

Manipulation des potentialités angiopoïétique/hémangiopoïétique chez l'embryon d'oiseau

Luc Pardanaud* et Françoise Dieterlen-Lièvre

Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du CNRS et du Collège de France, 49 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne cedex, France

* auteur pour la correspondance : Tél : 01 45 14 15 15. Fax : 01 48 73 43 77. E-mail : pardanaud@infobiogen.fr

(Reçu le 17 mars 1999)

RÉSUMÉ

L'hypothèse selon laquelle les lignages endothélial et hématopoïétique auraient une origine commune est postulée depuis longtemps. Dans le modèle des chimères caille-poulet nous avons montré que deux territoires mésodermiques produisent des progéniteurs endothéliaux : le somite produit uniquement des angioblastes (potentialité angiopoïétique) tandis que le mésoderme splanchnopleural donne naissance à des progéniteurs à double potentialité, endothéliale et hématopoïétique (potentialité hémangiopoïétique). Cette potentialité hémangiopoïétique est définie par la capacité de précurseurs greffés en position dorsale à migrer vers le plancher endothélial de l'aorte et à participer aux bourgeonnements hématopoïétiques qui y ont lieu (voir Jaffredo *et al.* dans ce volume).

Nous avons mis au point un test *in vivo* basé sur la mise en évidence de cette capacité dans le système des chimères caille-poulet, où les cellules endothéliales et hématopoïétiques de caille sont révélées grâce à l'anticorps monoclonal QH1, spécifique de ces lignages dans l'espèce caille.

Un contact transitoire avec de l'endoderme ou de l'ectoderme modifie le comportement des cellules

issues du mésoderme traité et l'effet de ces feuillets germinaux peut être mimé par des traitements avec plusieurs facteurs de croissance, VEGF, FGFB, TGF β 1, EGF et TGF α , connus pour leur implication dans l'émergence et la prolifération des cellules endothéliales et/ou dans les processus d'hématopoïèse.

L'endoderme induit une potentialité hémangiopoïétique dans le mésoderme associé : l'association de mésoderme somitique ou somatopleural avec ce feuillet promeut la pénétration des cellules QH1⁺ dans le plancher de l'aorte et leur participation aux bourgeonnements hématopoïétiques. L'induction de la potentialité hémangiopoïétique est reproduite par VEGF, FGFB et TGF β 1. A l'inverse, un contact avec l'ectoderme ou des traitements par EGF et TGF α abolissent entièrement la potentialité hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural qui produit alors des angioblastes incapables de gagner le plancher de l'aorte. Nous postulons donc que deux gradients modulent la potentialité angiopoïétique/hémangiopoïétique du mésoderme, un gradient inducteur, ventral, issu de l'endoderme, et un gradient inhibiteur, dorsal, issu de l'ectoderme.

SUMMARY Manipulation of angiopoietic/hemangiopoietic potentials in the avian embryo

The hypothesis that the endothelial and hemopoietic lineages have a common ontogenic origin is currently being revived. We have shown previously by means of quail/chick transplantations that two subsets of the mesoderm give rise to endothelial precursors: a dorsal one, the somite, produces pure angioblasts (angiopoietic potential), while a ventral one, the splanchnopleural mesoderm, gives rise to progenitors with a dual endothelial and hemopoietic potential (hemangiopoietic potential).

To investigate the cellular and molecular controls of the angiopoietic/hemangiopoietic potential, we

devised an *in vivo* assay based on the polarized homing of hemopoietic cell precursors to the floor of the aorta detectable in the quail/chick model. In the present work, quail mesoderm was grafted, after various pretreatments, onto the splanchnopleure of a chick host; the homing pattern and nature of graft-derived cells were analyzed thereafter using the QH1 monoclonal antibody which recognizes both quail endothelial and hemopoietic lineages. We report that transient contact with endoderm or ectoderm could change the behavior of cells derived from treated mesoderm, and that the effect of these germ layers

could be mimicked by treatment with several growth factors VEGF, bFGF, TGF β 1, EGF and TGF α , known to be involved in endothelial commitment and proliferation, and/or hemopoietic processes.

The endoderm induced a hemangiopoietic potential in the associated mesoderm. Indeed, the association of paraxial or somatopleural mesoderm with endoderm promoted the "ventral homing" and the production of hemopoietic cells from mesoderm not normally endowed with this potential. The hemangiopoietic induc-

tion by endoderm could be mimicked by VEGF, bFGF and TGF β 1. In contrast, a contact with ectoderm or EGF/TGF α treatments totally abrogated the hemangiopoietic capacity of the splanchnopleural mesoderm which produced pure angioblasts with no "ventral homing" behavior. We postulate that two gradients, one positive and one negative, modulate the angiopoietic/hemangiopoietic potential of the mesoderm.

