreatic β cells. *J Biol Chem*. 2017;292(34):14066–79.
62. Jaramillo M, Mathew S, Mamiya H, Goh SK, Banerjee I. Endothelial cells mediate islet-specific maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;21(1–2):14–25. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0013>.

63. Takahashi Y, Takebe T, Taniguchi H. Methods for generating vascularized islet-like Organoids via self-condensation. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2018; 45(1):1–12.
64. Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via Mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*. 2015;16(5):556–65. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.004>.
65. Candiello J, Grandhi TSP, Goh SK, Vaidya V, Lemmon-Kishi M, Eliato KR, et al. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials*. 2018;177:27–39.
66. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51(1):297–305. <https://doi.org/10.1002/hep.23354>.
67. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499(7459):481–4. <https://doi.org/10.1038/nature12271>.
68. Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc*. 2014;9(2):396–409. <https://doi.org/10.1038/nature12271>.
69. Asai A, Aihara E, Watson C, Mourya R, Mizuochi T, Shivakumar P, et al. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. *Dev*. 2017;144(6):1056–64.
70. Pettinato G, Lehoux S, Ramanathan R, Salem MM, He L-X, Muse O, et al. Generation of fully functional hepatocyte-like organoids from human induced pluripotent stem cells mixed with endothelial cells. *Sci Rep*. 2019; 9(1):8920. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45514-3>.
71. Wu F, Wu D, Ren Y, Huang Y, Feng B, Zhao N, et al. Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *J Hepatol*. 2019;70(6):1145–58. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.028>.
72. Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, et al. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2017;21(10):2661–70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.005>.
73. Goulart E, de Caires-Junior LC, Telles-Silva KA, Araujo BHS, Kobayashi GS, Musso CM, et al. Adult and iPSC-derived non-parenchymal cells regulate liver organoid development through differential modulation of Wnt and TGF- β . *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1–11.
74. Kouji Y, Kido T, Ito T, Oyama H, Chen SW, Katou Y, et al. An in vitro human liver model by iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells. *Stem Cell Reports*. 2017;9(2):490–8.
75. Ramanathan R, Pettinato G, Beeston JT, Lee DD, Wen X, Mangino MJ, et al. Transplantation of human stem cell-derived hepatocytes in an animal model of acute liver failure. *Surg (United States)*. 2015;158(2):349–59. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.014>.
76. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, et al. Redefining the in vivo origin of Metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):53–67.
77. Morizane R, Bonventre JV. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2017;12(1): 195–207. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.170>.
78. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun*. 2015;6(May):1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms9715>.
79. Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, et al. Kidney organoids from human IPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*. 2015;526(7574):564–8.
80. Takasato M, Er PX, Chiu HS, Little MH. Generation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2016;11(9):1681–92. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.098>.
81. Homan KA, Gupta N, Kroll KT, Kolesky DB, Skylar-Scott M, Miyoshi T, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat Methods*. 2019;16(3):255–62. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0325-y>.
82. Pham MT, Pollock KM, Rose MD, Cary WA, Stewart HR, Zhou P, et al. Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport*. 2018;29(7): 588–93.
83. Song L, Yuan X, Jones Z, Gri K, Zhou Y, Ma T, et al. Assembly of human stem cell-derived cortical spheroids and vascular spheroids to model 3-D brain-like tissues. *Sci Rep*. 2019;9:5977. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42439-9>.
84. Ham O, Jin YB, Kim J, Lee M-O. Blood vessel formation in cerebral organoids formed from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;521(1):84–90.
85. Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, Kural MH, Parent M, Kang Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods*. 2019;16:1169–75. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0586-5>.
86. Praça C, Rosa SC, Sevin E, Cecchelli R, Dehouck M-P, Ferreira LS. Derivation of brain capillary-like endothelial cells from human pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells. *Stem Cell Reports*. 2019;13(4):599–611. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.002>.
87. Uenishi GI, Jung HS, Kumar A, Park MA, Hadland BK, McLeod E, et al. NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells. 2018;.
88. Sriram G, Tan JY, Islam I, Rufaihah AJ, Cao T. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):261. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0260-5>.
89. Skylar-Scott MA, Uzel SGM, Nam LL, Ahrens JH, Truby RL, Damaraju S, et al. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Sci Adv*. 2019;5(9):eaaw2459.
90. Grebenyuk S, Ranga A. Engineering Organoid vascularization. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:39. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00039>.
91. Chen J, Alexander GC, Bobba PS, Jun H-W. In: Noh I, editor. Recent Progress in vascular tissue-engineered blood vessels BT - biomimetic medical materials: from nanotechnology to 3D bioprinting. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 123–44. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_8.
92. Galat Y, Dambaeva S, Elcheva I, Khanolkar A, Beaman K, Iannaccone PM, et al. Cytokine-free directed differentiation of human pluripotent stem cells efficiently produces hemogenic endothelium with lymphoid potential. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):67. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0519-0>.
93. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, et al. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. *Cell Rep*. 2012;2(5): 1448–60.
94. Kropp C, Massai D, Zweigerdt R. Progress and Challenges in Large-Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. *Process Biochemistry*. 2017;59: 244–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.032>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Generation of Hemangiogenic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells

Vargas-Valderrama A^{1,2}, Guenou H^{1,3} and Mitjavila Garcia MT^{1,2*}

¹INSERM U1197, Paul Brousse Hospital, France

²Paris Sud University, Paris Saclay University, France

³University of Evry Val d'Essonne, France

ARTICLE INFO

Received Date: January 18, 2019

Accepted Date: February 01, 2019

Published Date: February 06, 2019

KEYWORDS

Pluripotent stem cells (PSC)
Hemangioblast
Hemogenic endothelium
Hematopoiesis
Endothelial cells

Copyright: © 2019 Mitjavila Garcia MT et al., SL Cell Science & Report. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation for this article: Vargas-Valderrama A, Guenou H and Mitjavila Garcia MT. Generation of Hemangiogenic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. SL Cell Science & Report. 2019; 2(1):113

Corresponding author:

Mitjavila Garcia MT,
1INSERM U1197, Paul Brousse
Hospital, 2Paris Sud University, Paris
Saclay University, France
Email: alejandra.vargas-
valderrama@inserm.fr

ABSTRACT

The close spatio-temporal relation during development between the hematopoietic and endothelial cells suggests the existence of a common progenitor of these two lineages, the hemangioblast. Since the isolation and characterization of this bipotent progenitor from chick embryos in 1920, many efforts had made in identifying the mouse and human equivalents, but they have been hampered by the difficult access to early mammal embryos and the reduce number of these transient progenitors. The derivation of Embryonic Pluripotent Stem Cells (ESC) from mice and human blastocysts opened new possibilities to study the early embryogenesis *in vitro*. Here we review the major contributions of ESC differentiation into endothelial and hematopoietic cells to the field of hematovascular developmental biology.

INTRODUCTION

One of the major breakthroughs of the 20th century in biological sciences was the isolation and culture of embryonic stem cells, first achieved with mice [1], and later with humans [2]. These cells, also called embryonic pluripotent stem cells, are derived from the inner mass of embryo blastocysts (at day 4-6 in mice and day 8 in humans). Pluripotent Stem Cells (PSCs) have the capacity to self-renew indefinitely *in vitro* and to differentiate into the three germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. In the field of developmental biology, PSCs represented an important *in vitro* model to study early embryogenesis due to the impossibility to access early mammal embryos. Concretely, PSCs have greatly contributed to our understanding of blood cells and vascular development. Here, we discuss the most important contributions of PSCs to the understanding of hemangiogenic development, the current state-of-art of PSC differentiation into these two lineages and the future perspectives.

HEMANGIOBLAST VS HEMOGENIC ENDOTHELIUM

At the beginning of the 20th century, the close spatio-temporal relation during development between the hematopoietic and endothelial cells suggested the existence of a common progenitor of these two lineages. Experiments with living chick blastoderms made by Sabin [3], confirmed the presence of bi-potent progenitors derived from mesoderm and organized in clumps within the embryo and in the yolk sac, the so-called angioblasts. This mass of cells differentiates, at the center, in both blood plasma and red-blood corpuscles (erythrocytes) and, at the exterior, in the endothelium of the vascular plexus, forming all together the blood islands. Sabin used

the termed “angioblast”, coming from the Greek word *angeion* (vessels) and *blastos* (origin) to describe these progenitors. Years later, Murray [4] referred to these cells with a more suitable term which included both the hematopoietic and endothelial lineage, “the hemangioblast”.

In parallel, studies of chick and mouse embryos suggested a different origin of hematopoietic cells, namely the hemogenic endothelium [5]. Lineage tracing and time-lapse imaging allow to identify a transitory specialized endothelial population located in the dorsal aorta and in the umbilical and vitelline arteries during mouse [6-8] and human embryogenesis with definitive hematopoietic potential [9]. How this HE population is related to the hemangioblast is a question to which developmental biologists have tried to find an answer for years. The lack of a clear answer has led to the misuse of both terms and frequently, they are referred to indistinctly in literature while being, at their origin, two different concepts. The HE could not represent the hemangioblast because its bipotency has not yet been proven: there is no evidence that hemogenic endothelial cells can proliferate and produce other fully mature endothelial cells. By contrast, the hemangioblast, as an earlier progenitor of both lineages, could theoretically generate both hematopoietic cells and an endothelium with hemogenic properties. Thus, both populations of progenitors may exist during endothelial and hematopoietic development without being exclusive. In addition, while the HE has been proven to exist in zebrafish, xenopus, chick, mice and humans; the existence of hemangioblast remains controversial.

To the purpose of this review, we analyse the contributions of mESC and hESC experiments to the broad field of hemato-vascular development separately according to the definitions of the hemangioblast and the HE formerly described.

THE HEMANGIOBLAST

First successful experiments in mammals aiming to identify the hemangioblast were carried out with mESCs. Thanks to the spontaneous differentiation of PSCs into Embryoid Bodies (EBs), cell aggregates containing the three-germ layer, Doetschman et al., [10] described for the first time in 1985 the emergence *in vitro* of blood islands within 8 to 10-days mEBs.

Later, the team of Gordon Keller [11,12] identified hemangiogenic progenitors within 3,5-days EBs, the blast-

colony forming cells (BL-CFC). Differentiation of transgenic mESC confirmed BL-CFCs were derived from Brachyury+ (Bry+) mesoderm [13] and expressed Flk-1+ (KDR or VEGFR-2) and Scl [14]. Moreover, as their name indicates, those progenitors generated BCs in methyl cellulose upon the addition of VEGF and c-kit ligand in methyl cellulose. Through this population, BL-CFC gave rise to erythroid and myeloid lineages and endothelial-like cells [11,12].

Confirmation of the hemangioblast character of BL-CFC was only achieved later, when Huber et al., [13] isolated and characterized the *in vivo* murine hemangioblast. As observed in mESC experiments, this population, found between mid-stroke and early neural plate stage, was derived from Bry+ mesoderm and expressed Flk-1. Interestingly, the BCs generated from the hemangioblast exhibited a similar, almost identical phenotype than those derived from mESC-EBs. They both expressed hematopoietic and endothelial markers such as Flk-1, Scl, Gata1 or VE-cadherin (CD144), among others, and gave rise to hematopoietic and endothelial lineages.

Like in mice, hESC opened the possibility to investigate early human embryogenesis. hESC-derived EBs (hEBs) were shown to recapitulate early events of hematopoietic development. In accordance with previous results found in chick, mouse and human embryos [6], two waves of hematopoiesis were observed in hEBs. The first wave or primitive hematopoiesis occurs from day 7 to 12 of differentiation and yields exclusively primitive-type erythroblasts while the second wave, observed from day 12 to 20, generated definitive erythroid and myeloid lineages [15]. Emergence of hemangiogenic progenitors was evidenced prior the onset of primitive hematopoiesis, between day 3-5 of hEBs, and was characterized by the co-expression of KDR, Glycophorin-a (CD235a) and endothelial markers PECAM-1 (CD31) and Ve-cadherin [15-18]. Those progenitors were able to generate BC and consequently, hematopoietic (Ery-P and myeloid lineages) and endothelial cells, but unlike mice, they did not express c-Kit (CD117) at this stage [17,19]. Further characterization of the endothelial potential of hESC-derived BC revealed their *in vivo* positive angiogenic properties in ischemic retinal diabetic rat models, hind limb ischemic model and myocardial infarction in non-obese diabetic mice [19].

Even though the existence of human hemangioblast has not been confirmed yet, fine-tuning of hESC culture and serum-free differentiation conditions have contributed to elucidate the role of diverse cytokines and signaling pathways in early hemangiogenic development. In fact, besides the crucial role of VEGF, BMP-4 has been described as an important growth factor involved in hemangiogenic mesoderm specification [20,21] while TPO and FGFb have been shown to improve blast colony formation from BL- CFC [22]. The discovery of the angiotensin-converting enzyme (ACE, BB9 or CD143) as a marker of the hemangioblast pointed out the importance of the Renin-Angiotensin (RAS) system in hemangioblast expansion and differentiation. As demonstrated by Zambidis et al., [22], inhibition of the Angiotensin Receptor (AGTR1) increased the number of hematopoietic cells from BC at expenses of the endothelial lineage. In addition, the role of WNT canonical and Activin-nodal signaling pathways have been described as crucial for both human and mice differentiating ESC before the onset of Flk-1⁺ cells and will be discussed later.

HEMOGENIC ENDOTHELIUM

Adult Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are generated in the Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) region. According to studies on avian, murine and human embryos, the endothelium lining the ventral side of the dorsal aorta, yolk sac capillaries, vitelline and umbilical arteries undergoes the so-called Endothelial-Hematopoietic Transition (EHT) giving rise to the second and definitive wave of hematopoiesis. This specialized endothelium corresponds to a Ve-cadherin⁺Runx1⁺ transitory endothelial population, the HE, derived from the splanchnopleural mesoderm and detected at 30-36 days of gestation in humans and from 8,25-10 days in mice [6,9].

As for the hemangioblast, murine and human PSCs have been a useful tool to characterize this population. However, the lack of specific markers distinguishing among different endothelial populations has hampered the research on this field over the years. First indices of the existence of an *in vitro* HE were published in 1998 by Nishikawa et al., [23] who derived a FLK1⁺Ve-cadherin⁺ bipotent progenitor from mESC. In concordance with those results, Lancrin et al., [24] isolated a hemangioblast-derived intermediate and transitory population Ve-cadherin⁺CD31⁺Tie2⁺CD117⁺CD41⁻ prior to the onset of BC. Interestingly, this endothelial population was dependent on

Runx1 expression to produce BC and hematopoietic progenitors. Other transcriptions factors involved in HE differentiation have also been identified. ETV2 was suggested to mark the onset of the hemangioblast (ETV2⁺Flk-1⁺tie2⁻), while the transcription factor SOX7 was crucial for the generation of the hemangioblast-derived HE (ETV2⁺Flk-1⁺tie2⁺) [25,26].

It is important to notice that studies focused on PSC differentiation into the hemangioblast have been preferentially carried out through EB formation, while 2D culture conditions using either bone marrow stromal cells (e.g., OP9 or S17) or matrix-coated dishes (e.g., Collagen IV) have been the main choice for HE derivation. These differences have made difficult the comparison of derived hemangiogenic populations and more importantly, the understanding of the link between hemangioblast and HE. Some studies focused on establishing the relation between these two early hematopoietic progenitors have suggested they are derived from different mesoderm populations. Thus, hESC-derived APLNR⁺PDGFR α ⁺ mesoderm generates hemangioblasts responsible of primitive hematopoiesis while APLNR⁺PDGFR α ⁻ mesoderm is responsible of definitive hematopoiesis through the HE. Kinetics following hESC-derived APLNR⁺PDGFR α ⁻ mesoderm commitment into HE revealed an intermediate progenitor APLNR⁺PDGFR α ⁻Ve-cadherin⁺KDR^{bright}CD31⁻CD73⁻CD43⁻CD105⁻CD45⁻ around day 3 of differentiation. Expression of CD235a, CD31, CD34, CD41 and CD43 increased progressively until day 5 when three different populations were described: Ve-cadherin⁺CD235a⁺CD41⁻CD117⁻ corresponding to immature hematopoietic cells; Ve-cadherin⁺CD73⁺CD117⁺ or endothelial cells without HE potential; and Ve-cadherin⁺CD73⁻CD235a⁻CD117^{intermediate} with HE potential [27].

Hemangioblast and HE seem also to differ in the requirements of Activin-nodal, Wnt and Notch pathways. Inhibition of activin-nodal pathway during the two first days of differentiation reduced the KDR⁺CD235a⁺ population and increase the number of definitive progenitors [18,20,28,29]. In contrast, early inhibition of the Wnt pathway increased KDR⁺CD235a⁺ hemangioblast population and further primitive hematopoiesis, while Wnt activation, through a small molecule CHIR [30], improved definitive hematopoiesis. This latter has been recently proven to be sufficient to differentiate hESC into HE without the

addition of any cytokine [18,31,32]. Finally, the Notch pathway plays an important role in HE commitment. In fact, the $Ve\text{-cadherin}^+\text{CD43}^+\text{CD73}^+\text{DLL4}^+$ arterial-type HE formation relies on Notch activation. Activation of Notch signaling at HE stages potentiates EHT initiation since it was evidenced by the Notch dose-dependent increase of Runx1 expression. Notch seems also a key factor downstream in hematopoiesis since hematopoietic progenitors coming from Notch-inhibited HE did not generate T lymphocytes [33].

IN VIVO RECONSTITUTION OF ADULT HEMATOPOIESIS

To date, the contribution of the hemangioblast to adult definitive hematopoiesis remains unclear. *In vivo*, adult definitive Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are produced during the second wave of development from HE and are defined for their potential to reconstitute hematopoiesis after transplantation in irradiated NOD/SCID mice models. Experiments aiming to reconstitute adult *in vivo* hematopoiesis in murine models as they have been conducted for bone marrow or Umbilical Cord Blood (UCB) cells could contribute to our understanding of early hematopoietic events. However, no successful long-term (>20 weeks) engraftment from any type of mice or human PSC-derived progenitors has been reported so far. In addition, short-term engraftment has only been achieved from mice [34] and human PSC-derived through more than 15 days EB [35] or hPSC differentiation on stromal cells [28,36,37] and in any case, from direct hemangioblast or HE populations. Remarkably, these studies showed a low chimerism of PSC-derived cells compared to UCB cells suggesting these cells possess a lower potential of hematopoietic reconstitution.

CONCLUSION

Pluripotent stem cells have largely contributed to our understanding of early events in hematovascular development. They represent an excellent *in vitro* model that recapitulates early embryogenesis, yields large number of cells and allows

genetic modifications. Thus, the use of PSC has allowed describing two early hematopoietic progenitors: the hemangioblast and the HE.

In the case of the humans hemangioblast, all the experiments confirming its existence have been carried out *in vitro* and its bipotency remains debatable. In addition, the contribution of the hemangioblast to primitive and definitive hematopoiesis remains unclear. Some authors claim that the hemangioblast corresponds to a multilineage progenitor population that, additionally, could also generate pericytes and smooth muscle cells besides endothelial and hematopoietic stem cells [38].

On the other hand, the endothelium has been proven to play an important role both *in vivo* and *in vitro* in the generation of hematopoietic cells even in the case of the hemangioblast. Differentiation of PSCs has been shown to be crucial to identify new markers of populations contributing to hematopoiesis. The large number of precursors cells obtained from PSCs have allowed high throughput transcriptomic analysis such as microarrays, RNA-seq and recently, single-cell analysis [33,36,39,40]. Commonly, these technologies rely on a great number of samples which are difficult to obtain from early embryos, where most of the populations are transient intermediates.

Besides the interest of PSC model in developmental biology, large-scale *in vitro* hematopoietic production is a promising tool for cell therapy where only heterologous BM and UCB transplants are possible. Unfortunately, two main factors limit the advance of this technology: heterogeneity among PSC lines [35] in the case of future autologous engraftments and more importantly, the reduced reconstitution potential of hematopoietic cells derived from PSCs. Therefore, most of the current studies aim to understand the mechanisms underlying survival, quiescence/proliferation balance and migration of PSC-derived cells compared to BM and UCB cells to overcome these limits and translate this technology to clinical applications.

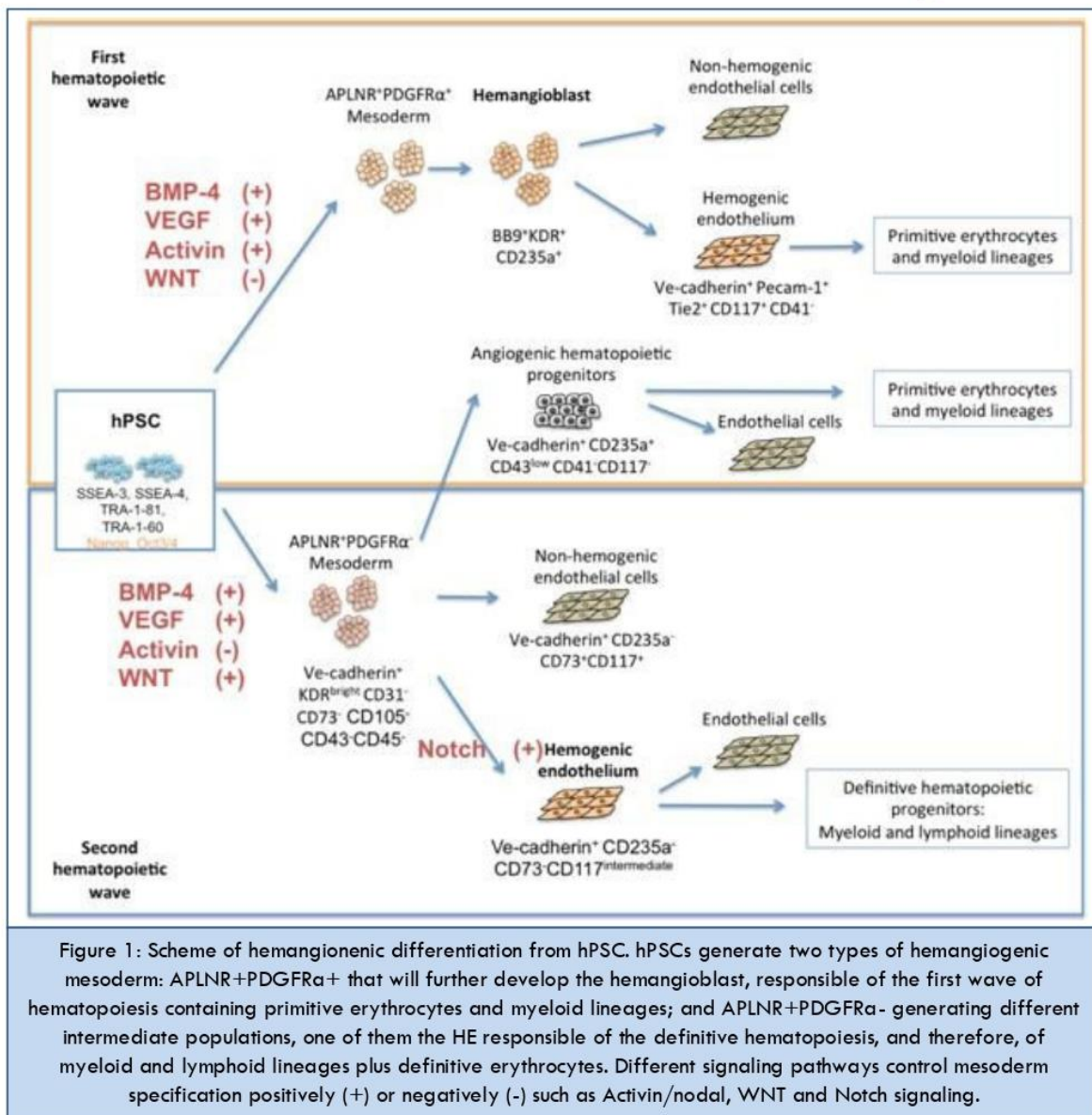


Figure 1: Scheme of hemangiogenic differentiation from hPSC. hPSCs generate two types of hemangiogenic mesoderm: APLNr+PDGFRα+ that will further develop the hemangioblast, responsible of the first wave of hematopoiesis containing primitive erythrocytes and myeloid lineages; and APLNr+PDGFRα- generating different intermediate populations, one of them the HE responsible of the definitive hematopoiesis, and therefore, of myeloid and lymphoid lineages plus definitive erythrocytes. Different signaling pathways control mesoderm specification positively (+) or negatively (-) such as Activin/nodal, WNT and Notch signaling.

