

## Récepteurs et développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques

par Anne Eichmann, Delphine Moyon & Catherine Corbel

Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire du CNRS et du Collège de France, 49bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex. Tél. : 33-1-45 14 15 06. Fax : 33-1-48 73 43 77. e-mail: eichmann@infobiogen.fr

Reçu le 26 mars 1999

### RÉSUMÉ

Au cours du développement de l'embryon des Vertébrés, le réseau endothélial et le système hématopoïétique sont les premiers à être mis en place. Cette revue résume les avancées récentes dans la compréhension des mécanismes moléculaires responsables

des étapes successives de la mise en place de ces systèmes : la différenciation des cellules mésodermiques en cellules endothéliales et hématopoïétiques, leur prolifération et les interactions responsables de la formation du système vasculaire.

### SUMMARY Receptors and development of endothelial and hematopoietic cells

During vertebrate embryonic development, the endothelial and hemopoietic systems are the first system to be specified. In this review, we will summarize recent findings about the molecular mechanisms responsible for the successive steps of the development

of these systems: the differentiation of mesodermal cells to endothelial and hemopoietic cells, their proliferation and their interactions to form the vascular system.

### INTRODUCTION

Les premières structures vasculaires de l'embryon des Vertébrés sont les îlots sanguins du sac vitellin. Ces îlots sont formés d'une enveloppe externe de cellules endothéliales qui entourent une lumière remplie de cellules hématopoïétiques. Chez l'embryon de Poulet, ces îlots contiennent des cellules érythroïdes, visibles à l'œil nu grâce à leur couleur, à partir du stade de 5 somites. Les deux composantes cellulaires des îlots sanguins proviennent de la partie postérieure de la ligne primitive au stade de la gastrulation. A la suite de leur invagination, les cellules mésodermiques nouvellement formées migrent vers l'aire extraembryonnaire. Au cours de cette migration, certaines de ces cellules s'agrègent, constituant l'ébauche des îlots sanguins. L'anastomose de différents îlots amène ensuite à la formation du réseau vasculaire primaire.

Des études récentes ont montré que le développement de ce réseau est contrôlé par des ligands de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKS). Différents RTKS agissent à différents moments de la mise en place du réseau-

vasculaire ou sur différents types de cellules endothéliales sélectivement. Par exemple, le RTK Eph-B4 (Andres *et al.*, 1994) est exprimé spécifiquement par les veines embryonnaires, mais absent des artères, alors que son ligand, l'éphrine B2 (Bennett *et al.*, 1995; Bergemann *et al.*, 1995), est exprimé uniquement par les artères (Wang *et al.*, 1998). L'inactivation par recombinaison homologue du gène de l'éphrine B2 chez la Souris empêche le remodelage du plexus capillaire primaire en artères et en veines correctement ramifiées, ce qui induit des déficiences vasculaires au niveau de la tête et du sac vitellin (Wang *et al.*, 1998). Un autre exemple de l'hétérogénéité fonctionnelle au sein des cellules endothéliales embryonnaires est l'expression du RTK VEGFR3. Le VEGFR3 s'exprime initialement dans toutes les cellules endothéliales chez l'embryon de Souris ou de Caille, mais se restreint aux vaisseaux lymphatiques aux stades plus tardifs du développement (Kaipainen *et al.*, 1995; Kukk *et al.*, 1996; Wilting *et al.*, 1997), ce qui suggère un rôle pour ce récepteur et son ligand VEGF-C dans le développement du système vasculaire lymphatique. Effectivement des souris transgéné-

niques, qui surexpriment le VEGF-C dans la peau, développent une hyperplasie des vaisseaux lymphatiques uniquement (Jeltsch *et al.*, 1997), et l'application du VEGF-C sur la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet induit également une prolifération des cellules endothéliales lymphatiques sans affecter l'endothélium vasculaire (Oh *et al.*, 1997).

Une autre classe de RTKS spécifiques de l'endothélium, les récepteurs tie (Partanen *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1993) et leurs ligands, les angiopoïétines (Davis *et al.*, 1996; Suri *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997), régulent l'assemblage de la paroi vasculaire. Les systèmes récepteurs-ligands ci-dessus sont décrits en détail dans plusieurs revues récentes (Risau, 1997; Hanahan, 1997; Yankopoulos *et al.*, 1998; Korpelainen & Alitalo, 1998).