INTRODUCTION

Au cours de l'ontogenèse précoce du système sanguin, les cellules endothéliales (CE) et les cellules hématopoïétiques (CH) sont étroitement associées notamment au niveau des îlots sanguins et de l'aorte. Ces relations anatomiques ont conduit les auteurs à postuler l'existence d'un ancêtre commun, l'hémangioblaste (Murray, 1932). Des résultats récents sont en faveur de cette hypothèse : chez la Souris, la délétion de plusieurs gènes bloque le développement des deux lignages (George *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1993 ; Dickson *et al.*, 1995 ; Shalaby *et al.*, 1995 ; Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara *et al.*, 1996 ; Oshima *et al.*, 1996) ; chez l'Oiseau, des cellules triées à partir de jeunes gastrulas sur la base de l'expression du récepteur 2 du VEGF (flk1) ont la capacité de donner soit des CE, soit des CH (Eichmann *et al.*, 1997).

Nous avons, par le passé, étudié les relations entre CE et CH au moyen des chimères caille-poulet (Pardanaud *et al.*, 1989 ; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993a ; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993b ; Pardanaud *et al.*, 1996 ; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999) en nous focalisant particulièrement sur un processus hématopoïétique restreint au plancher de l'aorte de 3-4 jours (E3-E4) où des bourgeonnements de CH sont responsables de la production des cellules souches hématopoïétiques intraembryonnaires (revue dans Dieterlen-Lièvre, 1997 ; Jaffredo *et al.* dans ce volume).

Chez l'Oiseau, nous avons montré que deux lignages endothéliaux participent à la formation de l'aorte (Pardanaud *et al.*, 1996). Le premier, purement endothélial, dérive du somite : ce lignage qui migre en parallèle avec les myoblastes au sein du mésoderme de la paroi du corps (lamelle latérale somatopleurale), édifie le toit et les côtés de l'aorte. Le deuxième lignage, dérivé du mésoderme splanchnopleural, vascularise les viscères (Pardanaud *et al.*, 1989 ; Pardanaud *et al.*, 1996) et est impliqué dans la formation du plancher de l'aorte où il possède la double potentialité, endothéliale et hématopoïétique (Pardanaud *et al.*, 1996). Ces différentes capacités ont été déterminées en substituant des somites de Poulet par des somites ou du mésoderme splanchnopleural de Caille (Pardanaud *et al.*, 1996). Dans ces expériences, les CE et les CH produites par les greffons sont identifiées dans l'hôte au moyen de l'anticorps monoclonal QH1 spécifique de ces lignages chez l'espèce

Caille mais qui ne reconnaît aucune de ces cellules chez le Poulet (Pardanaud *et al.*, 1987).

Si des facteurs de transcription, tel que SCL/Tal (Drake *et al.*, 1998 ; Liao *et al.*, 1998 ; Visvader *et al.*, 1998), impliqués durant les stades précoces du développement du système sanguin commencent à être identifiés, les contrôles cellulaires et moléculaires qui régissent ce processus sont encore inconnus. L'hypothèse d'un rôle inducteur de l'endoderme sur l'érythropoïèse primitive (Wilt, 1965 ; Miura & Wilt, 1969, 1970 ; Kessel & Fabian, 1987 ; Pardanaud *et al.*, 1989 ; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993a ; Pardanaud *et al.*, 1996) et la différenciation cardiovasculaire (Fishman & Chien, 1997) a été posée. Il faut noter que, dans les territoires embryonnaires possédant la double potentialité endothéliale et hématopoïétique, c'est à dire le sac vitellin, l'aorte et l'allantoïde (Caprioli *et al.*, 1998), le mésoderme splanchnopleural est intimement lié à l'endoderme (Kessel & Fabian, 1986 ; Flamme, 1989). Récemment, nous avons montré, en étudiant les contrôles cellulaires et moléculaires susceptibles d'affecter le potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999), qu'un contact transitoire avec de l'endoderme ou de l'ectoderme peut modifier le comportement du mésoderme associé et que l'effet de ces feuilletts germinaux peut être reproduit avec des facteurs de croissance, VEGF, FGFb, TGF β 1, EGF et TGF α connus pour leur implication dans l'émergence et la prolifération des CE et/ou des CH (Schreiber *et al.*, 1986 ; Stewart *et al.*, 1989 ; Flamme & Risau, 1992 ; Dickson *et al.*, 1995 ; Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara *et al.*, 1996).