REFERENCES

- Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292: 154–156.
- James A Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, et al. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. 282: 1145–1147.
- Sabin F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to Embryology*. 9: 213–262.
- Murray. P. D. F. (1932). *Proc.Roy.Soc.London*. 11: 497–521.
- Smith RA, Glomski CA. (1982). “Hemogenic Blood and Endothelium Precursors, Including Hemogenic Endothelium , at the Onset of Blood Development’. 1454–1464. doi: 10.1002/dvdy.23825.
- Dzierzak E, Speck NA. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*. 9: 129-136.
- Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, et al. (2008). Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of

- Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 3: 625–636.
8. Jean-Charles Boisset, Wiggert van Cappellen, Charlotte Andrieu-Soler, Niels Galjart, Elaine Dzierzak, et al. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*. 464: 116–120.
 9. Estelle Oberlin, Manuela Tavian, István Blazsek, Bruno Péault. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*. 129: 4147–4157.
 10. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*. 87: 27–45.
 11. Marion Kennedy, Meri Firpo, Kyunghee Choi, Charles Wall, Scott Robertson, et al. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*. 386: 488–493.
 12. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125: 725–732.
 13. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. 432: 625–630.
 14. Yun Shin Chung, Wen Jie Zhang, Elizabeth Arentson, Paul D. Kingsley, James Palis, et al. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development*. 129: 5511–5520.
 15. Richard A Smith, Chester A Glomski. (1982). “Hemogenic endothelium” of the embryonic aorta: Does it exist?. *Developmental & Comparative Immunology*. 6: 359–368.
 16. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, et al. (2004). Endothelial and Hematopoietic Cell Fate of Human Embryonic Stem Cells Originates from Primitive Endothelium with Hemangioblastic Properties. 21: 31–41.
 17. Kennedy M, et al. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*. American Society of Hematology. 109: 2679–2687.
 18. Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. (2014). Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 32: 554–561.
 19. Shi-Jiang Lu, Qiang Feng, Sergio Caballero, Yu Chen, Malcolm A S Moore, et al. (2007). Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nature methods*. 4: 501–509.
 20. Stella Pearson, Patrycja Sroczynska, Georges Lacaud, Valerie Kouskoff. (2008). The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*. 135: 1525–1535.
 21. Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D, et al. (2009). A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells*. 27: 1750–1759.
 22. Elias T Zambidis, Tea Soon Park, Wayne Yu, Ada Tam, Michal Levine, et al. (2008). Expression of ACE (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood*. 112: 3601–3614.
 23. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1 + VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 125: 1747–1757.
 24. Christophe Lancrin, Patrycja Sroczynska, Catherine Stephenson, Terry Allen, Valerie Kouskoff, et al. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*. 457: 892–895.
 25. Guilherme Costa, Andrzej Mazan, Arnaud Gandillet, Stella Pearson, Georges Lacaud, et al. (2012). SOX7 regulates the expression of VE-cadherin in the haemogenic endothelium at the onset of haematopoietic development. *Development*. 139: 1587–1598.
 26. Elias T Zambidis, Bruno Peault, Tea Soon Park, Fred Bunz, Curt I Civin. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. 106: 860–870.
 27. Choi KD, Vodyanik MA, Togarrati PP, Sukuntha K, Kumar A, et al. (2012). Identification of the hemogenic

- endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Reports*. 2: 553–567.
28. Pearson S, Cuvertino S, Fleury M, Lacaud G, Kouskoff V. (2015). In vivo repopulating activity emerges at the onset of hematopoietic specification during embryonic stem cell differentiation. *Stem cell reports*. 4: 431–444.
29. Kennedy M1, Awong G, Sturgeon CM, Ditadi A, LaMotte-Mohs R, et al. (2012). T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep*. 2: 1722–1735.
30. Galat Y, Elcheva I, Dambaeva S, Katukurundage D, Beaman K, et al. (2018). Application of small molecule CHIR99021 leads to the loss of hemangioblast progenitor and increased hematopoiesis of human pluripotent stem cells. *Experimental Hematology*. 65: 38–48.
31. Petter S Woll, Julie K Morris, Matt S Painschab, Rebecca K Marcus, Aimee D Kohn, et al. (2008). Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. 111: 122–131.
32. Galat Y, Dambaeva S, Elcheva I, Khanolkar A, Beaman K, et al. (2017). Cytokine-free directed differentiation of human pluripotent stem cells efficiently produces hemogenic endothelium with lymphoid potential. *Stem Cell Research & Therapy*. 8: 67.
33. Uenishi GI, Jung HS, Kumar A, Park MA, Hadland BK, et al. (2018). NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 9: 1828.
34. Perlingeiro RCR, Kyba M, Daley GQ. (2001). Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development*. 128: 4597–4604.
35. Féraud O, Valogne Y, Melkus MW, Zhang Y, Oudrhiri N, et al. (2016). Donor Dependent Variations in Hematopoietic Differentiation among Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *PLoS One*. 11: e0149291.
36. Lisheng Wang, Pablo Menendez, Farbod Shojaei, Li Li, Frederick Mazurier, et al. (2005). Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *Journal of Experimental Medicine*. 201: 1603–1614.
37. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renström J, et al. (2008). Efficient Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells on Stromal Cells Derived from Hematopoietic Niches. *Cell Stem Cell*. 3: 85–98.
38. Slukvin II, Kumar A. (2018). The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75: 3507–3520.
39. Mathew G Angelos, Juan E Abrahante, Robert H Blum, Dan S Kaufman. (2018). Single Cell Resolution of Human Hematoendothelial Cells Defines Transcriptional Signatures of Hemogenic Endothelium. *STEM CELLS*. 36: 206–217.
40. Reid JC, Tanasijevic B, Golubeva D, Boyd AL, Porras DP, et al. (2018). CXCL12/CXCR4 Signaling Enhances Human PSC-Derived Hematopoietic Progenitor Function and Overcomes Early In Vivo Transplantation Failure. *Stem Cell Reports*. 8: 1625–1641.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Aasen, T., and Belmonte, J.C.I. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 5, 371–382.

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284.

Abedi, H., and Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 15442–15451.

Adams, W.J., Zhang, Y., Cloutier, J., Kuchimanchi, P., Newton, G., Sehrawat, S., Aird, W.C., Mayadas, T.N., Luscinskas, F.W., and García-Cardena, G. (2013). Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 1, 105–113.

Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25, 803–816.

Afanassieff, M., Aksoy, I., Beaujean, N., Bourillot, P.-Y., and Savatier, P. (2018). Cinquante nuances de pluripotence. *Med Sci* 34, 944–953.

Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T. V (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946–953.

Allport, J.R., Muller, W.A., and Luscinskas, F.W. (2000). Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J. Cell Biol.* 148, 203–216.

Ambler, C.A., Nowicki, J.L., Burke, A.C., and Bautch, V.L. (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev. Biol.* 234, 352–364.

Amiri, A., Coppola, G., Scuderi, S., Wu, F., Roychowdhury, T., Liu, F., Pochareddy, S., Shin, Y., Safi, A., Song, L., et al. (2018). Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. *Science* (80-.). 362, eaat6720.

Ando, H., Yoshinaga, T., Yamamoto, W., Asakura, K., Uda, T., Taniguchi, T., Ojima, A., Shinkyō, R., Kikuchi, K., Osada, T., et al. (2017). A new paradigm for drug-induced torsadogenic risk assessment using human iPSC cell-derived cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 84, 111–127.

André, P. (2004). P-selectin in haemostasis. *Br. J. Haematol.* 126, 298–306.

Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1999a). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2286–2297.

Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1999b). Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell Adherens Junctions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2286–2297.

Angelini, D.J., Hyun, S.W., Grigoryev, D.N., Garg, P., Gong, P., Singh, I.S., Passaniti, A., Hasday, J.D., and Goldblum, S.E. (2006). TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 291.

Angelos, M.G., Ruh, P.N., Webber, B.R., Blum, R.H., Ryan, C.D., Bendzick, L., Shim, S., Yingst, A.M.,

Tufa, D.M., Verneris, M.R., et al. (2017). Aryl hydrocarbon receptor inhibition promotes hematology development from human pluripotent stem cells. *Blood* 129, 3428–3439.

Anjos-Afonso, F., Currie, E., Palmer, H.G., Foster, K.E., Taussig, D.C., and Bonnet, D. (2013). CD34-cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell* 13, 161–174.

Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2002). HOXB4-Induced Expansion of Adult Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Cell* 109, 39–45.

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, 149–161.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Beau, M.M. Le, Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 58–71.

Arcangeli, M.-L., Haddad, R., and Pflumio, F. (2015). Biology of hematopoietic stem cells in the adult. In *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, C. Durand, and P. Charbord, eds. (River publishers), pp. 353–390.

Archibald, P.R.T., Chandra, A., Thomas, D., Chose, O., Massouridès, E., Laâbi, Y., and Williams, D.J. (2016). Comparability of automated human induced pluripotent stem cell culture: a pilot study. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 1847–1858.

Ardalani, H., Sengupta, S., Harms, V., Vickerman, V., Thomson, J.A., and Murphy, W.L. (2019). 3-D culture and endothelial cells improve maturity of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Acta Biomater.* 95, 371–381.

Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., and Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc. Res. Tech.* 73, 1019–1029.

Arici, V., Perotti, C., Fabrizio, C., Del Fante, C., Ragni, F., Alessandrino, F., Viarengo, G., Pagani, M., Moia, A., Tinelli, C., et al. (2015). Autologous immuno magnetically selected CD133+ stem cells in the treatment of no-option critical limb ischemia: Clinical and contrast enhanced ultrasound assessed results in eight patients. *J. Transl. Med.* 13, 342.

Armstrong, S.M., Sugiyama, M.G., Fung, K.Y.Y., Gao, Y., Wang, C., Levy, A.S., Azizi, P., Roufaiel, M., Zhu, S.-N., Neculai, D., et al. (2015). A novel assay uncovers an unexpected role for SR-BI in LDL transcytosis. *Cardiovasc. Res.* 108, 268–277.

Asahara, T. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80-). 275, 964–966.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* (80-). 275, 964 LP – 966.

Asai, R., Haneda, Y., Seya, D., Arima, Y., Fukuda, K., Kurihara, Y., Miyagawa-Tomita, S., and Kurihara, H. (2017). Amniogenic somatopleure: a novel origin of multiple cell lineages contributing to the cardiovascular system. *Sci. Rep.* 7, 8955.

Assmus, B., Schächinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Döbert, N., Grünwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., et al. (2002). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106, 3009–3017.

Au, P., Daheron, L.M., Duda, D.G., Cohen, K.S., Tyrrell, J.A., Lanning, R.M., Fukumura, D., Scadden, D.T., and Jain, R.K. (2008). Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human

umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* *111*, 1302–1305.

Augustin, H.G., Young Koh, G., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 165–177.

Avior, Y., Sagi, I., and Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 170–182.

Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., De Kreutzenberg, S., and Fadini, G.P. (2011). Endothelial dysfunction in diabetes: The role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* *34*, S285–S290.

Ayllón, V., Bueno, C., Ramos-Mejía, V., Navarro-Montero, O., Prieto, C., Real, P.J., Romero, T., García-León, M.J., Toribio, M.L., Bigas, A., et al. (2015). The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematoendothelial progenitors and regulates their hematopoietic fate. *Leukemia* *29*, 1741–1753.

Azizi, P.M., Zyla, R.E., Guan, S., Wang, C., Liu, J., Bolz, S.S., Heit, B., Klip, A., and Lee, W.L. (2015). Clathrin-dependent entry and vesicle-mediated exocytosis define insulin transcytosis across microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* *26*, 740–750.

Baghbaderani, B.A., Tian, X., Neo, B.H., Burkall, A., Dimezzo, T., Sierra, G., Zeng, X., Warren, K., Kovarcik, D.P., Fellner, T., et al. (2015). cGMP-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Available for Pre-clinical and Clinical Applications. *Stem Cell Reports* *5*, 647–659.

Banerji, S., Ni, J., Wang, S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., and Jackson, D.G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.* *144*, 789–801.

Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* *23*, 2134–2139.

Barakat, T.S., Ghazvini, M., de Hoon, B., Li, T., Eussen, B., Douben, H., van der Linden, R., van der Stap, N., Boter, M., Laven, J.S., et al. (2015). Stable X Chromosome Reactivation in Female Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* *4*, 199–208.

Baum, O., Suter, F., Gerber, B., Tschanz, S.A., Buergy, R., Blank, F., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2010). VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane. *Microcirculation* *17*, 447–457.

Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C.-P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D.T., Sison-Young, R., Jenkins, R., et al. (2015). Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J. Hepatol.* *62*, 581–589.

Behrens, A.N., Zierold, C., Shi, X., Ren, Y., Koyano-Nakagawa, N., Garry, D.J., and Martin, C.M. (2014). Sox7 is regulated by ETV2 during cardiovascular development. *Stem Cells Dev.* *23*, 2004–2013.

Belair, D.G., Whisler, J.A., Valdez, J., Velazquez, J., Molenda, J.A., Vickerman, V., Lewis, R., Daigh, C., Hansen, T.D., Mann, D.A., et al. (2015). Human Vascular Tissue Models Formed from Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Endothelial Cells. *Stem Cell Rev. Reports* *11*, 511–525.

van den Berg, C.W., Ritsma, L., Avramut, M.C., Wiersma, L.E., van den Berg, B.M., Leuning, D.G., Liewers, E., Koning, M., Vanslambrouck, J.M., Koster, A.J., et al. (2018). Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neo-vasculogenesis and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo. *Stem Cell Reports* *10*, 751–765.

Berger, D.R., Ware, B.R., Davidson, M.D., Allsup, S.R., and Khetani, S.R. (2015). Enhancing the functional maturity of induced pluripotent stem cell-derived human hepatocytes by controlled presentation of cell-cell interactions in vitro. *Hepatology* 61, 1370–1381.

Bernard, C.J., Connors, D., Barber, L., Jayachandra, S., Bullen, A., and Cacace, A. (2004). Adjunct automation to the cellmate™ cell culture robot. *J. Assoc. Lab. Autom.* 9, 209–217.

Bernas, M.J., Cardoso, F.L., Daley, S.K., Weinand, M.E., Campos, A.R., Ferreira, A.J.G., Hoying, J.B., Witte, M.H., Brites, D., Persidsky, Y., et al. (2010). Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nat. Protoc.* 5, 1265–1272.

Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., and Godin, I. (2005). Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106, 3004–3011.

Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Fiers, W., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. (1986). Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: Characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4533–4537.

Beyer, A.I., and Muench, M.O. (2017). Comparison of Human Hematopoietic Reconstitution in Different Strains of Immunodeficient Mice. *Stem Cells Dev.* 26, 102–112.

Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., and Dick, J.E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID- repopulating activity. *Nat. Med.* 4, 1038–1045.

Björnsson, J.M., Larsson, N., Brun, A.C.M., Magnusson, M., Andersson, E., Lundström, 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, 3872–3883.

Blank, U., and Karlsson, S. (2011). The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology. *Leukemia* 25, 1379–1388.

Blatchley, M.R., and Gerecht, S. (2020). Reconstructing the Vascular Developmental Milieu In Vitro. *Trends Cell Biol.* 30, 15–31.

Blatter, L.A., and Wier, W.G. (1994). Nitric oxide decreases [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15, 122–131.

Bloom, W., and Bartelmez, G.W. (1940a). Hematopoiesis in young human embryos. *Am. J. Anat.* 67, 21–53.

Bloom, W., and Bartelmez, G.W. (1940b). Hematopoiesis in young human embryos. *Am. J. Anat.* 67, 21–53.

Bluteau, O., Langlois, T., Rivera-Munoz, P., Favale, F., Rameau, P., Meurice, G., Dessen, P., Solary, E., Raslova, H., Mercher, T., et al. (2013). Developmental changes in human megakaryopoiesis. *J. Thromb. Haemost.* 11, 1730–1741.

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., et al. (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439–452.

Böiers, C., Carrelha, J., Lutteropp, M., Luc, S., Green, J.C.A., Azzoni, E., Woll, P.S., Mead, A.J., Hultquist, A., Swiers, G., et al. (2013). Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 535–548.

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* 464, 116–120.

Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., et al. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* (80-). 329, 1345–1348.

Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X.H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., et al. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 103, 2577–2584.

Borge, O., Ramsfjell, V., Veiby, O.P., Murphy, M.J., Lok, S., and Jacobsen, S.E. (1996). Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood* 88 8, 2859–2870.

Bos, F.L., Hawkins, J.S., and Zovein, A.C. (2015). Single-cell resolution of morphological changes in hemogenic endothelium.

Boyer, T., Manns, M., and Sanyal, A. (2012). *Zakim and Boyer's Hepatology* (Elsevier Inc.).

Braam, S.R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., et al. (2008). Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via $\alpha V\beta 5$ Integrin. *Stem Cells* 26, 2257–2265.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255–256.

Brickman, J.M., and Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 6, e259.

Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195.

De Bruijn, M.F.T.R., Speck, N.A., Peeters, M.C.E., and Dzierzak, E. (2000). Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J.* 19, 2465–2474.

Brun, A.C.M., Björnsson, J.M., Magnusson, M., Larsson, N., Leveén, 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, 4126–4133.

Bundgaard, M. (1984). The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.* 88, 1–17.

Bunn, H.F., and Aster, J.C. (2011). *Pathophysiology of blood disorders* (The McGraw-Hill Companies).

Burri, P.H., and Tarek, M.R. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* 228, 35–45.

Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn.* 231, 474–488.

Buza-Vidas, N., Antonchuk, J., Qian, H., Månsson, R., Luc, S., Zandi, S., Anderson, K., Takaki, S., Nygren, J.M., Jensen, C.T., et al. (2006). Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev.* 20, 2018–2023.

Caduff, J.H., Fischer, L.C., and Burri, P.H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat. Rec.* 216, 154–164.

Caldwell, P.R.B., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M., and Soffer, R.L. (1976). Angiotensin-converting

enzyme: Vascular endothelial localization. *Science* (80-.). *191*, 1050–1051.

Calvo, J., BenYoucef, A., Baijer, J., Rouyez, M.-C., and Pflumio, F. (2012). Assessment of Human Multi-Potent Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Potential Using a Single In Vitro Screening System. *PLoS One* *7*, e50495.

Camp, J.G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Bräuninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., et al. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 15672–15677.

Camp, J.G., Sekine, K., Gerber, T., Loeffler-Wirth, H., Binder, H., Gac, M., Kanton, S., Kageyama, J., Damm, G., Seehofer, D., et al. (2017). Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* *546*, 533–538.

Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F., and Harder, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* *78*, 415–423.

Cano, R.L.E., and Lopera, H.D.E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes.

Cardier, J.E., and Barberá-Guillem, E. (1997). Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* *26*, 165–175.

Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Cannon, R.O., and Panza, J.A. (2000). Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* *35*, 1237–1241.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* *380*, 435–439.

Caron, J., Pène, V., Tolosa, L., Villaret, M., Luce, E., Fourrier, A., Heslan, J.-M., Saheb, S., Bruckert, E., Gómez-Lechón, M.J., et al. (2019). Low-density lipoprotein receptor-deficient hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells allow familial hypercholesterolemia modeling, CRISPR/Cas-mediated genetic correction, and productive hepatitis C virus infection. *Stem Cell Res. Ther.* *10*, 221.

Caselli, A., Olson, T.S., Otsuru, S., Chen, X., Hofmann, T.J., Nah, H.-D., Grisendi, G., Paolucci, P., Dominici, M., and Horwitz, E.M. (2013). IGF-1-mediated osteoblastic niche expansion enhances long-term hematopoietic stem cell engraftment after murine bone marrow transplantation. *Stem Cells* *31*, 2193–2204.

Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Koeg, J.M., and Panza, J.A. (1994). Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* *23*, 844–850.

Castaño, J., Aranda, S., Bueno, C., Calero-Nieto, F.J., Mejia-Ramirez, E., Mosquera, J.L., Blanco, E., Wang, X., Prieto, C., Zabaleta, L., et al. (2019). GATA2 Promotes Hematopoietic Development and Represses Cardiac Differentiation of Human Mesoderm. *Stem Cell Reports* *13*, 515–529.

Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Georgakopoulos, D., Bull, C., Thomas, O., Robinson, J., and Deanfield, J.E. (1993). Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* *88*, 2149–2155.

Challen, G.A., and Goodell, M.A. (2010). Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* *38*, 403–416.

Chanda, B., Ditadi, A., Iscove, N.N., and Keller, G. (2013). XRetinoic acid signaling is essential for

embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell* 155, 215.

Charbord, P., and Moore, K. (2005). Gene Expression in Stem Cell-Supporting Stromal Cell Lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 159–167.

Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., et al. (2011a). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* 8, 424–429.

Chen, G., Guo, Y., Li, C., Li, S., and Wan, X. (2020). Small Molecules that Promote Self-Renewal of Stem Cells and Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Rev. Reports*.

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, 887–891.

Chen, M.J., Li, Y., De Obaldia, M.E., Yang, Q., Yzaguirre, A.D., Yamada-Inagawa, T., Vink, C.S., Bhandoola, A., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2011b). Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* 9, 541–552.

Chen, V.C., Couture, S.M., Ye, J., Lin, Z., Hua, G., Huang, H.I.P., Wu, J., Hsu, D., Carpenter, M.K., and Couture, L.A. (2012a). Scalable GMP compliant suspension culture system for human ES cells. *Stem Cell Res.* 8, 388–402.

Chen, X.L., Nam, J.O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C.T., Goka, E., Lim, S.T., Tomar, A., Tancioni, I., Uryu, S., et al. (2012b). VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK. *Dev. Cell* 22, 146–157.

Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.

Cho, S.J., Kim, K.T., Jeong, H.C., Park, J.C., Kwon, O.S., Song, Y.H., Shin, J.G., Kang, S., Kim, W., Shin, H.D., et al. (2018). Selective Elimination of Culture-Adapted Human Embryonic Stem Cells with BH3 Mimetics. *Stem Cell Reports* 11, 1244–1256.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725–732.