Parmi tous les récepteurs cités précédemment, le VEGFR2 semble être le marqueur le plus précoce du lignage endothélial (Eichmann *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1993; Dumont *et al.*, 1995; Flamme *et al.*, 1995; Wilting *et al.*, 1997). Chez les Oiseaux, le VEGFR2 s'exprime dès le stade de la gastrulation dans le mésoderme de la partie postérieure de l'embryon ainsi que dans les amas hémangioblastiques du sac vitellin (Eichmann *et al.*, 1993). Chez la Souris, l'inactivation du VEGFR2 a montré son importance dans l'émergence des deux lignages, endothélial et hématopoïétique (Shalaby *et al.*, 1995).

Sabin (1920) et Murray (1932) ont postulé l'existence d'un précurseur commun pour les lignages endothélial et hématopoïétique. Les observations décrites ci-dessus suggèraient que les cellules exprimant le VEGFR2 pourraient être des hémangioblastes. Nos recherches chez l'embryon d'Oiseau ont apporté des arguments en faveur de l'existence de cet ancêtre commun aux deux lignages; ces expériences ont été réalisées grâce à une sonde moléculaire et un anticorps monoclonal, spécifiques du VEGFR2 aviaire, que nous avons isolés (Eichmann *et al.*, 1993, 1997).

## RÉSULTATS ET PERSPECTIVES

L'anticorps dirigé contre la partie extracellulaire du récepteur VEGFR2 nous a permis de mettre au point un tri cellulaire au cytofluomètre (Eichmann *et al.*, 1997). Grâce à ce tri, nous avons isolé une population pure de cellules VEGFR2<sup>+</sup> à partir du mésoderme postérieur d'embryons de Poulet au stade de la gastrulation, population qui a été soumise à la technique des cultures clonales *in vitro*. Ces cultures ont permis de montrer que des cellules VEGFR2<sup>+</sup> peuvent se différencier en cellules endothéliales et hématopoïétiques. Dans nos conditions de culture cependant, une cellule individuelle VEGFR2 positive ne peut donner qu'un des lignages.

La différenciation endothéliale dépend de la présence de VEGF ou de VEGF-C (Eichmann *et al.*, 1997, 1998), alors que le phénotype hématopoïétique se différencie en absence de VEGF. Ces expériences peuvent s'interpréter

selon deux hypothèses : 1) pour chacun des lignages, hématopoïétique ou endothélial, des précurseurs déterminés existent, différant par l'expression d'autres molécules de surface; 2) la population est homogène et les hémangioblastes sont placés devant un choix développemental, entrer dans la voie endothéliale ou la voie hématopoïétique. Récemment, il a été démontré, chez la Souris, qu'une cellule VEGFR2 positive provenant de cellules ES (Embryonic Stem Cell) peut donner les deux types cellulaires, endothélial et hématopoïétique (Nishikawa *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1998). Il serait donc intéressant de savoir si les résultats différents obtenus chez la Souris et le Poulet sont dus à une évolution divergente des deux espèces ou aux conditions de culture.

Récemment, nous avons caractérisé les potentialités de différenciation des cellules VEGFR2 positives *in vivo*, grâce au système de chimères Caille-Poulet (Couly G., Moyon D. & Eichmann A., en préparation). Des résultats préliminaires montrent que les potentialités de différenciation de ces cellules dépendent de leur environnement embryonnaire. Si l'on greffe des cellules VEGFR2<sup>+</sup> dans le sac vitellin, elles donnent de l'endothélium et des cellules hématopoïétiques, tout comme en culture clonale. En revanche, si les cellules sont greffées au niveau troncal, elles participent à la formation de cellules endothéliales, mais la différenciation hématopoïétique n'est pas observée. Enfin, si elles sont greffées dans la région céphalique, elles fournissent d'autres types cellulaires en plus de l'endothélium. Ces résultats démontrent la plasticité potentielle du développement des cellules VEGFR2<sup>+</sup> précoces.

Afin d'identifier les facteurs responsables des différentes voies de différenciation de ces cellules, nous cherchons à isoler des gènes spécifiques de la population VEGFR2 positive, en utilisant une technique d'hybridation soustractive. Environ 500 clones candidats ont été obtenus et sont en cours d'analyse par séquençage et par hybridation *in situ*. Nous avons l'intention de tester la fonction de ces gènes *in ovo*, en utilisant la technique d'électroporation *in ovo*, décrite par Sakamoto *et al.* (1998).