Nous avons mis au point, dans le système caille-poulet, un test *in vivo* basé sur la capacité de certains progéniteurs à gagner le plancher de l'aorte. En fonction de leur potentiel, les progéniteurs issus des greffons envahissent seulement la paroi du corps et le toit de l'aorte, ou bien pénètrent également dans les viscères et le plancher de l'aorte où ils participent aux bourgeonnements hématopoïétiques (Pardanaud *et al.*, 1996). L'analyse de ces expériences avec QH1, réalisée deux jours après la greffe, nous permet de définir un potentiel angiopoïétique lorsque les CE se restreignent aux territoires dorsaux de l'hôte mais ne pénètrent pas dans le plancher de l'aorte, et un potentiel hémangiopoïétique lorsque les cellules QH1⁺ sont capables de participer à l'endothélium ventral de l'aorte ainsi qu'aux CH qui bourgeonnent dans la lumière du vaisseau.

Nos résultats récents (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999) montrent : 1) qu'un contact bref avec l'endoderme respécifie le mésoderme axial ou somatopleural en mésoderme splanchnopleural en induisant un potentiel hémangiopoïétique au sein du mésoderme associé ; 2) que l'effet de l'endoderme est mimé par le VEGF, le FGFb et le TGF β 1 ; 3) que l'ectoderme ainsi que l'EGF ou le TGF α restreignent la capacité hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural au potentiel angiopoïétique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Embryons

Les différents territoires mésodermiques à tester sont prélevés chez des embryons de Caille (*Coturnix coturnix japonica*) puis greffés chez des embryons de Poulet (*Gallus gallus* souches JA57 ou White Leghorn). Les embryons de Caille donneurs sont incubés 48 à 72 h, les embryons de Poulet donneurs et hôtes 48 h, les embryons hôtes ayant entre 8 et 25 paires de somites.

Préparation des explants

Le prélèvement des différents territoires mésodermiques de caille a été décrit précédemment (Pardanaud *et al.*, 1996). L'endoderme et l'ectoderme de poulet prélevés à partir de l'aire pellucide sont disséqués mécaniquement avec un micro-scalpel.

Cultures organotypiques

Avant d'être greffés, les tissus sont cultivés une nuit sur un milieu semi-solide (Wolf & Haffen, 1952). Le milieu de culture est composé de 600 μ l de jus d'embryons, 600 μ l de solution de Tyrode, 200 μ l de pénicilline-streptomycine (10 000 U/ml) et 1 400 μ l d'agar (à 1 % dans PBS). Pour étudier l'effet de l'endoderme ou de l'ectoderme, ces tissus sont mis en contact avec des fragments de différents territoires mésodermiques. Pour tester l'effet des facteurs de croissance, le milieu de base est enrichi avec l'un d'entre eux : VEGF recombinant humain (5 ng/ml, 70 ng/ml, 100 ng/ml ou 500 ng/ml), FGFb recombinant humain (1 ng/ml, 20 ng/ml ou 200 ng/ml), TGF β 1 recombinant humain (10 pg/ml, 50 pg/ml ou 1 ng/ml), EGF recombinant humain ou murin (1 ng/ml, 10 ng/ml ou 100 ng/ml), TGF α recombinant humain (1 ng/ml, 10 ng/ml ou 100 ng/ml). Pour chaque facteur de croissance, les concentrations testées se rapportent à des études antérieures (Flamme & Risau, 1992 ; Mews & Meyer, 1993) ou aux directives des fournisseurs.

Greffes

Après avoir réalisé un fond noir sous l'embryon de poulet hôte au moyen d'encre de Chine diluée dans du PBS, les explants sont insérés sur la splanchnopleure au sein du coelome en formation entre le 8^e et le 20^e somite,

un niveau qui correspond à la future localisation des bourgeonnements hématoïétiques dans l'aorte (Pardanaud *et al.*, 1996 ; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999).

Immunohistochimie

Les hôtes sont sacrifiés deux jours après la greffe, fixés dans du liquide de Bouin ou de Carnoy et inclus dans la paraffine. Le protocole d'immunohistochimie avec QH1 a été décrit précédemment (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993a). Parfois un double marquage est réalisé avec l'anticorps monoclonal QCPN qui reconnaît tous les noyaux des cellules de Caille (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999).

RÉSULTATS

La greffe d'explants sur la splanchnopleure hôte (Fig. 1) nous permet d'insérer plus de matériel que lors d'une substitution de somites (Pardanaud *et al.*, 1996). Les résultats montrent que ce type de greffe latérale ne modifie en rien la distribution et le comportement des cellules QH1⁺ issues des tissus de caille transplantés, que ce soit dans le cas du mésoderme paraxial (plaque segmentaire et somite) ou du mésoderme latéral (somatopleural et splanchnopleural). C'est ainsi que la migration des précurseurs est indépendante de leur localisation d'origine mais est déterminée par des propriétés intrinsèques. Les mésodermes paraxial et somatopleural produisent des CE qui envahissent la région dorsale de l'embryon hôte (Fig. 2), participent à l'endothélium du toit de l'aorte mais ne peuvent pas pénétrer dans les viscères ni dans l'aorte ventrale (Tableau I) ; les cellules progénitrices QH1⁺ issues du mésoderme splanchnopleural ont une capacité invasive ubiquitaire, elles colonisent les organes internes, intègrent l'endothélium du plancher de l'aorte (Fig. 3) et participent aux bourgeonnements hématoïétiques (Tableau I).