Choi, K.D., Vodyanik, M.A., and Slukvin, I.I. (2009). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43 +CD45+ progenitors. *J. Clin. Invest.* 119, 2818–2829.

Choi, K.D., Vodyanik, M.A., Togarrati, P.P., Suknuntha, K., Kumar, A., Samarjeet, F., Probasco, M.D., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., et al. (2012). Identification of the Hemogenic Endothelial Progenitor and Its Direct Precursor in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures. *Cell Rep.* 2, 553–567.

Choi, S.M., Kim, Y., Shim, J.S., Park, J.T., Wang, R.-H., Leach, S.D., Liu, J.O., Deng, C., Ye, Z., and Jang, Y.-Y. (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 57, 2458–2468.

Chou, S., and Lodish, H.F. (2010). Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7799–7804.

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.

Christensen, K., Roudnicky, F., Patsch, C., and Burcin, M. (2018). Requirements for Using iPSC-Based Cell Models for Assay Development in Drug Discovery BT - Engineering and Application of

Pluripotent Stem Cells. U. Martin, R. Zweigerdt, and I. Gruh, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 207–220.

Ciampi, O., Bonandrini, B., Derosas, M., Conti, S., Rizzo, P., Benedetti, V., Figliuzzi, M., Remuzzi, A., Benigni, A., Remuzzi, G., et al. (2019). Engineering the vasculature of decellularized rat kidney scaffolds using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Sci. Rep.* *9*, 1–10.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., et al. (1998). Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* *91*, 3527–3561.

Ciriza, J., Thompson, H., Petrosian, R., Manilay, J.O., and García-Ojeda, M.E. (2013). The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: Lessons learned and possible clinical applications. *Exp. Hematol.* *41*, 411–423.

Clarke, R.L., Yzaguirre, A.D., Yashiro-Ohtani, Y., Bondue, A., Blanpain, C., Pear, W.S., Speck, N.A., and Keller, G. (2013). The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. *Nat. Cell Biol.* *15*, 502–510.

Cocks, T.M., and Angus, J.A. (1983). Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* *305*, 627–630.

Cohen, S., Roy, J., Lachance, S., Marinier, A., Barabé, F., Delisle, J.-S., Roy, D.-C., Busque, L., Ahmad, I., Bambace, N.M., et al. (2018). Single UM171 Expanded Cord Blood Transplant is Feasible, Safe, and Permits Transplantation of Better HLA Matched Cords with Very Low Transplant Related Mortality. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *24*, S190–S191.

Conway, M.K., Gerger, M.J., Balay, E.E., O’Connell, R., Hanson, S., Daily, N.J., and Wakatsuki, T. (2015). Scalable 96-well plate based iPSC culture and production using a robotic liquid handling system. *J. Vis. Exp.* *2015*, 52755.

Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., et al. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9815–9820.

Corada, M., Orsenigo, F., Morini, M.F., Pitulescu, M.E., Bhat, G., Nyqvist, D., Breviario, F., Conti, V., Briot, A., Iruela-Arispe, M.L., et al. (2013). Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat. Commun.* *4*.

Corada, M., Morini, M.F., and Dejana, E. (2014). Signaling pathways in the specification of arteries and veins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2372–2377.

Cornell, R.A., and Kimelman, D. (1994). Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* *120*, 453 LP – 462.

Coultas, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* *438*, 937–945.

Couture, T., Oiknine, L., and Chiche, L. (2019). Prise en charge en urgence d’un patient en ischémie aiguë de membre inférieur. *Médecine d’urgence YP-*.

Criqui, M.H., and Aboyans, V. (2015). Epidemiology of Peripheral Artery Disease. *Circ. Res.* *116*, 1509–1526.

Critser, P.J., and Yoder, M.C. (2010). Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *15*, 68–72.

Crook, J.M., Peura, T.T., Kravets, L., Bosman, A.G., Buzzard, J.J., Horne, R., Hentze, H., Dunn, N.R., Zweigerdt, R., Chua, F., et al. (2007). The Generation of Six Clinical-Grade Human Embryonic Stem

Cell Lines. *Cell Stem Cell* 1, 490–494.

Cumano, A., Garcia-Porrero, J., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1995). [Intra-embryonic hematopoiesis in mice]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 189, 617–627.

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907–916.

Cumano, A., Ferraz, J.C., Klaine, M., Di Santo, J.P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477–485.

Cyr, A.R., Huckaby, L. V., Shiva, S.S., and Zuckerbraun, B.S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit. Care Clin.* 36, 307–321.

Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Webb, D.J., and Maguire, J.J. (2016). Endothelin. *Pharmacol. Rev.* 68, 357–418.

Davidson, K.C., Mason, E.A., and Pera, M.F. (2015). The pluripotent state in mouse and human. *Dev.* 142, 3090–3099.

Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R., and Harrison, D.G. (2001). Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circ. Res.* 89, 1073–1080.

Demirci, S., Leonard, A., and Tisdale, J.F. (2020). Hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells: Clinical potential, challenges, and future perspectives. *Stem Cells Transl. Med.* sctm.20-0247.

Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.-H., Yu, J., et al. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol.* 27, 353–360.

Desprat, R., Milhavel, O., and Lemaitre, J.-M. (2014). The Molecular Machinery of Somatic Cell Reprogramming.

Dias, J., Gumenyuk, M., Kang, H., Vodyanik, M., Yu, J., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2011). Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 20, 1639–1647.

Dieterlen-Lievre, par F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33, 607 LP – 619.

Dieterlen-Lièvre, F., and Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* 88, 180–191.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Ding, Q., Lee, Y.-K., Schaefer, E.A.K., Peters, D.T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D.L., Meissner, T.B., Hendriks, W.T., et al. (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 12, 238–251.

Ditadi, A., Sturgeon, C.M., Tober, J., Awong, G., Kennedy, M., Yzaguirre, A.D., Azzola, L., Ng, E.S., Stanley, E.G., French, D.L., et al. (2015). Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. *Nat. Cell Biol.* 17, 580–591.

Ditadi, A., Sturgeon, C.M., and Keller, G. (2017). A view of human haematopoietic development from the Petri dish. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 56–67.

Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Compr. Physiol.* 3, 785–797.

Do, H., Healey, J.F., Waller, E.K., and Lollar, P. (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 19587–19592.

Doetschman, T.C., Eistetter, H., and Katz, M. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : formation of visceral yolk sac , blood islands and myocardium. *27–45*.

Doulatov, S., Vo, L.T., Chou, S.S., Kim, P.G., Arora, N., Li, H., Hadland, B.K., Bernstein, I.D., Collins, J.J., Zon, L.I., et al. (2013). Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell* *13*, 459–470.

Drake, C.J., and Fleming, P.A. (2000). Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* *95*, 1671–1679.

Draper, J.S., Moore, H.D., Ruban, L.N., Gokhale, P.J., and Andrews, P.W. (2004). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* *13*, 325–336.

Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Gainor, J.F., Furie, B.C., and Furie, B. (2007). Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J. Clin. Invest.* *117*, 953–960.

Duchez, P., Chevalayre, J., Vlaski, M., Dazey, B., Milpied, N., Boiron, J.M., and Ivanovic, Z. (2012). Definitive setup of clinical scale procedure for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic cells for transplantation. *Cell Transplant.* *21*, 2517–2521.

Dunn, S.-J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., and Smith, A.G. (2014). Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science (80-.)*. *344*, 1156 LP – 1160.

Dye, B.R., Dedhia, P.H., Miller, A.J., Nagy, M.S., White, E.S., Shea, L.D., and Spence, J.R. (2016). A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *Elife* *5*, 1–18.

Ebrahimi, B. (2015). Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen. (London, England)* *4*, 10.

Edwards, G., and Weston, A.H. (2004). Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol. Res.* *49*, 535–541.

Egorova, A.D., DeRuiter, M.C., De Boer, H.C., Van De Pas, S., Gittenberger-De Groot, A.C., Van Zonneveld, A.J., Poelmann, R.E., and Hierck, B.P. (2012). Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* *48*, 21–29.

Eguizabal, C., Aran, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Geens, M., Heindryckx, B., Panula, S., Popovic, M., Vassena, R., and Veiga, A. (2019). Two decades of embryonic stem cells: a historical overview. *Hum. Reprod. Open* *2019*, 1–17.

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* *3*, 519–532.

Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2006). Molecular Mechanisms Underlying the Dedifferentiation Process of Isolated Hepatocytes and Their Cultures. *Curr. Drug Metab.* *7*, 629–660.

Ellsworth, D.C., Shukla, N., Fleming, I., and Jeremy, J.Y. (2014). Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc. Res.* *102*, 9–16.

Ellsworth, M.L., Ellis, C.G., Goldman, D., Stephenson, A.H., Dietrich, H.H., and Sprague, R.S.

(2009). Erythrocytes: Oxygen Sensors and Modulators of Vascular Tone. *Physiology* 24, 107–116.

Elvevold, K., Simon-Santamaria, J., Hasvold, H., McCourt, P., Smedsrød, B., and Sørensen, K.K. (2008). Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology* 48, 2007–2015.

Ema, H., and Nakauchi, H. (2000). Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95, 2284–2288.

Ema, M., Takahashi, S., and Rossant, J. (2006a). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* 107, 111–117.

Ema, M., Yokomizo, T., Wakamatsu, A., Terunuma, T., Yamamoto, M., and Takahashi, S. (2006b). Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* 108, 4018–4024.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.

Espín-Palazón, R., Stachura, D.L., Campbell, C.A., García-Moreno, D., Del Cid, N., Kim, A.D., Candel, S., Meseguer, J., Mulero, V., and Traver, D. (2014). Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell* 159, 1070–1085.

Esteban, S., Clemente, C., Koziol, A., Gonzalo, P., Rius, C., Martínez, F., Linares, P.M., Chaparro, M., Urzainqui, A., Andrés, V., et al. (2020). Endothelial MT 1- MMP targeting limits intussusceptive angiogenesis and colitis via TSP1/nitric oxide axis. *EMBO Mol. Med.* 12.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Fahs, S.A., Hille, M.T., Shi, Q., Weiler, H., and Montgomery, R.R. (2014). A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* 123, 3706–3713.

Faley, S.L., Neal, E.H., Wang, J.X., Bosworth, A.M., Weber, C.M., Balotin, K.M., Lippmann, E.S., and Bellan, L.M. (2019). iPSC-Derived Brain Endothelium Exhibits Stable, Long-Term Barrier Function in Perfused Hydrogel Scaffolds. *Stem Cell Reports* 12, 474–487.

Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., Csaszar, E., Knapp, D.J.H.F., Miller, P., Ngom, M., et al. (2014). Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* (80-). 345, 1509–1512.

De Felice, L., Tatarelli, C., Mascolo, M.G., Gregorj, C., Agostini, F., Fiorini, R., Gelmetti, V., Pascale, S., Padula, F., Petrucci, M.T., et al. (2005). Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* 65, 1505–1513.

Feng, Q., Shabrani, N., Thon, J.N., Huo, H., Thiel, A., Machlus, K.R., Kim, K., Brooks, J., Li, F., Luo, C., et al. (2014). Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 817–831.

Féraud, O., Valogne, Y., Melkus, M.W., and Zhang, Y. (2016a). Donor Dependent Variations in Hematopoietic Differentiation among Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Lines. 1–22.

Féraud, O., Valogne, Y., Melkus, M.W., Zhang, Y., Oudrhiri, N., Haddad, R., Daury, A., Rocher, C., Larbi, A., Duquesnoy, P., et al. (2016b). Donor Dependent Variations in Hematopoietic Differentiation among Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *PLoS One* 11, e0149291.

Ferdous, A., Caprioli, A., Iacovino, M., Martin, C.M., Morris, J., Richardson, J.A., Latif, S., Hammer, R.E., Harvey, R.P., Olson, E.N., et al. (2009). Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and

specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 814–819.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442.

Ferratge, S., Ha, G., Carpentier, G., Arouche, N., Bascetin, R., Muller, L., Germain, S., and Uzan, G. (2017a). Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Res.* *21*, 148–159.

Ferratge, S., Ha, G., Carpentier, G., Arouche, N., Bascetin, R., Muller, L., Germain, S., and Uzan, G. (2017b). Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Res.* *21*, 148–159.

Ficara, F., Murphy, M.J., Lin, M., and Cleary, M.L. (2008). Pbx1 Regulates Self-Renewal of Long-Term Hematopoietic Stem Cells by Maintaining Their Quiescence. *Cell Stem Cell* *2*, 484–496.

Filali, E. El, Hiralall, J.K., Van Veen, H.A., Stolz, D.B., and Seppen, J. (2013). Human Liver Endothelial Cells, But Not Macrovascular or Microvascular Endothelial Cells, Engraft in the Mouse Liver. *Cell Transplant.* *22*, 1801–1811.

Filipovic, N., Tsuda, A., Lee, G.S., Miele, L.F., Lin, M., Konerding, M.A., and Mentzer, S.J. (2009). Computational flow dynamics in a geometric model of intussusceptive angiogenesis. *Microvasc. Res.* *78*, 286–293.

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* *2417–2426*.

Flamme, I., and Risau, W. (1992). Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* *116*, 435 LP – 439.

Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* *14*, 264–271.

Forcade, E., Cognet, C., Sicard, X., Daburon, S., Duchez, P., Ivanovic, Z., Pitard, V., Déchanet-Merville, J., Clave, E., Toubert, A., et al. (2015). Comparable Immune Reconstitution Between Ex Vivo Amplification and Un-Manipulated Umbilical Cord Blood Transplantation. *Blood* *126*, 1936.

Foty, R.A., and Steinberg, M.S. (2005). The differential adhesion hypothesis: A direct evaluation. *Dev. Biol.* *278*, 255–263.

Fowler, J.L., Ang, L.T., and Loh, K.M. (2020). A critical look: Challenges in differentiating human pluripotent stem cells into desired cell types and organoids. *WIREs Dev. Biol.* *9*.

Fraczek, J., Bolleyn, J., Vanhaecke, T., Rogiers, V., and Vinken, M. (2013). Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: At the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Arch. Toxicol.* *87*, 577–610.

Frame, J.M., Fegan, K.H., Conway, S.J., McGrath, K.E., and Palis, J. (2016). Definitive Hematopoiesis in the Yolk Sac Emerges from Wnt-Responsive Hemogenic Endothelium Independently of Circulation and Arterial Identity. *Stem Cells* *34*, 431–444.

François, M., Caprini, A., Hosking, B., Orsenigo, F., Wilhelm, D., Browne, C., Paavonen, K., Karnezis, T., Shayan, R., Downes, M., et al. (2008). Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* *456*, 643–647.

Frank, P.G., Woodman, S.E., Park, D.S., and Lisanti, M.P. (2003). Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 1161–1168.

Franses, J.W., Drosu, N.C., Gibson, W.J., Chitalia, V.C., and Edelman, E.R. (2013). Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int. J. Cancer* *133*, 1334–1344.

Freedman, B.S., Brooks, C.R., Lam, A.Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A.F., Li, M.K., Hughes, M.R., Werff, R. Vander, et al. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat. Commun.* *6*, 1–13.

French, A., Yang, C.-T., Taylor, S., Watt, S.M., and Carpenter, L. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived B Lymphocytes Express sIgM and Can Be Generated via a Hemogenic Endothelium Intermediate. *Stem Cells Dev.* *24*, 1082–1095.

Frisch, B.J., and Calvi, L.M. (2014). Hematopoietic stem cell cultures and assays. *Methods Mol. Biol.* *1130*, 315–324.

Froldi, G., and Dorigo, P. (2020). Endothelial dysfunction in Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Gender and age influences. *Med. Hypotheses* *144*, 110015.

Fujimoto, H., and Yanagisawa, K.O. (1984). Defects in the archenteron of mouse embryos homozygous for the T-mutation. *Differentiation* *25*, 44–47.

Fujita, Y., Nishimura, M., Taniwaki, M., Abe, T., and Okuda, T. (2001). Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 1248–1255.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* *288*, 373–376.

van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). Le système phagocytaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches. *Bull. World Health Organ.* *47*, 651–658.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.

Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., and Lyman, S. (1995). Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood* *86* 5, 1661–1670.

Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., et al. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* *504*, 282–286.

Gage, B.K., Liu, J.C., Innes, B.T., MacParland, S.A., McGilvray, I.D., Bader, G.D., and Keller, G.M. (2020). Generation of Functional Liver Sinusoidal Endothelial Cells from Human Pluripotent Stem-Cell-Derived Venous Angioblasts. *Cell Stem Cell* *27*, 254-269.e9.

Galán-Díez, M., and Kousteni, S. (2017). The osteoblastic niche in hematopoiesis and hematological myeloid malignancies. *Curr. Mol. Biol. Reports* *3*, 53–62.

Galat, Y., Dambaeva, S., Elcheva, I., Khanolkar, A., Beaman, K., Iannaccone, P.M., and Galat, V. (2017). Cytokine-free directed differentiation of human pluripotent stem cells efficiently produces hemogenic endothelium with lymphoid potential. 1–11.

Galat, Y., Elcheva, I., Dambaeva, S., Katukurundage, D., Beaman, K., Iannaccone, P.M., and Galat,

V. (2018). Application of small molecule CHIR99021 leads to the loss of hemangioblast progenitor and increased hematopoiesis of human pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* *65*, 38-48.e1.

Galie, P.A., Nguyen, D.H.T., Choi, C.K., Cohen, D.M., Janmey, P.A., and Chen, C.S. (2014). Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7968–7973.

Gama-Norton, L., Ferrando, E., Ruiz-Herguido, C., Liu, Z., Guiu, J., Islam, A.B.M.M.K., Lee, S.U., Yan, M., Guidos, C.J., López-Bigas, N., et al. (2015). Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nat. Commun.* *6*, 1–12.

Garcez, P.P., Loiola, E.C., Madeiro da Costa, R., Higa, L.M., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, J.M., Brindeiro, R., Tanuri, A., and Rehen, S.K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80-.)*. *352*, 816 LP – 818.

Garcia-Alegria, E., Iluit, M., Stefanska, M., Silva, C., Heeg, S., Kimber, S.J., Kouskoff, V., Lacaud, G., Vijayaraghavan, A., and Batta, K. (2016). Graphene Oxide promotes embryonic stem cell differentiation to haematopoietic lineage. *Sci. Rep.* *6*, 1–13.

Garcia-Porrero, J.A., Godin, I.E., and Dieterlen-Lièvre, F. (1995). Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat. Embryol. (Berl)*. *192*, 425–435.

García-Vallejo, J.J., Van Dijk, W., Van Het Hof, B., Van Die, I., Engelse, M.A., Van Hinsbergh, V.W.M., and Gringhuis, S.I. (2006). Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell. Physiol.* *206*, 203–210.

Garipcan, B., Maenz, S., Pham, T., Settmacher, U., Jandt, K.D., Zanow, J., and Bossert, J. (2011). Image Analysis of Endothelial Microstructure and Endothelial Cell Dimensions of Human Arteries - A Preliminary Study. *Adv. Eng. Mater.* *13*, B54–B57.

Gartner, S., and Kaplan, H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 4756–4759.

Gary, T. (2019). *Venous Thromboembolism*. (Springer, Cham), pp. 235–243.

Gaur, M., Kamata, T., Wang, S., Moran, B., Shattil, S.J., and Leavitt, A.D. (2006). Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: A genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J. Thromb. Haemost.* *4*, 436–442.

Gekas, C., Dieterlen-Lièvre, F., Orkin, S.H., and Mikkola, H.K.A. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev. Cell* *8*, 365–375.

Genders, A.J., Frison, V., Abramson, S.R., and Barrett, E.J. (2013). Endothelial cells actively concentrate insulin during its transendothelial transport. *Microcirculation* *20*, 434–439.

Generali, M., Casanova, E.A., Kehl, D., Wanner, D., Hoerstrup, S.P., Cinelli, P., and Weber, B. (2019). Autologous endothelialized small-caliber vascular grafts engineered from blood-derived induced pluripotent stem cells. *Acta Biomater.* *97*, 333–343.

Gertow, K., Hirst, C.E., Yu, Q.C., Ng, E.S., Pereira, L.A., Davis, R.P., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2013). WNT3A Promotes Hematopoietic or Mesenchymal Differentiation from hESCs Depending on the Time of Exposure. *Stem Cell Reports* *1*, 53–65.

Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., et al. (2015). m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science (80-.)*. *347*, 1002 LP – 1006.

Ghozi, M.C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y. (1996). Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A. 93, 1935–1940.

Gianni-Barrera, R., Trani, M., Reginato, S., and Banfi, A. (2011). To sprout or to split? VEGF, Notch and vascular morphogenesis. In *Biochemical Society Transactions*, (Portland Press), pp. 1644–1648.

Gieseck III, R.L., Hannan, N.R.F., Bort, R., Hanley, N.A., Drake, R.A.L., Cameron, G.W.W., Wynn, T.A., and Vallier, L. (2014). Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes by 3D-Culture. *PLoS One* 9, e86372.

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* (80-.). 330, 841–845.

Godin, I., Dieterlen-Lièvre, 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, 773–777.

Godin, I.E., Garcia-Porrero, J.A., Coutinho, A., Dieterlen-Lièvre, F., and Marcos, M.A.R. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67–70.

Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U., Andersen, M.E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J.G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., et al. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* 87, 1315–1530.

Gokhale, P.J., Au-Young, J.K., Dadi, S., Keys, D.N., Harrison, N.J., Jones, M., Soneji, S., Enver, T., Sherlock, J.K., and Andrews, P.W. (2015). Culture Adaptation Alters Transcriptional Hierarchies among Single Human Embryonic Stem Cells Reflecting Altered Patterns of Differentiation. *PLoS One* 10, e0123467.

Goldie, L.C., Lucitti, J.L., Dickinson, M.E., and Hirschi, K.K. (2008). Cell signaling directing the formation and function of hemogenic endothelium during murine embryogenesis. *Blood* 112, 3194–3204.

Goldman, O., Feraud, O., Ponio, B.-D., Driancourt, C., Clay, D., Bousse-Kerdiles, L., Bennaceur-Grisicelli, A., Uzan, G., and others (2009). A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells* 27, 1750–1759.

Goldstein, G.W., Csajty, J., and Diamond, I. (1977). CARRIER MEDIATED GLUCOSE TRANSPORT IN CAPILLARIES ISOLATED FROM RAT BRAIN. *J. Neurochem.* 28, 725–728.

Goodell, M.A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D.F., Demaria, M., Paradis, G., Grupp, S.A., Sieff, C.A., Mulligan, R.C., and Johnson, R.P. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.* 3, 1337–1345.

Gori, J.L., Butler, J.M., Chan, Y.Y., Chandrasekaran, D., Poulos, M.G., Ginsberg, M., Nolan, D.J., Elemento, O., Wood, B.L., Adair, J.E., et al. (2015). Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* 125, 1243–1254.

Gory, S., Vernet, M., Laurent, M., Dejana, E., Dalmon, J., and Huber, P. (1999). The Vascular Endothelial-Cadherin Promoter Directs Endothelial-Specific Expression in Transgenic Mice. *Blood* 93, 184–192.

Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., and Kurokawa, M. (2008). Evi-1 Is a Critical Regulator for Hematopoietic Stem Cells and Transformed Leukemic Cells. *Cell Stem Cell* 3, 207–220.