## BIBLIOGRAPHIE

- Andres A. C., Reid H. H., Zurcher G., Blaschke R. J., Albrecht D. & Ziemiecki A., Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene*, 1994, 9, 1461-1467.
- Bennett B. D., Zeigler F. C., Gu Q., Fendly B., Goddard A. D., Gillett N. & Matthews W., Molecular cloning of a ligand for the Eph-related protein-tyrosine kinase Htk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 1866-1870.
- Bergemann A. D., Cheng H. J., Brambilla R., Klein R. & Flanagan J. G., ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 4921-4929.
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J. C. & Keller G., A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998, 125, 725-732.

- Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C. & Yancopoulos G. D., Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the tie-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 1996, 87, 1161-1169.
- Dumont D., Fong G. H., Puri M. C., Gradwohl G., Alitalo K. & Breitman M. L., Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev. Dyn.*, 1995, 203, 80-92.
- Eichmann A., Marcelle C., Breant C. & Le Douarin N. M., Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech. Dev.*, 1993, 42, 33-48.
- Eichmann A., Corhel C., Nataf V., Vaigot P., Bréant C. & Le Douarin N. M., Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 5141-5146.
- Eichmann A., Corbel C., Jaffredo T., Bréant C., Joukov V., Kumar V., Alitalo K. & Le Douarin N. M., Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development*, 1998, 125, 743-752.
- Flamme I., Breier G. & Risau W., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev. Biol.*, 1995, 169, 699-712.
- Hanahan D., Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 1997, 277, 48-50.
- Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R.K. & Alitalo K., Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 1997, 276, 1423-1425.
- Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., Van Hinsbergh V. W., Fang G. H., Dumont D., Breitman M. & Alitalo K., Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 3566-3570.
- Korpelainen E. I. & Alitalo K., Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10, 159-164.
- Kukk E., Lymboussaki A., Taira S., Kaipainen A., Jeltsch M., Joukov V. & Alitalo K., VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 1996, 122, 3829-3837.
- Maisonpierre P. C., Suri C., Jones P. F., Bartunkova S., Wiegand S. J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T. H., Papadopoulos N., Daly T. J., Davis S., Sato T. N. & Yancopoulos G. D., Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science*, 1997, 277, 55-60.
- Millauer B., Wizigmann-Voos S., Schnürch H., Martinez R., Moller N. P., Risau W. & Ullrich A., High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 1993, 72, 835-846.
- Murray P. D. F., The development *in vitro* of blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc. B.*, 1932, III, 497-521.
- Nishikawa S. I., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N. & Kodama H., Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK-1<sup>+</sup>VE-cadherin<sup>+</sup> cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, 125, 1747-1757.
- Oh S. J., Jeltsch M. M., Birkenhager R., McCarthy J. E., Weich H. A., Christ B., Alitalo K. & Wilting J., VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.*, 1997, 188, 96-109.
- Partanen J., Armstrong E., Mäkelä T. M., Korhonen J., Sandberg M., Renkonen R., Knuutila S., Huebner K. & Alitalo K., A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, 12, 1698-1707.
- Risau W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386, 671-674.
- Sabin F. R., Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib. Embryol. Carnegie Institute. Pub.*, 1920, 9-36, 214-262.
- Sakamoto K., Nakamura H., Tagaki M., Takeda S. & Katsube K., Ectopic expression of lunatic fringe leads to downregulation of serrate-1 in the developing chick neural tube: analysis using *in ovo* electroporation transfection technique. *FEBS Letters*, 1998, 426, 337-341.
- Sato T. N., Qin Y., Kazak C. A. & Audus K. A., Tie-1 and Tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 9355-9358.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L. & Schuh A.C., Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature*, 1995, 376, 62-66.
- Suri C., Jones P. F., Maisonpierre P. C., Davis S., Sato T. N. & Yancopoulos G. D., Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996, 87, 1171-1180.
- Wang H. U., Chen Z. F. & Andersen D., Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 1998, 93, 741-753.
- Wilting J., Eichmann A. & Christ B., Expression of avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. *Cell Tissue Res.*, 1997, 288, 207-223.
- Yamaguchi T. P., Dumont D. J., Conlon R. A., Breitman M. L. & Rossant J., flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 1993, 118, 489-498.
- Yancopoulos G. D., Klagsbrun M. & Folkman J., Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*, 1998, 93, 661-664.