Granton, J., Langleben, D., Kutryk, M.B., Camack, N., Galipeau, J., Courtman, D.W., and Stewart,

D.J. (2015). Endothelial NO-Synthase Gene-Enhanced Progenitor Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: The PHACeT Trial. *Circ. Res.* *117*, 645–654.

Green, S.J. (2020). Covid-19 accelerates endothelial dysfunction and nitric oxide deficiency. *Microbes Infect.* *22*, 149.

Gritz, E., and Hirschi, K.K. (2016). Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 1547–1567.

Gu, M., Shao, N.Y., Sa, S., Li, D., Termglinchan, V., Ameen, M., Karakikes, I., Sosa, G., Grubert, F., Lee, J., et al. (2017). Patient-Specific iPSC-Derived Endothelial Cells Uncover Pathways that Protect against Pulmonary Hypertension in BMPR2 Mutation Carriers. *Cell Stem Cell* *20*, 490-504.e5.

Guan, Y., Xu, D., Garfin, P.M., Ehmer, U., Hurwitz, M., Enns, G., Michie, S., Wu, M., Zheng, M., Nishimura, T., et al. (2017). Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI Insight* *2*.

Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *7*, 249–257.

Guiu, J., Shimizu, R., D'Altri, T., Fraser, S.T., Hatakeyama, J., Bresnick, E.H., Kageyama, R., Dzierzak, E., Yamamoto, M., Espinosa, L., et al. (2013). Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of notch signaling. *J. Exp. Med.* *210*, 71–84.

Gurusamy, N., Alsayari, A., Rajasingh, S., and Rajasingh, J. (2018). Chapter One - Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. D.B.B.T.-P. in M.B. and T.S. Teplow, ed. (Academic Press), pp. 1–22.

Guyonneau-Harmand, L., L'Homme, B., Birebent, B., Desterke, C., Chevallier, N., Garçon, L., Lapillonne, H., Benderitter, M., Delhommeau, F., Jaffredo, T., et al. (2017). Transgene-free hematopoietic stem and progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *BioRxiv* 177691.

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*, 199–223.

Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell* *5*, 434–441.

Hadland, B.K., Huppert, S.S., Kanungo, J., Xue, Y., Jiang, R., Gridley, T., Conlon, R.A., Cheng, A.M., Kopan, R., and Longmore, G.D. (2004). A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* *104*, 3097–3105.

Hafiane, A. (2020). SARS-CoV-2 and the cardiovascular system. *Clin. Chim. Acta* *510*, 311–316.

Van Handel, B., Montel-Hagen, A., Sasidharan, R., Nakano, H., Ferrari, R., Boogerd, C.J., Schredelseker, J., Wang, Y., Hunter, S., Org, T., et al. (2012). Scl represses cardiomyogenesis in prospective hemogenic endothelium and endocardium. *Cell* *150*, 590–605.

Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R., Love, J., et al. (2009a). Metastable Pluripotent States in NOD-Mouse-Derived ESCs. *Cell Stem Cell* *4*, 513–524.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009b). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* *462*, 595–601.

Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic

characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9222 LP – 9227.

Hansen, B., Longati, P., Elvevold, K., Nedredal, G.I., Schledzewski, K., Olsen, R., Falkowski, M., Kzhyskowska, J., Carlsson, F., Johansson, S., et al. (2005). Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding. *Exp. Cell Res.* *303*, 160–173.

Hansen, N.U.B., Genovese, F., Leeming, D.J., and Karsdal, M.A. (2015). The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Exp. Mol. Pathol.* *98*, 286–294.

Hantusch, B. (2019). *Morphological and Functional Characteristics of Blood and Lymphatic Vessels.* (Springer, Cham), pp. 1–43.

Harding, A., Cortez-Toledo, E., Magner, N.L., Beegle, J.R., Coleal-Bergum, D.P., Hao, D., Wang, A., Nolta, J.A., and Zhou, P. (2017). Highly Efficient Differentiation of Endothelial Cells from Pluripotent Stem Cells Requires the MAPK and the PI3K Pathways. *Stem Cells* *35*, 909–919.

Haridhasapavalan, K.K., Borgohain, M.P., Dey, C., Saha, B., Narayan, G., Kumar, S., and Thummer, R.P. (2019). An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene* *686*, 146–159.

Hatzfeld, J., Li, M.L., Brown, E.L., Sookdeo, H., Levesque, J.P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S.C., and Hatzfeld, A. (1991). Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. *J. Exp. Med.* *174*, 925–929.

Havekes, L., Mommaas-Kienhuis, A.M., Schouten, D., De Wit, E., Scheffer, M., and Van Hinsbergh, V.W.M. (1985). High-affinity uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by confluent human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* *56*, 81–92.

Hayashi, H., and Kume, T. (2008). Foxc Transcription Factors Directly Regulate Dll4 and Hey2 Expression by Interacting with the VEGF-Notch Signaling Pathways in Endothelial Cells. *PLoS One* *3*, e2401.

Heiss, C., Rodriguez-Mateos, A., and Kelm, M. (2015). Central Role of eNOS in the Maintenance of Endothelial Homeostasis. *Antioxidants Redox Signal.* *22*, 1230–1242.

Henig, I., and Zuckerman, T. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med. J.* *5*, e0028–e0028.

Henthorn, P., Zervos, P., Raducha, M., Harris, H., and Kadesch, T. (1988). Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells: use as a reporter for studies of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 6342–6346.

Herpers, R., Van De Kamp, E., Duckers, H.J., and Schulte-Merker, S. (2008). Redundant roles for sox7 and sox18 in arteriovenous specification in Zebrafish. *Circ. Res.* *102*, 12–15.

Herzog, Y., Guttmann-Raviv, N., and Neufeld, G. (2005). Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev. Dyn.* *232*, 1047–1055.

Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P.J., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A., and Finkel, T. (2003). Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* *348*, 593–600.

Hill, K.L., Obrtlíkova, P., Alvarez, D.F., King, J.A., Keirstead, S.A., Allred, J.R., and Kaufman, D.S. (2010). Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function. *Exp. Hematol.* *38*, 246.

Hills, D., Gribi, R., Ure, J., Buza-Vidas, N., Luc, S., Jacobsen, S.E.W., and Medvinsky, A. (2011). Hoxb4-YFP reporter mouse model: A novel tool for tracking HSC development and studying the role of Hoxb4 in hematopoiesis. *Blood* *117*, 3521–3528.

Hirata, H., Kawamata, S., Murakami, Y., Inoue, K., Nagahashi, A., Tosaka, M., Yoshimura, N., Miyamoto, Y., Iwasaki, H., Asahara, T., et al. (2007). Coexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha and fetal liver kinase 1 enhances cardiogenic potential in embryonic stem cell differentiation in vitro. *J. Biosci. Bioeng.* *103*, 412–419.

Hlushchuk, R., Ehrbar, M., Reichmuth, P., Heinemann, N., Styp-Rekowska, B., Escher, R., Baum, O., Lienemann, P., Makanya, A., Keshet, E., et al. (2011). Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 2836–2844.

Hlushchuk, R., Styp-Rekowska, B., Dzambazi, J., Wnuk, M., Huynh-Do, U., Makanya, A., and Djonov, V. (2017). Endoglin inhibition leads to intussusceptive angiogenesis via activation of factors related to COUP-TFII signaling pathway. *PLoS One* *12*, e0182813.

Hobson, B., and Denekamp, J. (1984). Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: Continuous labelling studies. *Br. J. Cancer* *49*, 405–413.

Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* *431*, 1002–1007.

Hoffman, R., Benz, E.J., Silberstein, L.E., Heslop, H.E., Anastasi, J., Salama, M.E., and Abutalib, S.A. (2017). *Hematology - Basic Principles and Practice* (Elsevier).

Holmes, D.I.R., and Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* *6*, 209.

Homan, K.A., Gupta, N., Kroll, K.T., Kolesky, D.B., Skylar-Scott, M., Miyoshi, T., Mau, D., Valerius, M.T., Ferrante, T., Bonventre, J. V., et al. (2019a). Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* *16*, 255–262.

Homan, K.A., Gupta, N., Kroll, K.T., Kolesky, D.B., Skylar-Scott, M., Miyoshi, T., Mau, D., Valerius, M.T., Ferrante, T., Bonventre, J. V., et al. (2019b). Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* *16*, 255–262.

Horii, T., Tamura, D., Morita, S., Kimura, M., and Hatada, I. (2013). Generation of an ICF syndrome model by efficient genome editing of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR system. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 19774–19781.

Hou, L., Kim, J.J., Wanjare, M., Patlolla, B., Coller, J., Natsu, V., Hastie, T.J., and Huang, N.F. (2017). Combinatorial Extracellular Matrix Microenvironments for Probing Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Sci. Rep.* *7*, 1–12.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* (80-.). *341*, 651 LP – 654.

Hsu, T., Nguyen-Tran, H.H., and Trojanowska, M. (2019). Active roles of dysfunctional vascular endothelium in fibrosis and cancer. *J. Biomed. Sci.* *26*, 1–12.

Hu, R.M., Levin, E.R., Pedram, A., and Frank, H.J.L. (1993). Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. *Diabetes* *42*, 351–358.

Huang, A.J., Manning, J.E., Bandak, T.M., Rataou, M.C., Hanser, K.R., and Silverstein, S.C. (1993). Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J. Cell Biol.* *120*, 1371–1380.

Huang, C.Y., Liu, C.L., Ting, C.Y., Chiu, Y.T., Cheng, Y.C., Nicholson, M.W., and Hsieh, P.C.H. (2019). Human iPSC banking: Barriers and opportunities. *J. Biomed. Sci.* *26*, 1–14.

Huang, N.F., Dewi, R.E., Okogbaa, J., Lee, J.C., Jalilrufaihah, A., Heilshorn, S.C., and Cooke, J.P.

(2013). Chemotaxis of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Am. J. Transl. Res.* 5, 510–520.

Huang, X., Wang, Y., Yan, W., Smith, C., Ye, Z., Wang, J., Gao, Y., Mendelsohn, L., and Cheng, L. (2015). Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient ipscs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells* 33, 1470–1479.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26, 1269–1275.

Huber, T.L., Zhou, Y., Mead, P.E., and Zon, L.I. (1998). Cooperative Effects of Growth Factors Involved in the Induction of Hematopoietic Mesoderm. *Blood* 92, 4128–4137.

Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., and Palis, J. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *432*, 625–630.

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, 4474–4485.

Iacovino, M., Chong, D., Szatmari, I., Hartweck, L., Rux, D., Caprioli, A., Cleaver, O., and Kyba, M. (2011). HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat. Cell Biol.* 13, 72–78.

Iba, T., Naito, H., Shimizu, S., Rahmawati, F.N., Wakabayashi, T., and Takakura, N. (2019). Isolation of tissue-resident endothelial stem cells and their use in regenerative medicine. *Inflamm. Regen.* 39.

Iizuka, H., Kagoya, Y., Kataoka, K., Yoshimi, A., Miyauchi, M., Taoka, K., Kumano, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Arai, S., et al. (2015). Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis. *Exp. Hematol.* 43, 849–857.

Ikehara, S. (2003). A New Concept of Stem Cell Disorders and Their New Therapy. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12, 643–653.

Imanirad, P., Solaimani Kartalaei, P., Crisan, M., Vink, C., Yamada-Inagawa, T., de Pater, E., Kurek, D., Kaimakis, P., van der Linden, R., Speck, N., et al. (2014). HIF1 α is a regulator of hematopoietic progenitor and stem cell development in hypoxic sites of the mouse embryo. *Stem Cell Res.* 12, 24–35.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., and Yoder, M.C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752 LP – 2760.

Irwin, E.F., Gupta, R., Dashti, D.C., and Healy, K.E. (2011). Engineered polymer-media interfaces for the long-term self-renewal of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 32, 6912–6919.

Ismailoglu, I., Yeaman, G., Daley, G.Q., Perlingeiro, R.C.R., and Kyba, M. (2008). Mesodermal patterning activity of SCL. *Exp. Hematol.* 36, 1593–1603.

Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216–220.

Jackson, M., Ma, R., Taylor, A.H., Axton, R.A., Easterbrook, J., Kydonaki, M., Olivier, E., Marenah, L., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., et al. (2016). Enforced Expression of HOXB4 in Human Embryonic Stem Cells Enhances the Production of Hematopoietic Progenitors but Has No Effect on the Maturation of Red Blood Cells. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 981–990.

Jacobsen, S.E., Okkenhaug, C., Myklebust, J., Veiby, O.P., and Lyman, S.D. (1995). The FLT3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J. Exp. Med.* *181*, 1357–1363.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., and Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* *52*, 2745–2756.

Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* *125*, 4575 LP – 4583.

Jaffredo, T., Gautier, R., Brajeul, V., and Dieterlen-Lièvre, F. (2000). Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev. Biol.* *224*, 204–214.

Jaffredo, T., Lempereur, A., Richard, C., Bollerot, K., Gautier, R., Canto, P.-Y., Drevon, C., Souyri, M., and Durand, C. (2013). Dorso-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. *Blood Cells, Mol. Dis.* *51*, 232–238.

Jahan, B., and McCloskey, K.E. (2020). Differentiation and expansion of endothelial cells requires pre-optimization of KDR+ expression kinetics. *Stem Cell Res.* *42*, 101685.

James, D., Nam, H., Seandel, M., Nolan, D., Janovitz, T., Tomishima, M., Studer, L., Lee, G., Lyden, D., Benezra, R., et al. (2010). Expansion and maintenance of human embryonic stem cell – derived endothelial cells by TGF β inhibition is Id1 dependent. *Online* *28*, 1–7.

Jamieson, J.J., Searson, P.C., and Gerecht, S. (2017). Engineering the human blood-brain barrier in vitro. *J. Biol. Eng.* *11*.

Jang, I.H., Lu, Y.F., Zhao, L., Wenzel, P.L., Kume, T., Datta, S.M., Arora, N., Guiu, J., Lagha, M., Kim, P.G., et al. (2015). Notch1 acts via Foxc2 to promote definitive hematopoiesis via effects on hemogenic endothelium. *Blood* *125*, 1418–1426.

Jang, S., Collin de l’Hortet, A., and Soto-Gutierrez, A. (2019). Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Endothelial Cells: Overview, Current Advances, Applications, and Future Directions. *Am. J. Pathol.* *189*, 502–512.

Jarajapu, Y.P.R., Hazra, S., Segal, M., LiCalzi, S., Jhadoo, C., Qian, K., Mitter, S.K., Raizada, M.K., Boulton, M.E., and Grant, M.B. (2014). Vasoreparative Dysfunction of CD34+ Cells in Diabetic Individuals Involves Hypoxic Desensitization and Impaired Autocrine/Paracrine Mechanisms. *PLoS One* *9*, e93965.

Ji, R.P., Phoon, C.K.L., Aristizábal, 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*, 133–135.

Johansson, A.G., Lövdal, T., Magnusson, K., Berg, T., and Skogh, T. (1996). Liver cell uptake and degradation of soluble immunoglobulin G immune complexes in vivo and in vitro in rats. *Hepatology* *24*, 169–175.

Jokubaitis, V.J., Sinka, L., Driessen, R., Whitty, G., Haylock, D.N., Bertoncello, I., Smith, I., Péault, B., Tavian, M., and Simmons, P.J. (2008). Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood* *111*, 4055–4063.

Jouault, H., and Beaujean, F. (1998). Cellules souches périphériques : Une nouvelle approche des greffes de moelle osseuse. *Rev. Fr. Des Lab.* *1998*, 49–53.

Julien, E., El Omar, R., and Tavian, M. (2016). Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett.* *590*, 3987–4001.

- Kabat, M., Bobkov, I., Kumar, S., and Grumet, M. (2020). Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl. Med.* *9*, 17–27.
- Kadota, S., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2017). In Vivo Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Neonatal and Adult Rat Hearts. *Stem Cell Reports* *8*, 278–289.
- Kajiwara, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto, S., et al. (2012). Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 12538–12543.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W.M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J.M., and Asahara, T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3422–3427.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., et al. (2004). Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. *Cell* *119*, 1001–1012.
- Kanda, K., Hayman, G.T., Silverman, M.D., and Lelkes, P.I. (1998). Comparison of ICAM-1 and VCAM-1 expression in various human endothelial cell types and smooth muscle cells. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* *6*, 33–44.
- Kang, H.J., Mesquitta, W.T., Jung, H.S., Moskvina, O. V., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2018). GATA2 Is Dispensable for Specification of Hemogenic Endothelium but Promotes Endothelial-to-Hematopoietic Transition. *Stem Cell Reports* *11*, 197–211.
- Kang, K.T., Coggins, M., Xiao, C., Rosenzweig, A., and Bischoff, J. (2013). Human vasculogenic cells form functional blood vessels and mitigate adverse remodeling after ischemia reperfusion injury in rats. *Angiogenesis* *16*, 773–784.
- Kappel, A., Schlaeger, T.M., Flamme, I., Orkin, S.H., Risau, W., and Breier, G. (2000). Role of SCL/Tal-1, GATA, and Ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* *96*, 3078–3085.
- Karabagli, H., Karabagli, P., Ladher, R.K., and Schoenwolf, G.C. (2002). Comparison of the expression patterns of several fibroblast growth factors during chick gastrulation and neurulation. *Anat. Embryol. (Berl.)* *205*, 365–370.
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J.K., Todani, M., Nakagawa, M., et al. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiol. Rev.* *99*, 79–114.
- Karakatsani, A., Shah, B., and Almodovar, C.R. De (2019). Blood Vessels as Regulators of Neural Stem Cell Properties. *12*, 1–11.
- Kataoka, H., Hayashi, M., Nakagawa, R., Tanaka, Y., Izumi, N., Nishikawa, S., Jakt, M.L., Tarui, H., and Nishikawa, S.I. (2011). Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1 +PDGFR α + primitive mesoderm. *Blood* *118*, 6975–6986.
- Keighron, C., Lyons, C.J., Creane, M., O'Brien, T., and Liew, A. (2018). Recent advances in endothelial progenitor cells toward their use in clinical translation. *Front. Med.* *5*, 354.
- Kelly, S.J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* *200*, 365–376.
- Kelly, O.G., Pinson, K.I., and Skarnes, W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* *131*, 2803 LP – 2815.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A

common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488.

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, 2679–2687.

Kennedy, M., Awong, G., Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Lamotte-mohs, R., and Zu, J.C. (2012). T Lymphocyte Potential Marks the Emergence of Definitive Hematopoietic Progenitors in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures. 1–14.

Kerr, J.B. (2010). *Functional histology* (Chatswood, Australia: Elsevier Australia).

Kholodenko, I. V., Kurbatov, L.K., Kholodenko, R. V., Manukyan, G. V., and Yarygin, K.N. (2019). Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? *Cells* 8.

Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., 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, 1109–1121.

Kilpinen, H., Goncalves, A., Leha, A., Afzal, V., Alasoo, K., Ashford, S., Bala, S., Bensaddek, D., Casale, F.P., Culley, O.J., et al. (2017). Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* 546, 370–375.

Kim, A.G., Vrecenak, J.D., Boelig, M.M., Eissenberg, L., Rettig, M.P., Riley, J.S., Holt, M.S., Conner, M.A., Loukogeorgakis, S.P., Li, H., et al. (2016a). Enhanced in utero allogeneic engraftment in mice after mobilizing fetal HSCs by $\alpha 4\beta 1/7$ inhibition. *Blood* 128, 2457–2461.

Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.

Kim, I., Yilmaz, Ö.H., and Morrison, S.J. (2005). CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 903–905.

Kim, I., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2007). Sox17 Dependence Distinguishes the Transcriptional Regulation of Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 130, 470–483.

Kim, J., Hoffman, J.P., Alpaugh, R.K., Rhim, A.D., Reichert, M., Stanger, B.Z., Furth, E.E., Sepulveda, A.R., Yuan, C.-X., Won, K.-J., et al. (2013). An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Rep.* 3, 2088–2099.

Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–653.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.

Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Hongguang, H., Loh, Y.-H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.

Kim, M.J., Cooper, D.D., Hayes, S.F., and Spangrude, G.J. (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood* 91, 4106–4117.

Kim, S.W., Jin, H.L., Kang, S.M., Kim, S., Yoo, K.J., Jang, Y., Kim, H.O., and Yoon, Y.S. (2016b). Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. *Int. J. Cardiol.* 203, 498–507.

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,

1195–1200.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Quinlan, G.A., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Tam, P.P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* *126*, 4691 LP – 4701.

Kingsley, P.D., Malik, J., Fantauzzo, K.A., and Palis, J. (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* *104*, 19–25.

Kingsley, P.D., Malik, J., Emerson, R.L., Bushnell, T.P., McGrath, K.E., Bloedorn, L.A., Bulger, M., and Palis, J. (2006). “Maturational” globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood* *107*, 1665–1672.

Kitamura, N., Yamaguchi, M., Shimabukuro, K., Miyasaka, M., Nakano, H., and Kumada, K. (1996). Heparin-Like Glycosaminoglycans Inhibit Leukocyte Adhesion to Endotoxin-Activated Human Vascular Endothelial Cells under Nonstatic Conditions. *Eur. Surg. Res.* *28*, 428–435.

Klim, J.R., Li, L., Wrighton, P.J., Piekarczyk, M.S., and Kiessling, L.L. (2010). A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nat. Methods* *7*, 989–994.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.D., and Lanza, R. (2005). Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* *365*, 1636–1641.

Knook, D.L., Blansjaar, N., and Sleyster, E.C. (1977). Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. *Exp. Cell Res.* *109*, 317–329.

Kobari, L., Yates, F., Oudrhiri, N., Francina, A., Kiger, L., Mazurier, C., Rouzbeh, S., El-Nemer, W., Hebert, N., Giarratana, M.C., et al. (2012). Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: In vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica* *97*, 1795–1803.

Kono, T., Kubo, H., Shimazu, C., Ueda, Y., Takahashi, M., Yanagi, K., Fujita, N., Tsuruo, T., Wada, H., and Yamashita, J.K. (2006). Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 2070–2076.

Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H.N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P.J., and Reijo-Pera, R.A. (2009). Isolation and Characterization of Pluripotent Human Spermatogonial Stem Cell-Derived Cells. *Stem Cells* *27*, 138–149.

Koui, Y., Kido, T., Ito, T., Oyama, H., Chen, S.W., Katou, Y., Shirahige, K., and Miyajima, A. (2017). An In Vitro Human Liver Model by iPSC-Derived Parenchymal and Non-parenchymal Cells. *Stem Cell Reports* *9*, 490–498.

Kovach, N.L., Lin, N., Yednock, T., Harlan, J.M., and Broudy, V.C. (1995). Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood* *85*, 159–167.

Kowalski, M.P., Yoder, A., Liu, L., and Pajak, L. (2012). Controlling embryonic stem cell growth and differentiation by automation: Enhanced and more reliable differentiation for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* *17*, 1171–1179.

Koyano-Nakagawa, N., Kweon, J., Iacovino, M., Shi, X., Rasmussen, T.L., Borges, L., Zirbes, K.M., Li, T., Perlingeiro, R.C.R., Kyba, M., et al. (2012). *Etv2* is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates *Lmo2* gene expression. *Stem Cells* *30*, 1611–1623.

Krebs, L.T., Shutter, J.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K.L., and Gridley, T. (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev.* *18*, 2469–2473.

Kropp, C., Massai, D., and Zweigerdt, R. (2016a). Progress and Challenges in Large-Scale

Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. *Process Biochem.*

Kropp, C., Massai, D., and Zweigerdt, R. (2016b). Progress and Challenges in Large-Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. *Process Biochem.*

Kropp, C., Kempf, H., Halloin, C., Robles-Diaz, D., Franke, A., Scheper, T., Kinast, K., Knorpp, T., Joos, T.O., Haverich, A., et al. (2016c). Impact of Feeding Strategies on the Scalable Expansion of Human Pluripotent Stem Cells in Single-Use Stirred Tank Bioreactors. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 1289–1301.

Kubota, H., Yao, H., and Reid, L.M. (2007). Identification and Characterization of Vitamin A-Storing Cells in Fetal Liver: Implications for Functional Importance of Hepatic Stellate Cells in Liver Development and Hematopoiesis. *Stem Cells* 25, 2339–2349.

Kumar, A., Tripathi, A., and Jain, S. (2011). Extracorporeal bioartificial liver for treating acute liver diseases. *J. Extra. Corpor. Technol.* 43, 195–206.

Kumar, P., Kumar, S., Udupa, E.P., Kumar, U., Rao, P., and Honnegowda, T. (2015). Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plast. Aesthetic Res.* 2, 243.

Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129, 4891 LP – 4899.

Kusuma, S., Peijnenburg, E., Patel, P., and Gerecht, S. (2014). Low oxygen tension enhances endothelial fate of human pluripotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 913–920.

Kusuma, S., Facklam, A., and Gerecht, S. (2015). Characterizing Human Pluripotent-Stem-Cell-Derived Vascular Cells for Tissue Engineering Applications. *Stem Cells Dev.* 24, 451–458.

Kutikhin, A.G., Tupikin, A.E., Matveeva, V.G., Shishkova, D.K., Antonova, L. V., Kabilov, M.R., and Velikanova, E.A. (2020). Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells* 9, 876.

Kuttler, F., and Mai, S. (2006). c-Myc, Genomic Instability and Disease. In *Genome Dynamics*, pp. 171–190.

Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., and Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109, 29–37.

Laakso, T., and Smedsrød, B. (1987). Cellular distribution in rat liver of intravenously administered polyacryl starch and chondroitin sulfate microparticles. *Int. J. Pharm.* 36, 253–262.

Labastie, M.C., Cortés, F., Roméo, P.H., Dulac, C., and Péault, B. (1998). Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* 92, 3624–3635.

Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 49, 19–24.

Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2009). SCL regulates the Quiescence and the Long-Term Competence of Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 114, 2520–2520.

Lacorazza, H.D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S.D. (2006). The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* 9, 175–187.

Lacroix-Desmazes, S. (2013). Hémophilie, une maladie hémorragique héréditaire.

Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels. *Science* (80-.). 294, 564 LP – 567.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-.). 345, 1247125.

Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.

Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009a). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892–895.

Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009b). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892–895.

Lange, C., Turrero Garcia, M., Decimo, I., Bifari, F., Eelen, G., Quaegebeur, A., Boon, R., Zhao, H., Boeckx, B., Chang, J., et al. (2016). Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J.* 35, 924–941.

Lanner, F., Sohl, M., and Farnebo, F. (2007). Functional arterial and venous fate is determined by graded VEGF signaling and notch status during embryonic stem cell differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 487–493.

Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 25, 2248–2253.

Lapillonne, H., Kobari, L., Christelle, M., Tropel, P., Giarratana, marie-catherine, Zanella-Cléon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hebert, N., et al. (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: Perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95, 1651–1659.

Larbi, A., Gombert, J.-M., Auvray, C., l’Homme, B., Magniez, A., Féraud, O., Coulombel, L., Chapel, A., Mitjavila-Garcia, M.T., Turhan, A.G., et al. (2012). The HOXB4 Homeoprotein Promotes the Ex Vivo Enrichment of Functional Human Embryonic Stem Cell-Derived NK Cells. *PLoS One* 7, e39514.

Lawson, N.D., Vogel, A.M., and Weinstein, B.M. (2002). Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev. Cell* 3, 127–136.

Leach, L., Eaton, B.M., Westcott, E.D.A., and Firth, J.A. (1995). Effect of histamine on endothelial permeability and structure and adhesion molecules of the paracellular junctions of perfused human placental microvessels. *Microvasc. Res.* 50, 323–337.

Ledran, M.H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renström, J., Lang, R., Yung, S., Santibanez-Coref, M., Dzierzak, E., Stojkovic, M., et al. (2008). Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 3, 85–98.

Lee, D., Park, C., Lee, H., Lugus, J.J., Kim, S.H., Arentson, E., Chung, Y.S., Gomez, G., Kyba, M., Lin, S., et al. (2008). ER71 Acts Downstream of BMP, Notch, and Wnt Signaling in Blood and Vessel Progenitor Specification. *Cell Stem Cell* 2, 497–507.

Lee, D., Kim, D.W., and Cho, J.-Y. (2020). Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol. Toxicol.* 36, 131–144.

Lee, S., Kang, J., Yoo, J., Ganesan, S.K., Cook, S.C., Aguilar, B., Ramu, S., Lee, J., and Hong, Y.K.

(2009). Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood* 113, 1856–1859.

Lee, S.J., Park, C., Lee, J.Y., Kim, S., Kwon, P.J., Kim, W., Jeon, Y.H., Lee, E., and Yoon, Y.S. (2015). Generation of pure lymphatic endothelial cells from human pluripotent stem cells and their therapeutic effects on wound repair. *Sci. Rep.* 5, 1–13.

Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., Mansfield, W., Nashun, B., Knezovich, J.G., Smith, A., et al. (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 311–316.

Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002a). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4391–4396.

Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002b). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4391–4396.

Levin, E.G., Marzec, U., Anderson, J., and Harker, L.A. (1984). Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 74, 1988–1995.

Li, Z., and Maitz, P. (2018). Cell therapy for severe burn wound healing. *Burn. Trauma* 6, 13.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., et al. (2010). A Mesenchymal-to-Epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51–63.

Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Schöler, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* 27, 2992–3000.

Li, Y., Sun, X., Liu, H., Huang, L., Meng, G., Ding, Y., Su, W., Lu, J., Gong, S., Terstappen, G.C., et al. (2019). Development of Human in vitro Brain-blood Barrier Model from Induced Pluripotent Stem Cell-derived Endothelial Cells to Predict the in vivo Permeability of Drugs. *Neurosci. Bull.* 35, 996–1010.

Li, Z., Hu, S., Ghosh, Z., Han, Z., and Wu, J.C. (2011). Functional characterization and expression profiling of human induced pluripotent stem cell- and embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells Dev.* 20, 1701–1710.

Li, Z., Lan, Y., He, W., Chen, D., Wang, J., Zhou, F., Wang, Y., Sun, H., Chen, X., Xu, C., et al. (2012). Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell* 11, 663–675.

Lian, X., Bao, X., Al-Ahmad, A., Liu, J., Wu, Y., Dong, W., Dunn, K.K., Shusta, E. V., and Palecek, S.P. (2014). Efficient Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Endothelial Progenitors via Small-Molecule Activation of WNT Signaling. *Stem Cell Reports* 3, 804–816.

Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., et al. (2015). Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 47, 469–478.

Lie-A-Ling, M., Marinopoulou, E., Li, Y., Patel, R., Stefanska, M., Bonifer, C., Miller, C., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2014). RUNX1 positively regulates a cell adhesion and migration program in murine hemogenic endothelium prior to blood emergence. *Blood* 124, 11–20.

Lin, H., Lei, J., Wininger, D., Nguyen, M.-T., Khanna, R., Hartmann, C., Yan, W.-L., and Huang, S.C. (2003). Multilineage Potential of Homozygous Stem Cells Derived from Metaphase II Oocytes. *Stem Cells* 21, 152–161.

Lindahl, P., Boström, H., Karlsson, L., Hellström, M., Kalén, M., and Betsholtz, C. (1999). Role of

platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr. Top. Pathol.* **93**, 27–33.

Lindskog, H., Kim, Y.H., Jelin, E.B., Kong, Y., Guevara-Gallardo, S., Kim, T.N., and Wang, R.A. (2014). Molecular identification of venous progenitors in the dorsal aorta reveals an aortic origin for the cardinal vein in mammals. *Dev.* **141**, 1120–1128.

Lindsley, R.C., Gill, J.G., Kyba, M., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* **133**, 3787 LP – 3796.

Linville, R.M., DeStefano, J.G., Sklar, M.B., Xu, Z., Farrell, A.M., Bogorad, M.I., Chu, C., Walczak, P., Cheng, L., Mahairaki, V., et al. (2019). Human iPSC-derived blood-brain barrier microvessels: validation of barrier function and endothelial cell behavior. *Biomaterials* **190–191**, 24–37.

Lippmann, E.S., Azarin, S.M., Kay, J.E., Nessler, R.A., Wilson, H.K., Al-Ahmad, A., Palecek, S.P., and Shusta, E. V. (2012). Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **30**, 783–791.

Lippmann, E.S., Al-Ahmad, A., Azarin, S.M., Palecek, S.P., and Shusta, E. V. (2014). A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci. Rep.* **4**, 1–10.

Liu, Y.P., and Hematti, P. (2009). Generation of mesenchymal stromal cells from HOXB4-expressing human embryonic stem cells. *Cytotherapy* **11**, 716–725.

Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., and Wu, J.C. (2018). Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development* **145**, dev156166.

Liu, F., Kang, I., Park, C., Chang, L.W., Wang, W., Lee, D., Lim, D.S., Vittet, D., Nerbonne, J.M., and Choi, K. (2012). ER71 specifies Flk-1+ hemangiogenic mesoderm by inhibiting cardiac mesoderm and Wnt signaling. *Blood* **119**, 3295–3305.

Liu, H., Ye, Z., Kim, Y., Sharkis, S., and Jang, Y.-Y. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* **51**, 1810–1819.

Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* **4**, 37–48.

Liu, Y., Yang, Y., Kang, X., Lin, B., Yu, Q., Song, B., Gao, G., Chen, Y., Sun, X., Li, X., et al. (2017). One-Step Biallelic and Scarless Correction of a β -Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **6**, 57–67.

Lizama, C.O., Hawkins, J.S., Schmitt, C.E., Bos, F.L., Zape, J.P., Cautivo, K.M., Borges Pinto, H., Rhyner, A.M., Yu, H., Donohoe, M.E., et al. (2015). Repression of arterial genes in hemogenic endothelium is sufficient for haematopoietic fate acquisition. *Nat. Commun.* **6**, 1–10.

Lobato, N.S., Filgueira, F.P., Akamine, E.H., Tostes, R.C., Carvalho, M.H.C., and Fortes, Z.B. (2012). Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **45**, 392–400.

Logan, S., Arzua, T., Canfield, S.G., Seminary, E.R., Sison, S.L., Ebert, A.D., and Bai, X. (2019). Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models. *Compr. Physiol.* **565–611**.

Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* **113**, 5476–5479.

Łos, M.J., Skubis, A., and Ghavami, S. (2019). Chapter 2 - Stem Cells. M.J. Łos, A. Hudecki, and

E.B.T.-S.C. and B. for R.M. Wiecheć, eds. (Academic Press), pp. 5–16.

De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., et al. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature* 525, 469–478.

Louissaint Jr., A., Rao, S., Leventhal, C., and Goldman, S.A. (2002). Coordinated Interaction of Neurogenesis and Angiogenesis in the Adult Songbird Brain. *Neuron* 34, 945–960.

Lovdal, T., and Berg, T. (2001). Transcription of Fcγ receptors in different rat liver cells. *Cell Biol. Int.* 25, 821–824.

Lu, S.-J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M. a S., Grant, M.B., and Lanza, R. (2007). Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 4, 501–509.

Lu, S.J., Feng, Q., Park, J.S., Vida, L., Lee, B.S., Strausbauch, M., Wettstein, P.J., Honig, G.R., and Lanza, R. (2008). Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 112, 4475–4484.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24, 185–187.

Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., and Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int.* 2019, 9628536.

Luksha, L., Agewall, S., and Kublickiene, K. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 202, 330–344.

Luo, H.Y., Liang, X.L., Frye, C., Wonio, M., Hankins, G.D.V., Chui, D.H.K., and Alter, B.P. (1999). Embryonic hemoglobins are expressed in definitive cells. *Blood* 94, 359–361.

Luscinskas, F.W., and Lawler, J. (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J.* 8, 929–938.

Ma, F., Ebihara, Y., Umeda, K., Sakai, H., Hanada, S., Zhang, H., Zaïke, Y., Tsuchida, E., Nakahata, T., Nakauchi, H., et al. (2008). Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13087–13092.

Macaskill, M.G., Saif, J., Condie, A., Jansen, M.A., Macgillivray, T.J., Tavares, A.A.S., Fleisinger, L., Spencer, H.L., Besnier, M., Martin, E., et al. (2018). Robust Revascularization in Models of Limb Ischemia Using a Clinically Translatable Human Stem Cell-Derived Endothelial Cell Product.

Mackarechtschian, K., Hardin, J.D., Moore, K.A., Boast, S., Goff, S.P., and Lemischka, I.R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3, 147–161.

MacLean, G.A., Menne, T.F., Guo, G., Sanchez, D.J., Park, I.-H., Daley, G.Q., and Orkin, S.H. (2012). Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic human pluripotent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17567 LP – 17572.

Maeda, T., Nagano, S., Ichise, H., Kataoka, K., Yamada, D., Ogawa, S., Koseki, H., Kitawaki, T., Kadowaki, N., Takaori-Kondo, A., et al. (2016). Regeneration of CD8αβ T cells from T-cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. *Cancer Res.* 76, 6839–6850.

Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474, 225–229.

Magnusson, S., and Berg, T. (1993). Endocytosis of ricin by rat liver cells in vivo and in vitro is

mainly mediated by mannose receptors on sinusoidal endothelial cells. *Biochem. J.* 291, 749–755.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340–345.

Mahony, C.B., and Bertrand, J.Y. (2019). How HSCs colonize and expand in the fetal niche of the vertebrate embryo: An evolutionary perspective. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 34.

Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M.R., Ejtemaei, M., and Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int. J. Stem Cells* 7, 118–126.

Mali, P., Ye, Z., Hommond, H.H., Yu, X., Lin, J., Chen, G., Zou, J., and Cheng, L. (2008). Improved Efficiency and Pace of Generating Induced Pluripotent Stem Cells from Human Adult and Fetal Fibroblasts. *Stem Cells* 26, 1998–2005.

Malik, N., and Rao, M.S. (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol.* 997, 23–33.

Malovic, I., Sørensen, K.K., Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Paulsen, S., Erofeev, A. V., Smedsrød, B.H., and McCourt, P.A.G. (2007). The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology* 45, 1454–1461.

Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G.N., and Semenza, G.L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiramami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.

Mansour, A.A., Gonçalves, J.T., Bloyd, C.W., Li, H., Fernandes, S., Johnston, S., Parylak, S.L., Jin, X., and Gage, F.H. (2018a). Articles An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. 36.

Mansour, A.A.F., Gonçalves, J.T., Bloyd, C.W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S.L., Jin, X., and Gage, F.H. (2018b). Erratum: An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* 36, 772.

Marcelo, K.L., Sills, T.M., Coskun, S., Vasavada, H., Sanglikar, S., Goldie, L.C., and Hirschi, K.K. (2013). Hemogenic endothelial cell specification requires c-Kit, notch signaling, and p27-mediated cell-cycle control. *Dev. Cell* 27, 504–515.

Marcu, R., Choi, Y.J., Xue, J., Fortin, C.L., Wang, Y., Nagao, R.J., Xu, J., MacDonald, J.W., Bammler, T.K., Murry, C.E., et al. (2018). Human Organ-Specific Endothelial Cell Heterogeneity. *IScience* 4, 20–35.

Marom, K., Levy, V., Pillemer, G., and Fainsod, A. (2005). Temporal analysis of the early BMP functions identifies distinct anti-organizer and mesoderm patterning phases. *Dev. Biol.* 282, 442–454.

Marsden, P.A., and Brenner, B.M. (1992). Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF- α . In *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, (Am J Physiol), p.

Martel, J., Ko, Y.F., Young, J.D., and Ojcius, D.M. (2020). Could nasal nitric oxide help to mitigate the severity of COVID-19? *Microbes Infect.*

- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., and Belmonte, J.C.I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *8*, 223–253.
- de Martin, R. (2019). *Endothelial Cells: Function and Dysfunction*. (Springer, Cham), pp. 81–96.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L.M. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* *70*, 841–847.
- Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *9*, 262–271.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* (80-). *294*, 559–563.
- Matz, R.L., and Andriantsitohaina, R. (2003). Age-related endothelial dysfunction: Potential implications for pharmacotherapy. *Drugs and Aging* *20*, 527–550.
- Mayer, F.J., and Binder, C.J. (2019). *Atherosclerosis*. (Springer, Cham), pp. 195–233.
- McCourt, P.A.G., Smedsrød, B.H., Melkko, J., and Johansson, S. (1999). Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. *Hepatology* *30*, 1276–1286.
- 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*, 2409–2417.
- McGrath, K.E., Frame, J.M., Fegan, K.H., Bowen, J.R., Conway, S.J., Catherman, S.C., Kingsley, P.D., Koniski, A.D., and Palis, J. (2015). Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. *Cell Rep.* *11*, 1892–1904.
- McKee, C., and Chaudhry, G.R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *159*, 62–77.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489–3497.
- McKenzie, J.L., Takenaka, K., Gan, O.I., Doedens, M., and Dick, J.E. (2007). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood* *109*, 543–545.
- Medina, R.J., Barber, C.L., Sabatier, F., Dignat-George, F., Melero-Martin, J.M., Khosrotehrani, K., Ohneda, O., Randi, A.M., Chan, J.K.Y., Yamaguchi, T., et al. (2017). Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* *6*, 1316–1320.
- Medvedev, S.P., Grigor’eva, E. V, Shevchenko, A.I., Malakhova, A.A., Demytyeva, E. V, Shilov, A.A., Pokushalov, E.A., Zaidman, A.M., Aleksandrova, M.A., Plotnikov, E.Y., et al. (2010). Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal Neural Stem Cells Successfully Undergo Directed Differentiation into Cartilage. *Stem Cells Dev.* *20*, 1099–1112.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* *86*, 897–906.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Meier, F., Freyer, N., Brzeczczynska, J., Knöspel, F., Armstrong, L., Lako, M., Greuel, S., Damm, G., Ludwig-Schwelling, E., Deschl, U., et al. (2017). Hepatic differentiation of human iPSCs in different 3D models: A comparative study. *Int. J. Mol. Med.* *40*, 1759–1771.

Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* *36*, 2011–2017.

Menger, M.D., Laschke, M.W., and Vollmar, B. (2002). Viewing the microcirculation through the window: Some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur. Surg. Res.* *34*, 83–91.

Mentzer, S.J., and Konerding, M.A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: Expansion and remodeling of microvascular networks. In *Angiogenesis*, (Kluwer Academic Publishers), pp. 499–509.

Mesquitta, W.T., Wandsnider, M., Kang, H.J., Thomson, J., Moskvin, O., Suknuntha, K., and Slukvin, I.I. (2019). UM171 expands distinct types of myeloid and NK progenitors from human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* *9*, 1–13.

Messina, A., Morelli, S., Forgacs, G., Barbieri, G., Drioli, E., and De Bartolo, L. (2017). Self-assembly of tissue spheroids on polymeric membranes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 2090–2103.

Messmer, T., von Meyenn, F., Savino, A., Santos, F., Mohammed, H., Lun, A.T.L., Marioni, J.C., and Reik, W. (2019). Transcriptional Heterogeneity in Naive and Primed Human Pluripotent Stem Cells at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* *26*, 815-824.e4.

Meyrick, B., Berry, L.C., and Christman, B.W. (1995). Response of cultured human pulmonary artery endothelial cells to endotoxin. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *268*.

Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mule, K., and Luo, J. (2003). HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr.* *11*, 55–75.

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* *196*, 430–443.

Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzarot, D., Testa, U., Marinucci, M., and Peschle, C. Human Embryonic Hemopoiesis Kinetics of Progenitors and Precursors Underlying the Yolk Sac+ Liver Transition.

Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* *454*, 49–55.

Min, I.M., Pietramaggiore, G., Kim, F.S., Passegué, E., Stevenson, K.E., and Wagers, A.J. (2008). The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *2*, 380–391.

Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* *93*, 4196–4207.

Minegishi, N., Suzuki, N., Yokomizo, T., Pan, X., Fujimoto, T., Takahashi, S., Hara, T., Miyajima, A., Nishikawa, S. ichi, and Yamamoto, M. (2003). Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* *102*, 896–905.

Ministère de solidarités et de la santé (2019a). La recherche sur embryon et cellules souches embryonnaires.

Ministère de solidarités et de la santé (2019b). La recherche sur embryon et cellules souches embryonnaires.

Mitchell, J.A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L., and Harrington, L.S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.* *93*, 141–147.

- 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*, 2003 LP – 2013.
- Mitrani, E., Ziv, T., Thomsen, G., Shimoni, Y., Melton, D.A., and Bril, A. (1990). Activin can induce the formation of axial structures and is expressed in the hypoblast of the chick. *Cell* *63*, 495–501.
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., et al. (2007). Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell* *1*, 101–112.
- Miyoshi, H., Ohira, M., Shimizu, K., Mitani, K., Hirai, H., Imai, T., Yokoyama, K., Soceda, E., and Ohki, M. (1995). Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res.* *23*, 2762–2769.
- Mohtashami, M., Shah, D.K., Nakase, H., Kianizad, K., Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2010). Direct Comparison of Dll1- and Dll4-Mediated Notch Activation Levels Shows Differential Lymphomyeloid Lineage Commitment Outcomes. *J. Immunol.* *185*, 867 LP – 876.
- Monahan-Earley, R., Dvorak, A.M., and Aird, W.C. (2013). Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 46–66.
- Monserrat Sanz, J., García Torrijos, C., Díaz Martín, D., and Prieto Martín, A. (2013). Linfocitos natural killer. *Med.* *11*, 1728–1736.
- Montel-Hagen, A., and Crooks, G.M. (2019). From pluripotent stem cells to T cells. *Exp. Hematol.* *71*, 24–31.
- Montel-Hagen, A., Seet, C.S., Li, S., Chick, B., Zhu, Y., Chang, P., Tsai, S., Sun, V., Lopez, S., Chen, H.C., et al. (2019). Organoid-Induced Differentiation of Conventional T Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *24*, 376-389.e8.
- Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., Greber, B., and Moore, J.B. (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res. Ther.* *10*, 341.
- Moreau, T., Evans, A.L., Vasquez, L., Tijssen, M.R., Yan, Y., Trotter, M.W., Howard, D., Colzani, M., Arumugam, M., Wu, W.H., et al. (2016). Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat. Commun.* *7*, 1–16.
- Morizane, R., and Bonventre, J. V (2017). Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *12*, 195–207.
- La Motte-Mohs, R.N., Herer, E., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2005). Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* *105*, 1431–1439.
- van Mourik, J.A., de Wit, T.R., and Voorberg, J. (2002). Bioenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem. Cell Biol.* *117*, 113–122.
- Mousavi, S.A., Sporstøl, M., Fladeby, C., Kjekens, R., Barois, N., and Berg, T. (2007). Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγRIIb2. *Hepatology* *46*, 871–884.
- Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Bréant, C., and Eichmann, A. (2001). Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* *128*, 3359 LP – 3370.
- Mukoyama, Y.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Gu, C., and Anderson, D.J. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development* *132*, 941–952.

Muller, W.A., and Randolph, G.J. (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. In *Journal of Leukocyte Biology*, (Federation of American Societies for Experimental Biology), pp. 698–704.

Müller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzakt, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* *1*, 291–301.

Múnera, J.O., and Wells, J.M. (2017). Generation of Gastrointestinal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells BT - *Organ Regeneration: 3D Stem Cell Culture & Manipulation*. T. Tsuji, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 167–177.

Murray, P.D.F. (1932). The development in vitro of blood of the early chick embryo. *Proc.Roy.Soc.London* *11*, 497–521.

Mutirangura, P., Ruangsetakit, C., Wongwanit, C., Chinsakchai, K., Porat, Y., Belleli, A., and Czeiger, D. (2009). Enhancing limb salvage by non-mobilized peripheral blood angiogenic cell precursors therapy in patients with critical limb ischemia. Undefined.

Nagano, M., Yamashita, T., Hamada, H., Ohneda, K., Kimura, K.I., Nakagawa, T., Shibuya, M., Yoshikawa, H., and Ohneda, O. (2007). Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood* *110*, 151–160.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8424–8428.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* *26*, 101–106.

Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14152–14157.

Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., Oshima, M., Takagi, H., Miyagi, S., Endoh, M., Endo, T.A., Takayama, N., Eto, K., Toyoda, T., et al. (2013). Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* *121*, 447–458.

Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Dev.* *141*, 4656–4666.

Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K.I., Koike, T., Harimoto, K.I., Dohda, T., et al. (2014). Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *14*, 535–548.

Nakao, S., Hata, Y., Miura, M., Noda, K., Kimura, Y.N., Kawahara, S., Kita, T., Hisatomi, T., Nakazawa, T., Jin, Y., et al. (2007). Dexamethasone inhibits interleukin-1 β -induced corneal neovascularization: Role of nuclear factor- κ B-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *171*, 1058–1065.

Navarro-Montero, O., Ayllon, V., Lamolda, M., López-Onieva, L., Montes, R., Bueno, C., Ng, E., Guerrero-Carreno, X., Romero, T., Romero-Moya, D., et al. (2017). RUNX1c Regulates Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Possibly in Cooperation with Proinflammatory Signaling. *Stem Cells* *35*, 2253–2266.

Neal, E.H., Marinelli, N.A., Shi, Y., McClatchey, P.M., Balotin, K.M., Gullett, D.R., Hagerla, K.A., Bowman, A.B., Ess, K.C., Wikswow, J.P., et al. (2019). A Simplified, Fully Defined Differentiation Scheme for Producing Blood-Brain Barrier Endothelial Cells from Human iPSCs. *Stem Cell Reports* *12*, 1380–1388.

Neumeyer, J., Lin, R.Z., Wang, K., Hong, X., Hua, T., Croteau, S.E., Neufeld, E.J., and Melero-Martin, J.M. (2019). Bioengineering hemophilia a-specific microvascular grafts for delivery of full-length factor VIII into the bloodstream. *Blood Adv.* 3, 4166–4176.

Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* (80-). 247, 1219–1222.

Ng, E.S., Davis, R.P., Azzola, L., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 106, 1601–1603.

Ng, E.S., Davis, R., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2008). A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies. *Nat. Protoc.* 3, 768–776.

Ng, E.S., Azzola, L., Bruveris, F.F., Calvanese, V., Phipson, B., Vlahos, K., Hirst, C., Jokubaitis, V.J., Yu, Q.C., Maksimovic, J., et al. (2016). Differentiation of human embryonic stem cells to HOXA + hemogenic vasculature that resembles the aorta-gonad-mesonephros. *Nat. Biotechnol.* 34, 1168–1179.

Nibourg, G.A.A., Chamuleau, R.A.F.M., van der Hoeven, T. V, Maas, M.A.W., Ruiters, A.F.C., Lamers, W.H., Oude Elferink, R.P.J., van Gulik, T.M., and Hoekstra, R. (2012). Liver Progenitor Cell Line HepaRG Differentiated in a Bioartificial Liver Effectively Supplies Liver Support to Rats with Acute Liver Failure. *PLoS One* 7, e38778.

Nie, Y., Han, Y.C., and Zou, Y.R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 205, 777–783.

Niiyama, H., Huang, N.F., Rollins, M.D., and Cooke, J.P. (2009). Murine model of hindlimb ischemia. *J. Vis. Exp.* 1035.

Nishikawa, S. (2012). Hemangioblast: an *in vitro* phantom. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 603–608.

Nishimura, T., Kaneko, S., Kawana-Tachikawa, A., Tajima, Y., Goto, H., Zhu, D., Nakayama-Hosoya, K., Iriguchi, S., Uemura, Y., Shimizu, T., et al. (2013). Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell* 12, 114–126.

le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., Bréant, C., Fleury, V., and Eichmann, A. (2004). Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 131, 361–375.

Noguchi, H., Miyagi-Shiohira, C., and Nakashima, Y. (2018). Induced tissue-specific stem cells and epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Norona, L.M., Nguyen, D.G., Gerber, D.A., Presnell, S.C., and LeCluyse, E.L. (2016). Modeling compound-induced fibrogenesis *in vitro* using three-dimensional bioprinted human liver tissues. *Toxicol. Sci.* 154, 354–367.

Nostro, M.C., Cheng, X., Keller, G.M., and Gadue, P. (2008). Wnt, Activin, and BMP Signaling Regulate Distinct Stages in the Developmental Pathway from Embryonic Stem Cells to Blood. *Cell Stem Cell* 2, 60–71.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* (80-). 333, 218–221.

Nottingham, W.T., Jarratt, A., Burgess, M., Speck, C.L., Cheng, J.F., Prabhakar, S., Rubin, E.M., Li, P.S., Sloane-Stanley, J., Kong-A-San, J., et al. (2007). Runx1-mediated hematopoietic stem-cell

emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood* 110, 4188–4197.

Nunes, S.S., Rekapally, H., Chang, C.C., and Hoying, J.B. (2011). Vessel arterial-venous plasticity in adult neovascularization. *PLoS One* 6, 27332.

O'Connor, N., Mulliken, J., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O., and Green, H. (1981). GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS. *Lancet* 317, 75–78.

O'Donnell, J.S., O'Sullivan, J.M., and Preston, R.J.S. (2019). Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br. J. Haematol.* 186, 24–36.

O'Neal, R.M., Jordan, G.L., Rabin, E.R., De Bakey, M.E., and Halpert, B. (1964). Cells grown on isolated intravascular dacron hub. An electron microscopic study. *Exp. Mol. Pathol.* 3, 403–412.

Ober, E.A., and Lemaigre, F.P. (2018). Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. *J. Hepatol.* 68, 1049–1062.

Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., and Péault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 129, 4147 LP – 4157.

Oberlin, E., Hafny, B. El, 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, 1165–1173.

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* 116, 4444–4455.

Obi, S., Yamamoto, K., Shimizu, N., Kumagaya, S., Masumura, T., Sokabe, T., Asahara, T., and Ando, J. (2009). Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J. Appl. Physiol.* 106, 203–211.

Oguro, H., Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 13, 102–116.

Oh, P., McIntosh, D.P., and Schnitzer, J.E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141, 101–114.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* (80-.). 322, 949 LP – 953.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* 8, 409–412.

Okuda, T., Van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321–330.

Olivier, E.N., Qiu, C., Velho, M., Hirsch, R.E., and Bouhassira, E.E. (2006). Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 34, 1635–1642.

Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., and Zweigerdt, R. (2012). Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue Eng. Part C. Methods* 18, 772–784.

Olmer, R., Engels, L., Usman, A., Menke, S., Malik, M.N.H., Pessler, F., Göhring, G., Bornhorst, D., Bolten, S., Abdelilah-Seyfried, S., et al. (2018). Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Endothelial Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports* 10, 1657–1672.

Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., et al. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483, 598–602.

Opal, S.M., Kessler, C.M., Roemisch, J., and Knaub, S. (2002). Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. In *Critical Care Medicine*, (Lippincott Williams and Wilkins), p.

Orlova, V. V, van den Hil, F.E., Petrus-Reurer, S., Drabsch, Y., Ten Dijke, P., and Mummery, C.L. (2014). Generation, expansion and functional analysis of endothelial cells and pericytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 9, 1514–1531.

Ortmann, D., Brown, S., Czechanski, A., Aydin, S., Muraro, D., Huang, Y., Tomaz, R.A., Osnato, A., Canu, G., Wesley, B.T., et al. (2020). Naive Pluripotent Stem Cells Exhibit Phenotypic Variability that is Driven by Genetic Variation. *Cell Stem Cell* 27, 470-481.e6.

Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 26, 313–315.

Padgett, M.E., McCord, T.J., McClung, J.M., and Kontos, C.D. (2016). Methods for acute and subacute murine hindlimb ischemia. *J. Vis. Exp.* 2016, 54166.

Padrón-Barthe, L., Temiño, S., Villa Del Campo, C., Carramolino, L., Isern, J., and Torres, M. (2014). Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo. *Blood* 124, 2523–2532.

Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., and Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* 159, 428–439.

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, 979–987.

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073 LP – 5084.

Palladino, A., Mavaro, I., Pizzoleo, C., De Felice, E., Lucini, C., de Girolamo, P., Netti, P.A., and Attanasio, C. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells as Vasculature Forming Entities. *J. Clin. Med.* 8, 1782.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.

Palpant, N.J., Pabon, L., Roberts, M., Hadland, B., Jones, D., Jones, C., Moon, R.T., Ruzzo, W.L., Bernstein, I., Zheng, Y., et al. (2015). Inhibition of β -catenin signaling respecifies anterior-like endothelium into beating human cardiomyocytes. *Development* 142, 3198–3209.

Palpant, N.J., Pabon, L., Friedman, C.E., Roberts, M., Hadland, B., Zaunbrecher, R.J., Bernstein, I., Zheng, Y., and Murry, C.E. (2017). Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 12, 15–31.

Pan, Y., Wang, W. di, and Yago, T. (2014). Transcriptional regulation of podoplanin expression by Prox1 in lymphatic endothelial cells. *Microvasc. Res.* 94, 96–102.

- Papa, L., Djedaini, M., and Hoffman, R. (2019). Ex vivo HSC expansion challenges the paradigm of unidirectional human hematopoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1466*, 39–50.
- Papp, B., and Plath, K. (2011). Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* *21*, 486–501.
- Papp, B., and Plath, K. (2013). Epigenetics of Reprogramming to Induced Pluripotency. *Cell* *152*, 1324–1343.
- Parameswaran, M., and Tam, P.P.L. (1995). Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Dev. Genet.* *17*, 16–28.
- Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L.M., Catala, M., and Dieterlen-Lievre, F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* *122*, 1363–1371.
- Parekkadan, B., and Milwid, J.M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *12*, 87–117.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* *134*, 877–886.
- Parry, G.C.N., and Mackman, N. (1995). Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *15*, 612–621.
- Patan, S., Alvarez, M.J., Schittny, J.C., and Burri, P.H. (1992). Intussusceptive Micro vascular Growth: A Common Alternative to Capillary Sprouting. *Arch. Histol. Cytol.* *55*, 65–75.
- de Pater, E., Kaimakis, P., Vink, C.S., Yokomizo, T., Yamada-Inagawa, T., van der Linden, R., Kartalaei, P.S., Camper, S.A., Speck, N., and Dzierzak, E. (2013). Gata2 is required for HSC generation and survival. *J. Exp. Med.* *210*, 2843–2850.
- Patil, S.D., Papadimitrakopoulos, F., and Burgess, D.J. (2007). Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *J. Control. Release* *117*, 68–79.
- Patrat, C., Ouimette, J.-F., and Rougeulle, C. (2020). X chromosome inactivation in human development. *Development* *147*, dev183095.
- Patsch, C., Challet-Meylan, L., Thoma, E.C., Urlich, E., Heckel, T., O’Sullivan, J.F., Grainger, S.J., Kapp, F.G., Sun, L., Christensen, K., et al. (2015). Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* *17*, 994–1003.
- Patterson, M., Chan, D.N., Ha, I., Case, D., Cui, Y., Handel, B. Van, Mikkola, H.K.A., and Lowry, W.E. (2012). Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res.* *22*, 178–193.
- Pearson, S., Sroczynska, P., Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2008). The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to. *1535*, 1525–1535.
- Peeters, M., Ottersbach, K., Bollerot, K., Orelino, 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*, 2613–2621.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* (80-.). *283*, 845–848.
- 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, 3289–3296.

Pendeville, H., Winandy, M., Manfroid, I., Nivelles, O., Motte, P., Pasque, V., Peers, B., Struman, I., Martial, J.A., and Voz, M.L. (2008). Zebrafish Sox7 and Sox18 function together to control arterial-venous identity. *Dev. Biol.* 317, 405–416.

Persons, D.A., Allay, J.A., Allay, E.R., Ashmun, R.A., Orlic, D., Jane, S.M., Cunningham, J.M., and Nienhuis, A.W. (1999). Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* 93, 488–499.

Peschle, C., Mavilio, F., Carè, A., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Salvo, G., Samoggia, P., Petti, S., Guerriero, R., Marinucci, M., et al. (1985). Haemoglobin switching in human embryos: Asynchrony of $\zeta \rightarrow \alpha$ and $\epsilon \rightarrow \gamma$ -globin switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. *Nature* 313, 235–238.

Petersson, J., Zygmunt, P.M., and Högestätt, E.D. (1997). Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 120, 1344–1350.

Pham, M.T., Pollock, K.M., Rose, M.D., Cary, W.A., Stewart, H.R., Zhou, P., Nolte, J.A., and Waldau, B. (2018). Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport* 29, 588–593.

Phetfong, J., Supokawej, A., Wattanapanitch, M., Kheolamai, P., U-pratya, Y., and Issaragrisil, S. (2016). Cell type of origin influences iPSC generation and differentiation to cells of the hematoendothelial lineage. *Cell Tissue Res.* 365, 101–112.

Picanço-Castro, V., Russo-Carbolante, E., Reis, L.C.J., Fraga, A.M., de Magalhães, D.A.R., Orellana, M.D., Panepucci, R.A., Pereira, L.V., and Covas, D.T. (2010). Pluripotent Reprogramming of Fibroblasts by Lentiviral-mediated Insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells Dev.* 20, 169–180.

Pimanda, J.E., Donaldson, I.J., de Bruijn, M.F.T.R., Kinston, S., Knezevic, K., Huckle, L., Piltz, S., Landry, J.-R., Green, A.R., Tannahill, D., et al. (2007). The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 840 LP – 845.

PJ, C., GF, W., JR, C., and JM, R. (1992). Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. *Lancet* 340, 1430–1432.

Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 70, 427–451.

Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815.

Ponio, J.B.-D., El-Ayoubi, F., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., Driancourt, C., Godet, M., Perrière, N., Guillevic, O., Couraud, P.O., and Uzan, G. (2014). Instruction of Circulating Endothelial Progenitors In Vitro towards Specialized Blood-Brain Barrier and Arterial Phenotypes. *PLoS One* 9, e84179.

Poole, T.J., Finkelstein, E.B., and Cox, C.M. (2001). The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev. Dyn.* 220, 1–17.

Popescu, D.M., Botting, R.A., Stephenson, E., Green, K., Webb, S., Jardine, L., Calderbank, E.F., Polanski, K., Goh, I., Efremova, M., et al. (2019). Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature* 574, 365–371.

Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47–57.

Poredos, P., and Jezovnik, M.K. Endothelial Dysfunction and Venous Thrombosis.

Potocnik, A.J., Brakebusch, C., and Fässler, R. (2000). Fetal and adult hematopoietic stem cells

require $\beta 1$ integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* 12, 653–663.

Potts, K.S., Sargeant, T.J., Markham, J.F., Shi, W., Biben, C., Josefsson, E.C., Whitehead, L.W., Rogers, K.L., Liakhovitskaia, A., Smyth, G.K., et al. (2014). A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* 124, 2725–2729.

Poursaleh, A., Esfandiari, G., Beigee, F., Eshghifar, N., and Najafi, M. (2019). Isolation of intimal endothelial cells from the human thoracic aorta: Study protocol. *Med. J. Islam. Repub. Iran* 33, 51.

Prado-Lopez, S., Conesa, A., Armijañn, A., Martañez-Losa, M., Escobedo-Lucea, C., Gandia, C., Tarazona, S., Melguizo, D., Blesa, D., Montaner, D., et al. (2009). Hypoxia Promotes Efficient Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Functional Endothelium. *Stem Cells* 28, N/A-N/A.

Prasain, N., Lee, M.R., Vemula, S., Meador, J.L., Yoshimoto, M., Ferkowicz, M.J., Fett, A., Gupta, M., Rapp, B.M., Saadatzadeh, M.R., et al. (2014). Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 1151–1157.

Prescott, C. (2011). The business of exploiting induced pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 2323–2328.

Prescott, S.M., McIntyre, T.M., and Zimmerman, G.A. (2001). Events at the vascular wall: The molecular basis of inflammation. In *Journal of Investigative Medicine*, (BMJ Publishing Group), pp. 104–111.

Proust, R., Ponsen, A.C., Rouffiac, V., Schenowitz, C., Montespan, F., Ser-Le Roux, K., De Leeuw, F., Laplace-Builhé, C., Mauduit, P., Carosella, E.D., et al. (2020). Cord blood-endothelial colony forming cells are immunotolerated and participate at post-ischemic angiogenesis in an original dorsal chamber immunocompetent mouse model. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 172.

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Månsson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E.W. (2007). Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 1, 671–684.

Raab, S., Klingenstein, M., Liebau, S., and Linta, L. (2014). A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* 2014, 768391.

Rabiet, M.J., Plantier, J.L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1996). Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 488–496.

Rafii, S., Kloss, C.C., Butler, J.M., Ginsberg, M., Gars, E., Lis, R., Zhan, Q., Josipovic, P., Ding, B. Sen, Xiang, J., et al. (2013). Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 121, 770–780.

Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1057–1069.

Ramachandran, S.D., Schirmer, K., Münst, B., Heinz, S., Ghafoory, S., Wölfl, S., Simon-Keller, K., Marx, A., Øie, C.I., Ebert, M.P., et al. (2015). In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells. *PLoS One* 10, e0139345.

Ramadan, F.M., Upchurch, G.R., Keagy, B.A., and Johnson, G. (1990). Endothelial cell thromboxane production and its inhibition by a calcium-channel blocker. *Ann. Thorac. Surg.* 49, 916–919.

Ramanathan, R., Pettinato, G., Beeston, J.T., Lee, D.D., Wen, X., Mangino, M.J., and Fisher, R.A. (2015). Transplantation of human stem cell-derived hepatocytes in an animal model of acute liver failure. *Surg. (United States)* 158, 349–359.

Ramkumar, N., and Anderson, K. V. (2011). SnapShot: Mouse primitive streak. *Cell* *146*, 488-488.e2.

Ran, D., Shia, W.J., Lo, M.C., Fan, J.B., Knorr, D.A., Ferrell, P.I., Ye, Z., Yan, M., Cheng, L., Kaufman, D.S., et al. (2013). RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* *121*, 2882–2890.

Rasmussen, T.L., Kweon, J., Diekmann, M.A., Belema-Bedada, F., Song, Q., Bowlin, K., Shi, X., Ferdous, A., Li, T., Kyba, M., et al. (2011). ER71 directs mesodermal fate decisions during embryogenesis. *Development* *138*, 4801–4812.

Raven, J.A. (2018). Evolution and palaeophysiology of the vascular system and other means of long-distance transport. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *373*.

Real, P.J., Ligeró, G., Ayllón, V., Ramos-Mejía, V., Bueno, C., Gutiérrez-Aranda, I., Navarro-Montero, O., Lako, M., and Menéndez, P. (2012). SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. In *Molecular Therapy*, (Nature Publishing Group), pp. 1443–1453.

Reed, D.M., Foldes, G., Harding, S.E., and Mitchell, J.A. (2013). Stem cell-derived endothelial cells for cardiovascular disease: A therapeutic perspective. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *75*, 897–906.

Reid, J.C., Tanasijevic, B., Golubeva, D., Boyd, A.L., Porras, D.P., Collins, T.J., and Bhatia, M. (2018). CXCL12/CXCR4 Signaling Enhances Human PSC-Derived Hematopoietic Progenitor Function and Overcomes Early In Vivo Transplantation Failure. *Stem Cell Reports* *10*, 1625–1641.

van Rensburg, R., Strauss, R., Beyer, I., Denisenko, O., Bomsztyk, K., and Lieber, A. (2011). 852. Similarities between Cancer Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. Ther.* *19*, S326.

Revazova, E.S., Turovets, N.A., Kochetkova, O.D., Kindarova, L.B., Kuzmichev, L.N., Janus, J.D., and Pryzhkova, M. V. (2007). Patient-Specific Stem Cell Lines Derived from Human Parthenogenetic Blastocysts. *Cloning Stem Cells* *9*, 432–449.

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.A. (2008). The Emergence of Hematopoietic Stem Cells Is Initiated in the Placental Vasculature in the Absence of Circulation. *Cell Stem Cell* *2*, 252–263.

Richards, M., Fong, C.-Y., Chan, W.-K., Wong, P.-C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *20*, 933–936.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671–674.

Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., and Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* *102*, 471–478.

Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Köntgen, 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*, 7075–7079.

Robert-Moreno, À., Espinosa, L., de la Pompa, J.L., and Bigas, A. (2005). RBPjk-dependent Notch function regulates *Gata2* and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development* *132*, 1117–1126.

Robertson, C., Tran, D.D., and George, S.C. (2013). Concise review: Maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* *31*, 829–837.

Robertson, S.M., Kennedy, M., Shannon, J.M., and Keller, G. (2000). A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor *SCL/tal-1*. *Development* *127*, 2447 LP – 2459.

Robinson, A.S., Materna, S.C., Barnes, R.M., De Val, S., Xu, S.M., and Black, B.L. (2014). An arterial-specific enhancer of the human endothelin converting enzyme 1 (ECE1) gene is synergistically activated by Sox17, FoxC2, and Etv2. *Dev. Biol.* 395, 379–389.

Rodin, S., Domogatskaya, A., Ström, S., Hansson, E.M., Chien, K.R., Inzunza, J., Hovatta, O., and Tryggvason, K. (2010). Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat. Biotechnol.* 28, 611–615.

Rosa, A.I., Grade, S., Santos, S.D., and Bernardino, L. (2016). Heterocellular Contacts with Mouse Brain Endothelial Cells Via Laminin and $\alpha 6 \beta 1$ Integrin Sustain Subventricular Zone (SVZ) Stem / Progenitor Cells Properties. *10*, 1–14.

Rosa, S., Praça, C., Pitrez, P.R., Gouveia, P.J., Aranguren, X.L., Ricotti, L., and Ferreira, L.S. (2019). Functional characterization of iPSC-derived arterial- and venous-like endothelial cells. *Sci. Rep.* 9.

De Rosa, S., Seeger, F.H., Honold, J., Fischer-Rasokat, U., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Schächinger, V., Dimmeler, S., Zeiher, A.M., and Assmus, B. (2013). Procedural safety and predictors of acute outcome of intracoronary administration of progenitor cells in 775 consecutive procedures performed for acute myocardial infarction or chronic heart failure. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 6, 44–51.

Rossmann, M.P., Orkin, S.H., and Chute, J.P. (2017). HEMATOPOIETIC STEM CELL BIOLOGY. In *Hematology-Basic Principles and Practice*, R. Weitz, E. Hoffman, H. Benz, and J. Heslop, eds. (Elsevier), pp. 95–110.

Rouffiac, V., Roux, K.S. Le, Salomé-Desnoullez, S., Leguerney, I., Ginefri, J.C., Sébrié, C., Jourdain, L., Lécluse, Y., and Laplace-Builhé, C. (2020). Multimodal imaging for tumour characterization from micro- to macroscopic level using a newly developed dorsal chamber designed for long-term follow-up. *J. Biophotonics* 13.

Rowe, R.G., and Daley, G.Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* 20, 377–388.

Roy, V., and Verfaillie, C.M. (1999). Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: Implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 27, 302–312.

Rubanyi, G.M., and Vanhoutte, P.M. (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 250, H822–H827.

Rufaihah, A.J., Huang, N.F., Kim, J., Herold, J., Volz, K.S., Park, T.S., Lee, J.C., Zambidis, E.T., Reijo-Pera, R., and Cooke, J.P. (2013). Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity. *Am. J. Transl. Res.* 5, 21–35.

Ruiz, S., Brennand, K., Panopoulos, A.D., Herrerías, A., Gage, F.H., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2010). High-Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Astrocytes. *PLoS One* 5, e15526.

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, 1305–1315.

Sabin, F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contrib. Embryol.* 9, 213–262.

Sahara, M., Hansson, E.M., Wernet, O., Lui, K.O., Später, D., and Chien, K.R. (2014). Manipulation of a VEGF-Notch signaling circuit drives formation of functional vascular endothelial progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Res.* 24, 820.

Sakurai, H., Era, T., Jakt, L.M., Okada, M., Nakai, S., Nishikawa, S., and Nishikawa, S.-I. (2006). In

Vitro Modeling of Paraxial and Lateral Mesoderm Differentiation Reveals Early Reversibility. *Stem Cells* 24, 575–586.

Sakurai, K., Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A.F., Sasaki, N., Takuwa, Y., Masaki, T., and Sawamura, T. (2004). Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). In *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, (J Cardiovasc Pharmacol), p.

Salzmann, M., Schmid, D., and Geiger, M. (2019). Regulation of Tissue Perfusion and Exchange of Solutes, Macromolecules, and Water Between Blood Vessels and the Interstitial Space. (Springer, Cham), pp. 65–80.

Sampaio, W.O., and Souza dos Santos, R.A. (2018). Endothelium and the Renin-Angiotensin System. In *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*, (Elsevier), pp. 203–211.

Sampaio, W.O., Souza dos Santos, R.A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L.T., Schiffrin, E.L., and Touyz, R.M. (2007). Ang-(1-7), acting through the G protein-coupled receptor (GPCR) Mas, releases NO and prostaglandins causing vasodilation. *Hypertension* 49, 185–192.

Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G.C., Campbell, K.P., et al. (2003). Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* (80-). 301, 487–492.

Sandoval, R., Malik, A.B., Minshall, R.D., Kouklis, P., Ellis, C.A., and Tiruppathi, C. (2001). Ca²⁺ signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J. Physiol.* 533, 433–445.

Sankaran, V.G., and Orkin, S.H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.

Sato, Y., Nakajima, S., Shiraga, N., Atsumi, H., Yoshida, S., Koller, T., Gerig, G., and Kikinis, R. (1998). Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. *Med. Image Anal.* 2, 143–168.

Sawamiphak, S., Kontarakis, Z., and Stainier, D.Y.R. (2014). Interferon Gamma Signaling Positively Regulates Hematopoietic Stem Cell Emergence. *Dev. Cell* 31, 640–653.

Scadden, D.T., and Aster, J.C. (2011). Hematopoiesis. In *Pathophysiology of Blood Disorders*, H.F. Bunn, and J.C. Aster, eds. (The McGraw-Hill Companies), pp. 25–38.

Scala, S., and Aiuti, A. (2019). In vivo dynamics of human hematopoietic stem cells: Novel concepts and future directions. *Blood Adv.* 3, 1916–1924.

Scandura, J.M., Bocconi, P., Massagué, J., and Nimer, S.D. (2004). Transforming growth factor β -induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15231 LP – 15236.

Schacht, V., Ramirez, M.I., Hong, Y.-K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., Oliver, G., et al. (2003). T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 22, 3546–3556.

Schlaeger, T.M., Mikkola, H.K.A., 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, 3871–3874.

Schneider, M.K., Ioanas, H.I., Xandry, J., and Rudin, M. (2019). An in vivo wound healing model for the characterization of the angiogenic process and its modulation by pharmacological interventions. *Sci. Rep.* 9, 1–11.

Scholz, D., Devaux, B., Hirche, A., Pötzsch, B., Kropp, B., Schaper, W., and Schaper, J. (1996). Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* *284*, 415–423.

Schreiter, J., Meyer, S., Schmidt, C., Schulz, R.M., and Langer, S. (2017). Dorsal skinfold chamber models in mice. *GMS Interdiscip. Plast. Reconstr. Surg. DGPW* *6*, Doc10.

Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* (80-). *335*, 86–90.

Schulz, E.G., Meisig, J., Nakamura, T., Okamoto, I., Sieber, A., Picard, C., Borensztein, M., Saitou, M., Blüthgen, N., and Heard, E. (2014). The Two Active X Chromosomes in Female ESCs Block Exit from the Pluripotent State by Modulating the ESC Signaling Network. *Cell Stem Cell* *14*, 203–216.

Schweitzer, K.M., Dräger, A.M., Van Der Valk, P., Thijsen, S.F.T., Zevenbergen, A., Theijssmeijer, A.P., Van Der Schoot, C.E., and Langenhuijsen, M.M.A.C. (1996). Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* *148*, 165–175.

Scotland, R.S., Madhani, M., Chauhan, S., Moncada, S., Andresen, J., Nilsson, H., Hobbs, A.J., and Ahluwalia, A. (2005). Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: Key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation* *111*, 796–803.

Scott, A., and Fruttiger, M. (2010). Oxygen-induced retinopathy: A model for vascular pathology in the retina. In *Eye*, (Nature Publishing Group), pp. 416–421.

Segarra, M., Aburto, M.R., Cop, F., Llaó-Cid, C., Härtl, R., Damm, M., Bethani, I., Parrilla, M., Husainie, D., Schänzer, A., et al. (2018). Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science* (80-). *361*, eaao2861.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., et al. (2010). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. *Cell Stem Cell* *7*, 11–14.

Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A., and Kume, T. (2006). The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev. Biol.* *294*, 458–470.

Shahjalal, H.M., Abdal Dayem, A., Lim, K.M., Jeon, T.-I., and Cho, S.-G. (2018). Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Res. Ther.* *9*, 355.

Shalaby, F., Janet, R., 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 Publishing Group).

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13726 LP – 13731.

Shan, J., Schwartz, R.E., Ross, N.T., Logan, D.J., Thomas, D., Duncan, S.A., North, T.E., Goessling, W., Carpenter, A.E., and Bhatia, S.N. (2013). Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 514–520.

Shankar, K., Capitini, C.M., Capitini, C.M., Saha, K., Saha, K., and Saha, K. (2020). Genome engineering of induced pluripotent stem cells to manufacture natural killer cell therapies. *Stem Cell Res. Ther.* *11*.

Shao, Y., Sang, J., and Fu, J. (2015). On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D

bioengineering and mechanobiology. *Biomaterials* 52, 26–43.

Shaut, C.A.E., Keene, D.R., Sorensen, L.K., Li, D.Y., and Stadler, H.S. (2008). HOXA13 Is Essential for Placental Vascular Patterning and Labyrinth Endothelial Specification. *PLoS Genet.* 4, e1000073.

Shi, Y., Tae Do, J., Despots, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008). A Combined Chemical and Genetic Approach for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2, 525–528.

Shin, J.M., Kim, J., Kim, H.E., Lee, M.J., Lee, K. II, Gyong Yoo, E., Joo Jeon, Y., Chae, D.W.K.J. II, and Chung, H.M. (2011). Enhancement of differentiation efficiency of hESCs into vascular lineage cells in hypoxia via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res.* 7, 173–185.

Shin, J.W., Min, M., Larrieu-Lahargue, F., Canron, X., Kunstfeld, R., Nguyen, L., Henderson, J.E., Bikfalvi, A., Detmar, M., and Hong, Y.K. (2006). Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: A role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 576–584.

Shin, J.Y., Hu, W., Naramura, M., and Park, C.Y. (2014). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J. Exp. Med.* 211, 217–231.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., and Weiss, S. (2003). Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. *Science* (80-.). 299, 117 LP – 120.

Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432–434.

Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz- scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells . *J. Immunol.* 174, 6477–6489.

Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297–305.

Sica, A., Wang, J.M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., Larsen, C.G., Zachariae, C.O., and Matsushima, K. (1990a). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 144, 3034–3038.

Sica, A., Matsushima, K., Van Damme, J., Wang, J.M., Polentarutti, N., Dejana, E., Colotta, F., and Mantovani, A. (1990b). IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology* 69, 548–553.

Sidar, B., Jenkins, B.R., Huang, S., Spence, J.R., Walk, S.T., and Wilking, J.N. (2019). Long-Term flow through human intestinal organoids with the gut organoid flow chip (GOFlowChip). *Lab Chip* 19, 3552–3562.

Simian, M., and Bissell, M.J. (2016). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* 216, 31–40.

Singh, V.K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., and Chandra, R. (2015). Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 2.

Sinka, L., Biasch, K., Khazaal, I., Péault, B., and Tavian, M. (2012). Angiotensin-converting enzyme (CD143) specifies emerging lympho-hematopoietic progenitors in the human embryo. *Blood* 119,

3712–3723.

Sirois, M.G., Jancar, S., Braquet, P., Plante, G.E., and Sirois, P. (1988). PAF increases vascular permeability in selected tissues: Effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins* 36, 631–644.

Şişli, H.B., Hayal, T.B., Seçkin, S., Şenkal, S., Kiratlı, B., Şahin, F., and Doğan, A. (2020). Gene Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Recent Advances for Clinical Therapies *BT - Cell Biology and Translational Medicine, Volume 7: Stem Cells and Therapy: Emerging Approaches*. K. Turksen, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 17–28.

Siti-Ismael, N., Bishop, A.E., Polak, J.M., and Mantalaris, A. (2008). The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance. *Biomaterials* 29, 3946–3952.

Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G. V, Fox, N., Broudy, V., Wolf, N., and Kaushansky, K. (1996). The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87 12, 4998–5005.

Sivarapatna, A., Ghaedi, M., Le, A. V., Mendez, J.J., Qyang, Y., and Niklason, L.E. (2015). Arterial specification of endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells in a biomimetic flow bioreactor. *Biomaterials* 53, 621–633.

Skelly, D., Czechanski, A., Byers, C., Aydin, S., Spruce, C., Olivier, C., Choi, K., Gatti, D., Raghupathy, N., Stanton, A., et al. (2019). Genetic variation influences pluripotent ground state stability in mouse embryonic stem cells through a hierarchy of molecular phenotypes. *BioRxiv* 552059.

Skylar-Scott, M.A., Uzel, S.G.M., Nam, L.L., Ahrens, J.H., Truby, R.L., Damaraju, S., and Lewis, J.A. (2019). Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Sci. Adv.* 5.

Slukvin, I.I. (2013). Deciphering the hierarchy of angiohematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 12, 720–727.

Slukvin, I.I., and Kumar, A. (2018). The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.*

Smith, Q., Chan, X.Y., Carmo, A.M., Trempel, M., Saunders, M., and Gerecht, S. (2017). Compliant substratum guides endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Sci. Adv.* 3, e1602883.

Soares-da-Silva, F., Peixoto, M., Cumano, A., and Pinto-do-Ó, P. (2020). Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 612.

Soma, T., Yu, J.M., and Dunbar, C.E. (1996). Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities. *Blood* 87, 4561–4567.

Somers, A., Jean, J.-C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., et al. (2010). Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells* 28, 1728–1740.

Song, B., Niclis, J.C., Alikhan, M.A., Sakkal, S., Sylvain, A., Kerr, P.G., Laslett, A.L., Bernard, C.A., and Ricardo, S.D. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1213–1220.

Song, L., Yuan, X., Jones, Z., Gri, K., Zhou, Y., Ma, T., and Li, Y. (2019). Assembly of Human Stem Cell- Derived Cortical Spheroids and Vascular Spheroids to Model 3-D Brain-like Tissues. 1–16.

Song, W., Lu, Y.C., Frankel, A.S., An, D., Schwartz, R.E., and Ma, M. (2015). Engraftment of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes in immunocompetent mice via 3D co-aggregation and encapsulation. *Sci. Rep.* *5*, 1–13.

Song, Z., Cai, J., Liu, Y., Zhao, D., Yong, J., Duo, S., Song, X., Guo, Y., Zhao, Y., Qin, H., et al. (2009). Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* *19*, 1233–1242.

Sørensen, K.K., McCourt, P., Berg, T., Crossley, C., Couteur, D. Le, Wake, K., and Smedsrød, B. (2012). The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* *303*, R1217–R1230.

Sørensen, K.K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R.S., and Smedsrød, B. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells. *Compr. Physiol.* *5*, 1751–1774.

Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., and Frisén, J. (2005). Retrospective Birth Dating of Cells in Humans. *Cell* *122*, 133–143.

De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., Djonov, V., and Cornillie, P. (2012). Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant Form of Angiogenesis. *J. Vasc. Res.* *49*, 390–404.

Srinivasan, R.S., Dillard, M.E., Lagutin, O. V, Lin, F.-J., Tsai, S., Tsai, M.-J., Samokhvalov, I.M., and Oliver, G. (2007). Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev.* *21*, 2422–2432.

Sriram, G., Tan, J.Y., Islam, I., Rufaihah, A.J., and Cao, T. (2015). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. *Stem Cell Res. Ther.* *6*.

Sroczyńska, P., Lancrin, C., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood* *114*, 5279–5289.

Staber, P.B., Zhang, P., Ye, M., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., Bach, C., Kerenyi, M., Bartholdy, B.A., Zhang, H., Alberich-Jordà, M., et al. (2013). Sustained PU.1 Levels Balance Cell-Cycle Regulators to Prevent Exhaustion of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell* *49*, 934–946.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008a). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* *2*, 230–240.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* *322*, 945–949.

Stalmans, I., Ng, Y.-S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., et al. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* *109*, 327–336.

Stebbins, M.J., Lippmann, E.S., Faubion, M.G., Daneman, R., Palecek, S.P., and Shusta, E. V. (2018). Activation of RAR α , RAR γ , or RXR α Increases Barrier Tightness in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Endothelial Cells. *Biotechnol. J.* *13*, 1–12.

Steichen, C., Luce, E., Maluenda, J., Tosca, L., Moreno-Gimeno, I., Desterke, C., Dianat, N., Goulinet-Mainot, S., Awan-Toor, S., Burks, D., et al. (2014). Messenger RNA- Versus Retrovirus-Based Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies: Analysis of Genomic Integrity. *Stem Cells Transl. Med.* *3*, 686–691.

Steiner, D., Khaner, H., Cohen, M., Even-Ram, S., Gil, Y., Itsykson, P., Turetsky, T., Idelson, M., Aizenman, E., Ram, R., et al. (2010). Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat. Biotechnol.* *28*, 361–364.

Stevens, L.C. (1958). Studies on Transplantable Testicular Teratomas of Strain 129 Mice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *20*, 1257–1275.

Stevens, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* *21*, 364–382.

Strilić, B., Kučera, T., Eglinger, J., Hughes, M.R., McNagny, K.M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., and Lammert, E. (2009). The Molecular Basis of Vascular Lumen Formation in the Developing Mouse Aorta. *Dev. Cell* *17*, 505–515.

Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M., and Keller, G. (2014). Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells.

Su, Z., Frye, C., Bae, K.M., Kelley, V., and Vieweg, J. (2008). Differentiation of human embryonic stem cells into immunostimulatory dendritic cells under feeder-free culture conditions. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6207–6217.

Sugii, S., Kida, Y., Kawamura, T., Suzuki, J., Vassena, R., Yin, Y.-Q., Lutz, M.K., Berggren, W.T., Izpisua Belmonte, J.C., and Evans, R.M. (2010). Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 200910172.

Sugimine, Y., Niwa, A., Matsubara, H., Kobayashi, K., Tabata, Y., Heike, T., Nakahata, T., and Saito, M.K. (2016). A portable platform for stepwise hematopoiesis from human pluripotent stem cells within PET-reinforced collagen sponges. *Int. J. Hematol.* *104*, 647–660.

Sugimura, R., Jha, D.K., Han, A., Soria-Valles, C., Da Rocha, E.L., Lu, Y.F., Goettel, J.A., Serrao, E., Rowe, R.G., Malleshiah, M., et al. (2017). Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature* *545*, 432–438.

Sugiyama, D., Ogawa, M., Hirose, I., Jaffredo, T., Arai, K. ichi, and Tsuji, K. (2003). Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the pre-liver stage. *Blood* *101*, 4733–4738.

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*, 301–306.

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*, 977–988.

Sugiyama, Y., Koike, T., and Shiojiri, N. (2010). Developmental Changes of Cell Adhesion Molecule Expression in the Fetal Mouse Liver. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* *293*, 1698–1710.

Sullivan, S., Stacey, G.N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., et al. (2018). Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen. Med.* *13*, 859–866.

Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* *135*, 2969 LP – 2979.

Sung, J.J., Park, C.Y., Leem, J.W., Cho, M.S., and Kim, D.W. (2019). Restoration of FVIII expression by targeted gene insertion in the FVIII locus in hemophilia A patient-derived iPSCs. *Exp. Mol. Med.* *51*, 1–9.

Sung, J.J., Park, S., Choi, S.H., Kim, J., Cho, M.S., and Kim, D.W. (2020). Generation of a gene edited hemophilia A patient-derived iPSC cell line, YCMi001-B-1, by targeted insertion of coagulation factor FVIII using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res.* *48*, 101948.

Supp, D.M., Wilson-Landy, K., and Boyce, S.T. (2002). Human dermal microvascular endothelial

cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J.* *16*, 797–804.

Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* *87*, 1171–1180.

Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3584–3588.

Suvà, M.L., Riggi, N., and Bernstein, B.E. (2013). Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* *339*, 1567–1570.

Sweeney, C.L., Merling, R.K., Choi, U., Priel, D.L., Kuhns, D.B., Wang, H., and Malech, H.L. (2014). Generation of functionally mature neutrophils from induced pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* *1124*, 189–206.

Swiers, G., Baumann, C., O'Rourke, J., Giannoulatou, E., Taylor, S., Joshi, A., Moignard, V., Pina, C., Bee, T., Kokkaliaris, K.D., et al. (2013). Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nat. Commun.* *4*.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* *153*, 1228–1238.

Taguchi, A., and Nishinakamura, R. (2017). Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *21*, 730-746.e6.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 183–193.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* *131*, 861–872.

Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* *5*, 434–438.

Takasato, M., Er, P.X., Chiu, H.S., Maier, B., Baillie, G.J., Ferguson, C., Parton, R.G., Wolvetang, E.J., Roost, M.S., De Sousa Lopes, S.M.C., et al. (2015). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* *526*, 564–568.

Takayama, K., Kawabata, K., Nagamoto, Y., Kishimoto, K., Tashiro, K., Sakurai, F., Tachibana, M., Kanda, K., Hayakawa, T., Furue, M.K., et al. (2013). 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* *34*, 1781–1789.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* *499*, 481–484.

Takebe, T., Zhang, R.R., Koike, H., Kimura, M., Yoshizawa, E., Enomura, M., Koike, N., Sekine, K., and Taniguchi, H. (2014). Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat. Protoc.* *9*, 396–409.

Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Ayano, S., Koido, M., Funayama, S., Nakanishi,

N., Hisai, T., Kobayashi, T., et al. (2017). Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells Report Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *CellReports* 21, 2661–2670.

Takeishi, K., Collin de l'Hortet, A., Wang, Y., Handa, K., Guzman-Lepe, J., Matsubara, K., Morita, K., Jang, S., Haep, N., Florentino, R.M., et al. (2020). Assembly and Function of a Bioengineered Human Liver for Transplantation Generated Solely from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 31, 107711.

Tam, P.P.L., and Loebel, D.A.F. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat. Rev. Genet.* 8, 368–381.

Tan, H.-K., Toh, C.-X.D., Ma, D., Yang, B., Liu, T.M., Lu, J., Wong, C.-W., Tan, T.-K., Li, H., Syn, C., et al. (2014). Human finger-prick induced pluripotent stem cells facilitate the development of stem cell banking. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 586–598.

Tan, K.S., Tamura, K., Lai, M.I., Veerakumarasivam, A., Nakanishi, Y., Ogawa, M., and Sugiyama, D. (2013). Molecular Pathways Governing Development of Vascular Endothelial Cells from ES/iPS Cells. *Stem Cell Rev. Reports* 9, 586–598.

Tan, Y.T., Ye, L., Xie, F., Beyer, A.I., Muench, M.O., Wang, J., Chen, Z., Liu, H., Chen, S.J., and Kan, Y.W. (2018). Respecifying human iPSC-derived blood cells into highly engraftable hematopoietic stem and progenitor cells with a single factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2180–2185.

Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12172–12179.

Tanaka, M., Jokubaitis, V., Wood, C., Wang, Y., Brouard, N., Pera, M., Hearn, M., Simmons, P., and Nakayama, N. (2009). BMP inhibition stimulates WNT-dependent generation of chondrogenic mesoderm from embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 3, 126–141.

Tanaka, Y., Adams, D.H., and Shaw, S. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* 14, 111–115.

Tao, L., Togarrati, P.P., Choi, K.D., and Suknuntha, K. (2017). Stemregenin 1 selectively promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors derived from human embryonic stem cells. *J. Stem Cells Regen. Med.* 13, P75–P79.

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.* 104, 9399 LP – 9403.

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, 4179–4191.

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, 99–108.

Tarbell, J.M. (2010). Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.* 87, 320–330.

Tavian, M., and Péault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 243–250.

Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H.S., Dieterlen-Lièvre, F., and Péault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* 87, 67–72.

Tavian, M., Hallais, M.F., and Peault, B. (1999). Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 126, 793 LP – 803.

Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., and Péault, 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*, 487–495.

Taylor, J., and Abdel-Wahab, O. (2017). Stem cell model of hematological diseases. In *Hematology-Basic Principles and Practice*, R. Weitz, E. Hoffman, H. Benz, and J. Heslop, eds. (Elsevier), pp. 153–160.

Taylor, C.J., Peacock, S., Chaudhry, A.N., Bradley, J.A., and Bolton, E.M. (2012). Generating an iPSC Bank for HLA-Matched Tissue Transplantation Based on Known Donor and Recipient HLA Types. *Cell Stem Cell* *11*, 147–152.

Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* *9*, 866–873.

Teichweyde, N., Horn, P.A., and Klump, H. (2017). HOXB4 Increases Runx1 Expression to Promote the de novo Formation of Multipotent Hematopoietic Cells. *Transfus. Med. Hemotherapy* *44*, 128–134.

Teichweyde, N., Kasperidus, L., Carotta, S., Kouskoff, V., Lacaud, G., Horn, P.A., Heinrichs, S., and Klump, H. (2018). HOXB4 Promotes Hemogenic Endothelium Formation without Perturbing Endothelial Cell Development. *Stem Cell Reports* *10*, 875–889.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196–199.

Themeli, M., Kloss, C.C., Ciriello, G., Fedorov, V.D., Perna, F., Gonen, M., and Sadelain, M. (2013). Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* *31*, 928–933.

Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H., and Buckner, C.D. (1975). Bone-Marrow Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *292*, 895–902.

Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 7844 LP – 7848.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998a). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.

Thomson, J.A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998b). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *282*, 1145–1148.

Thon, J.N., Mazutis, L., Wu, S., Sylman, J.L., Ehrlicher, A., Machlus, K.R., Feng, Q., Lu, S., Lanza, R., Neeves, K.B., et al. (2014). Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* *124*, 1857–1867.

Thorén, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J., and Jacobsen, S.-E.W. (2008). Kit Regulates Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *J. Immunol.* *180*, 2045 LP – 2053.

Tian, X., Woll, P.S., Morris, J.K., Linehan, J.L., and Kaufman, D.S. (2006). Hematopoietic Engraftment of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells Is Regulated by Recipient Innate Immunity. *Stem Cells* *24*, 1370–1380.

Timmermans, F., Velghe, I., Vanwalleghem, L., De Smedt, M., Van Coppennolle, S., Taghon, T., Moore, H.D., Leclercq, G., Langerak, A.W., Kerre, T., et al. (2009). Generation of T Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Zones. *J. Immunol.* *182*, 6879–6888.

Tober, J., Koniski, A., McGrath, K.E., Vemishetti, R., Emerson, R., De Mesy-Bentley, K.K.L., 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*, 1433–1441.

Tober, J., Yzaguirre, A.D., Piwarzyk, E., and Speck, N.A. (2013). Distinct temporal requirements for *Runx1* in hematopoietic progenitors and stem cells. *Dev.* *140*, 3765–3776.

Touboul, T., Hannan, N.R.F., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Santo, J. Di, et al. (2010). Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology* *51*, 1754–1765.

Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D.H. (2017). The liver. *Curr. Biol.* *27*, R1147–R1151.

Tristan, C.A., Ormanoglu, P., Slamecka, J., Malley, C., Chu, P.-H., Jovanovic, V.M., Gedik, Y., Bonney, C., Barnaeva, E., Braisted, J., et al. (2020). Robotic High-Throughput Biomanufacturing and Functional Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *BioRxiv* 2020.08.03.235242.

Trump, L.R., Nayak, R.C., Singh, A.K., Emberesh, S., Wellendorf, A.M., Lutzko, C.M., and Cancelas, J.A. (2019). Neutrophils Derived from Genetically Modified Human Induced Pluripotent Stem Cells Circulate and Phagocytose Bacteria In Vivo. *Stem Cells Transl. Med.* *8*, 557–567.

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*, 221–226.

Turpen, J.B., Knudson, C.M., and Hoefen, P.S. (1981). The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cytogenetically labeled tissue anlagen: Localization of a prospective stem cell compartment. *Dev. Biol.* *85*, 99–112.

Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., Chen, W.-C., Cheng, W.-C., and Lai, D.-M. (2011). Loss of *Cxcl12/Sdf-1* in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* *117*, 429–439.

Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., et al. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, *Flk2/Flt3* ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J. Clin. Invest.* *105*, 1013–1021.

Uenishi, G.I., Jung, H.S., Kumar, A., Park, M.A., Hadland, B.K., Mcleod, E., Raymond, M., Moskvin, O., Zimmerman, C.E., Theisen, D.J., et al. (2018). NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells.

Ueno, H., and Weissman, I.L. (2006). Clonal Analysis of Mouse Development Reveals a Polyclonal Origin for Yolk Sac Blood Islands. *Dev. Cell* *11*, 519–533.

Uhrin, P., Zaujec, J., Bauer, M., Breuss, J., Alitalo, K., Stockinger, H., Kerjaschki, D., and Binder, B.R. (2006). Podoplanin-induced platelet aggregation mediates separation of blood and lymphatic vessels. *Vascul. Pharmacol.* *45*, 190.

Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Dernbach, E., Zeiher Andreas, M., and Dimmeler, S. (2003). Relevance of Monocytic Features for Neovascularization Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *Circulation* *108*, 2511–2516.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). *Sox2* is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* *122*, 3502 LP – 3510.

Valamehr, B., Robinson, M., Abujarour, R., Rezner, B., Vranceanu, F., Le, T., Medcalf, A., Lee, T.T., Fitch, M., Robbins, D., et al. (2014). Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* *2*, 366–381.

Valgimigli, M., Rigolin, G.M., Fucili, A., Della Porta, M., Soukhomovskaia, O., Malagutti, P., Bugli, A.M., Bragotti, L.Z., Francolini, G., Mauro, E., et al. (2004). CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110, 1209–1212.

Vallot, C., Huret, C., Leseque, Y., Resch, A., Oudrhiri, N., Bennaceur-Griscelli, A., Duret, L., and Rougeulle, C. (2013). XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat. Genet.* 45, 239–241.

Vargas-Valderrama, A., Guenou, H., and Mitjavila Garcia, M.T. (2019). Short Review: Generation of Hemangiogenic Progenitors from Human Embryonic. *Stem Cells SL Cell Sci. Rep.* 2, 1–7.

Vargas-Valderrama, A., Messina, A., Mitjavila-Garcia, M.T., and Guenou, H. (2020). The endothelium, a key actor in organ development and hPSC-derived organoid vascularization. *J. Biomed. Sci.* 27, 67.

Vatine, G.D., Barrile, R., Workman, M.J., Sances, S., Barriga, B.K., Rahnama, M., Barthakur, S., Kasendra, M., Lucchesi, C., Kerns, J., et al. (2019). Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Chips Enable Disease Modeling and Personalized Medicine Applications. *Cell Stem Cell* 24, 995-1005.e6.

Vethe, H., Bjørlykke, Y., Ghila, L.M., Paulo, J.A., Scholz, H., Gygi, S.P., Chera, S., and Ræder, H. (2017). Probing the missing mature β -cell proteomic landscape in differentiating patient iPSC-derived cells. *Sci. Rep.* 7, 4780.

Villa-Diaz, L.G., Nandivada, H., Ding, J., Nogueira-De-Souza, N.C., Krebsbach, P.H., O’Shea, K.S., Lahann, J., and Smith, G.D. (2010). Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 581–583.

Visconti, R.P., Richardson, C.D., and Sato, T.N. (2002). Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8219–8224.

Visvader, J.E., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.* 12, 473–479.

Vogel, S.M., Minshall, R.D., Pilipović, M., Tirupathi, C., and Malik, A.B. (2001). Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 281.

Vogeli, K.M., Jin, S.-W., Martin, G.R., and Stainier, D.Y.R. (2006). A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature* 443, 337–339.

Wagner, D.D., and Marder, V.J. (1984). Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: Processing steps and their intracellular localization. *J. Cell Biol.* 99, 2123–2130.

Wagner, J.E., Brunstein, C.G., Boitano, A.E., Defor, T.E., McKenna, D., Sumstad, D., Blazar, B.R., Tolar, J., Le, C., Jones, J., et al. (2016). Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell* 18, 144–155.

Wakabayashi, T., Naito, H., Suehiro, J. ichi, Lin, Y., Kawaji, H., Iba, T., Kouno, T., Ishikawa-Kato, S., Furuno, M., Takara, K., et al. (2018). CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. *Cell Stem Cell* 22, 384-397.e6.

Walls, J.R., Coultas, L., Rossant, J., and Henkelman, R.M. (2008). Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo. *PLoS One* 3, 2853.

Wang, G.X., Cai, S.X., Wang, P.Q., Ouyang, K.Q., Wang, Y.L., and Xu, S.R. (2002). Shear-induced changes in endothelin-1 secretion of microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* 63, 209–217.

Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*

93, 741–753.

Wang, L., Li, L., Shojaei, F., Levac, K., Cerdan, C., Menendez, P., Martin, T., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2004). Endothelial and Hematopoietic Cell Fate of Human Embryonic Stem Cells Originates from Primitive Endothelium with Hemangioblastic Properties. *21*, 31–41.

Wang, L., Menendez, P., Shojaei, F., Li, L., Mazurier, F., Dick, J.E., Cerdan, C., Levac, K., and Bhatia, M. (2005). Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *201*, 1603–1614.

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. (1996). The CBF β subunit is essential for CBF α 2 (AML1) function in vivo. *Cell* *87*, 697–708.

Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., et al. (2011). The Histone Demethylases Jhdm1a/1b Enhance Somatic Cell Reprogramming in a Vitamin-C-Dependent Manner. *Cell Stem Cell* *9*, 575–587.

Wang, X., Yang, L., Wang, Y.C., Xu, Z.R., Feng, Y., Zhang, J., Wang, Y., and Xu, C.R. (2020). Comparative analysis of cell lineage differentiation during hepatogenesis in humans and mice at the single-cell transcriptome level. *Cell Res.* 1–18.

Wang, X.X., Zhang, F.R., Shang, Y.P., Zhu, J.H., Xie, X.D., Tao, Q.M., Zhu, J.H., and Chen, J.Z. (2007). Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells May Be Beneficial in Patients With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. A Pilot Randomized Controlled Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 1566–1571.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.

Watson, C.L., Mahe, M.M., Múnera, J., Howell, J.C., Sundaram, N., Poling, H.M., Schweitzer, J.I., Vallance, J.E., Mayhew, C.N., Sun, Y., et al. (2014a). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat. Med.* *112*, 1310–1314.

Watson, C.L., Mahe, M.M., Múnera, J., Howell, J.C., Sundaram, N., Poling, H.M., Schweitzer, J.I., Vallance, J.E., Mayhew, C.N., Sun, Y., et al. (2014b). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat. Med.* *20*, 1310–1314.

Weber, C., and Springer, T.A. (1998). Interaction of Very Late Antigen-4 with VCAM-1 Supports Transendothelial Chemotaxis of Monocytes by Facilitating Lateral Migration. *J. Immunol.* *161*, 6825 LP – 6834.

Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2016). Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 155–169.

Weksler, B.B., Marcust, A.J., and Jaffe, E.A. (1977). Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells (prostaglandin X/inhibition of platelet aggregation/thrombogenesis).

Weng, W., Sukowati, E.W., and Sheng, G. (2007). On Hemangioblasts in Chicken. *PLoS One* *2*, e1228.

Wenxuan, C., Jianhua, Z., J., de L.W., R., G.Z., Hannah, K., T., F.E., D., M.S., Trisha, T., Ziqing, L., Mitch, B., et al. (2019). An Unbiased Proteomics Method to Assess the Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ. Res.* *125*, 936–953.

Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Schiegl, T., Kosiol, S., Link, A., Walenta, K., and Nickenig, G. (2007). Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res. Cardiol.* *102*, 565–571.

WHO (2013). Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020.

Wigle, J.T., Harvey, N., Detmar, M., Lagutina, I., Grosveld, G., Gunn, M.D., Jackson, D.G., and Oliver, G. (2002). An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* *21*, 1505–1513.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* *343*, 657–659.

Williams, I.M., and Wu, J.C. (2019). Generation of endothelial cells from human pluripotent stem cells methods, considerations, and applications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *39*, 1317–1329.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* *135*, 1118–1129.

Winnik, S., Klinkert, M., Kurz, H., Zoeller, C., Heinke, J., Wu, Y., Bode, C., Patterson, C., and Moser, M. (2009). HoxB5 induces endothelial sprouting in vitro and modifies intussusceptive angiogenesis in vivo involving angiopoietin-2. *Cardiovasc. Res.* *83*, 558–565.

Wittig, O., Paez-Cortez, J., and Cardier, J.E. (2010). Liver Sinusoidal Endothelial Cells Promote B Lymphopoiesis From Primitive Hematopoietic Cells. *Stem Cells Dev.* *19*, 341–350.

Woll, P.S., Morris, J.K., Painschab, M.S., Marcus, R.K., Kohn, A.D., Biechele, T.L., Moon, R.T., and Kaufman, D.S. (2008). Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood* *111*, 122–131.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* *458*, 766–770.

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*, 2300–2311.

Workman, M.J., and Svendsen, C.N. (2020). Recent advances in human iPSC-derived models of the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS* *17*, 30.

Workman, M.J., Mahe, M.M., Trisno, S., Poling, H.M., Watson, C.L., Sundaram, N., Chang, C.-F., Schiesser, J., Aubert, P., Stanley, E.G., et al. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat. Med.* *23*, 49–59.

Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 851–864.

Woywodt, A., Bahlmann, F.H., De Groot, K., Haller, H., and Haubitz, M. (2002). Circulating endothelial cells: Life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol. Dial. Transplant.* *17*, 1728–1730.

Wu, F., Wu, D., Ren, Y., Huang, Y., Feng, B., Zhao, N., Zhang, T., Chen, X., Chen, S., and Xu, A. (2019). Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *J. Hepatol.* *70*, 1145–1158.

Wu, J., Platero-Luengo, A., Sakurai, M., Sugawara, A., Gil, M.A., Yamauchi, T., Suzuki, K., Bogliotti, Y.S., Cuello, C., Morales Valencia, M., et al. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* *168*, 473-486.e15.

Wu, Y., Hu, Z., Li, Z., Pang, J., Feng, M., Hu, X., Wang, X., Lin-Peng, S., Liu, B., Chen, F., et al. (2016). In situ genetic correction of F8 intron 22 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs. *Sci. Rep.* 6.

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001a). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 971–974.

Xu, M.J., Matsuoka, S., Yang, F.C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Eguchi, M., Asano, S., Nakahata, T., and Tsuji, K. (2001b). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* 97, 2016–2022.

Xu, Y., Shan, W., Li, X., Wang, B., Liu, S., Wang, Y., Long, Y., Tie, R., Wang, L., Cai, S., et al. (2016). A synthetic three-dimensional niche system facilitates generation of functional hematopoietic cells from human-induced pluripotent stem cells. *J. Hematol. Oncol.* 9, 1–16.

Yabe, S.G., Fukuda, S., Takeda, F., Nashiro, K., Shimoda, M., and Okochi, H. (2017). Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. *J. Diabetes* 9, 168–179.

Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell* 10, 678–684.

Yamane, T. (2018). Mouse Yolk Sac Hematopoiesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 80.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* 147, 1146–1158.

Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., Liu, P., Lian, Y., Zheng, X., Yan, J., et al. (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1131–1139.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415.

Yang, Y., García-Verdugo, J.M., Soriano-Navarro, M., Srinivasan, R.S., Scallan, J.P., Singh, M.K., Epstein, J.A., and Oliver, G. (2012). Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos. *Blood* 120, 2340–2348.

Yazdani, S., Jaldin-Fincati, J.R., Pereira, R.V.S., and Klip, A. (2019). Endothelial cell barriers: Transport of molecules between blood and tissues. *Traffic* 20, 390–403.

Ye, J., Ge, J., Zhang, X., Cheng, L., Zhang, Z., He, S., Wang, Y., Lin, H., Yang, W., Liu, J., et al. (2016). Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res.* 26, 34–45.

Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D.M., Jang, Y.Y., Dang, C. V., Spivak, J.L., Moliterno, A.R., and Cheng, L. (2009). Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114, 5473–5480.

Yeoh, J.S.G., van Os, R., Weersing, E., Ausema, A., Dontje, B., Vellenga, E., and de Haan, G. (2006). Fibroblast Growth Factor-1 and -2 Preserve Long-Term Repopulating Ability of Hematopoietic Stem Cells in Serum-Free Cultures. *Stem Cells* 24, 1564–1572.

Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonic cells. *Development* 122, 881 LP – 894.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519–523.

Yoder, M.C. (2009). Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 7 *Suppl* 1, 49–52.

Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M., and Orlic, D. (1997). Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7, 335–344.

Yoon, K.-A., Son, Y., Choi, Y.-J., Kim, J.-H., and Cho, J.-Y. (2017). Fibroblast growth factor 2 supports osteoblastic niche cells during hematopoietic homeostasis recovery after bone marrow suppression. *Cell Commun. Signal.* 15, 25.

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, 685–697.

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.* 108, 1468–1473.

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 before HSC emergence. *Blood* 119, 5706–5714.

Yoshitomi, H., and Zaret, K.S. (2004). Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development* 131, 807 LP – 817.

You, L.R., Lin, F.J., Lee, C.T., DeMayo, F.J., Tsai, M.J., and Tsai, S.Y. (2005). Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* 435, 98–104.

Yu, C., Liu, Y., Miao, Z., Yin, M., Lu, W., Lv, Y., Ding, M., and Deng, H. (2010). Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood* 116, 4786–4794.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* (80-.). 318, 1917 LP – 1920.

Zambidis, E.T., Peault, B., Park, T.S., Bunz, F., and Civin, C.I. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial , primitive , and definitive stages resembling human yolk sac development. 106, 860–870.

Zambidis, E.T., Park, T.S., Yu, W., Tam, a, Levine, M., Yuan, X., Pryzhkova, M., and Peault, B. (2008). Expression of ACE (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 112, 3601–3615.

Zambidis, E.T., Park, T.S., Yu, W., Tam, A., Levine, M., Yuan, X., Péault, B., Zambidis, E.T., Park, T.S., Yu, W., et al. (2009). stem cells Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. 3601–3614.

Zhang, J., Chu, L.F., Hou, Z., Schwartz, M.P., Hacker, T., Vickerman, V., Swanson, S., Leng, N., Nguyen, B.K., Elwell, A., et al. (2017). Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E6072–E6078.

Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 20, 1321–1326.

Zhao, Y., Fei, X., Guo, J., Zou, G., Pan, W., Zhang, J., Huang, Y., Liu, T., and Cheng, W. (2017). Induction of reprogramming of human amniotic epithelial cells into iPS cells by overexpression of

Yap, Oct4, and Sox2 through the activation of the Hippo-Yap pathway. *Exp. Ther. Med.* **14**, 199–206.

Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P., and Fishman, M.C. (2001). Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216–220.

Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J.C., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Zhuang, Q., Li, Y., et al. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat. Protoc.* **7**, 2080–2089.

Zhou, T., Tan, L., Cederquist, G.Y., Fan, Y., Hartley, B.J., Mukherjee, S., Tomishima, M., Brennand, K.J., Zhang, Q., Schwartz, R.E., et al. (2017). High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell* **21**, 274-283.e5.

Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* **21**, 3295–3313.

Zhu, Z., and Huangfu, D. (2013). Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development* **140**, 705 LP – 717.

Zhu, H., Blum, R.H., Bjordahl, R., Gaidarova, S., Rogers, P., Lee, T.T., Abujarour, R., Bonello, G.B., Wu, J., Tsai, P.F., et al. (2020). Pluripotent stem cell-derived NK cells with high-affinity noncleavable CD16a mediate improved antitumor activity. *Blood* **135**, 399–410.

Zhu, P., Bény, J.L., Flammer, J., Lüscher, T.F., and Haefliger, I.O. (1997). Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery. Role of nitric oxide and K(+) channels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 1761–1767.

Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Mehra, M., and Prescott, S.M. (1990). Endothelial cell-associated platelet-activating factor: A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* **110**, 529–540.

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**, 625–636.

Zweigerdt, R., Olmer, R., Singh, H., Haverich, A., and Martin, U. (2011). Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nat. Protoc.* **6**, 689–700.

Titre : Différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques *via* une population du type hémangioblastique

Mots clés : Cellules souches pluripotentes humaines, Cellules endothéliales, Cellules hématopoïétiques, Hémangioblaste, Ingénierie tissulaire

Résumé : Les cellules endothéliales (CE) et les cellules hématopoïétiques dérivées des cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) sont un outil prometteur pour l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et pour la découverte de nouveaux médicaments. Les CE assurent la formation des vaisseaux sanguins, tandis que les cellules hématopoïétiques matures sont impliquées dans le transport de l'oxygène, l'hémostase et la réponse immunitaire entre autres. Dans cette étude, nous avons différencié des CSPh en une population bipotente de type hémangioblastique pour générer des populations pures de ces deux lignages *in vitro*. Cette population CD144⁺CD309⁺CD34⁺CD143⁺CD31⁺ donne une population intermédiaire *in vitro*, les colonies blastiques (CB), qui exprime le marqueur CD43 à 90%. Les CB se différencient en colonies hématopoïétiques myéloïdes et érythroïdes et expriment des facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse définitive (RUNX1c, GATA2, SCL, HOXB4). D'autre part, la différenciation endothéliale du progéniteur hémangioblastique génère une population à plus de 95% de CE CD309⁺CD34⁺CD144⁺CD31⁺ fonctionnelles *in vitro*, exprimant des marqueurs spécifiques des CE artérielles et veineuses. *In vivo*, nous avons démontré que la population hémangioblastique génère une reconstitution hématopoïétique faible mais détectable chez des souris immunodéficientes. Les CE transplantées dans un modèle murin d'ischémie dans une chambre dorsale se sont incorporées à l'endothélium des vaisseaux de la souris, démontrant leur potentiel angiogénique. Enfin, et comme preuve du concept, nous avons utilisé des CE et des hépatoblastes dérivées de la lignée de CSPh dans le but de créer des organoïdes hépatiques vascularisés *in vitro*.

Title: Differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial and hematopoietic cells via a hemangioblast-like population

Keywords: Human pluripotent stem cells, Endothelial cells, Hematopoietic cells, Hemangioblast, Tissue engineering

Abstract: Endothelial cells (ECs) and hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells (hPSC) are a promising tool for tissue engineering, cell therapy and drug discovery. ECs are involved in blood vessel formation, while mature hematopoietic cells participate in oxygen transport, hemostasis and immune response. In this study, we have differentiated hPSCs into a bipotent hemangioblast-like population to generate pure populations of these two lineages *in vitro*. This CD144⁺CD309⁺CD34⁺CD143⁺CD31⁺ population gives rise to an intermediate population *in vitro*, the blast colonies (BCs), which expresses the CD43 marker at 90%. BCs differentiate into myeloid and erythroid hematopoietic colonies and express transcription factors involved in definitive hematopoiesis (RUNX1c, GATA2, SCL, HOXB4). On the other hand, endothelial differentiation of the hemangioblast-like progenitors generates a population of more than 95% of functional CD309⁺CD34⁺CD144⁺CD31⁺ ECs *in vitro*, expressing arterial and venous specific markers of ECs. *In vivo*, we showed that the hemangioblast-like population generates a low but detectable hematopoietic reconstitution in immunodeficient mice. ECs transplanted in a mouse model of ischemia on a dorsal chamber were localized in the endothelium of the mouse blood vessels, suggesting an angiogenic potential of these cells. Finally, and as a proof of concept, ECs and hépatoblasts derived from hPSCs were cocultured to generate vascularized hepatic organoids *in vitro*.