Pour rechercher les facteurs cellulaires et moléculaires qui interviennent dans le contrôle du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique, nous avons cherché, soit à induire le potentiel hémangioblastique au sein des mésodermes paraxial et somatopleural, soit à restreindre ce potentiel dans le mésoderme splanchnopleural. Le critère pris en compte pour analyser la manipulation du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique est la présence ou l'absence de cellules QH1⁺ dans le plancher de l'aorte, les cas où des cellules QH1⁺ (endothéliales et/ou hématoïétiques) se retrouvent dans ce territoire étant considérés comme positifs (Tableaux I et II).

L'endoderme induit une capacité hémangiopoïétique dans le mésoderme associé

Parmi les facteurs environnementaux pouvant influencer la potentialité angiopoïétique/hémangiopoïétique, l'endoderme qui est en contact étroit avec le mésoderme splanchnopleural est un bon candidat.

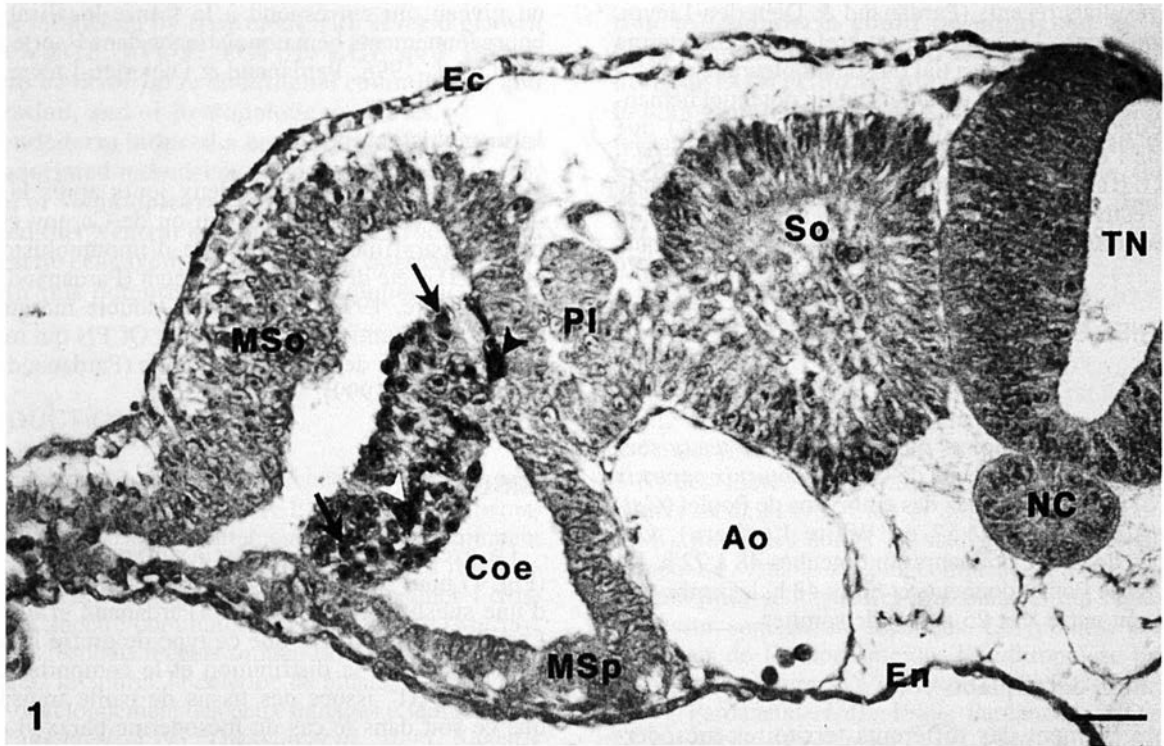


FIG. 1. – Coupe transversale d'un embryon de Poulet (E2) 3 heures après la greffe d'un fragment de mésoderme de Caille sur la splanchnopleure. Double marquage QH1/QCPN. Le greffon de caille identifiable grâce au marqueur nucléaire QCPN (flèches) est inséré dans le coelome (Coe) de l'hôte entre le mésoderme somatopleural (MSO) et le mésoderme splanchnopleural (MSp). Des CE QH1⁺ (têtes de flèche) sont présentes au sein du greffon et à sa périphérie. Ao : aorte; Ec : ectoderme; En : endoderme; NC : notochorde; So : somite; TN : tube nerveux; barre : 20 μ m.

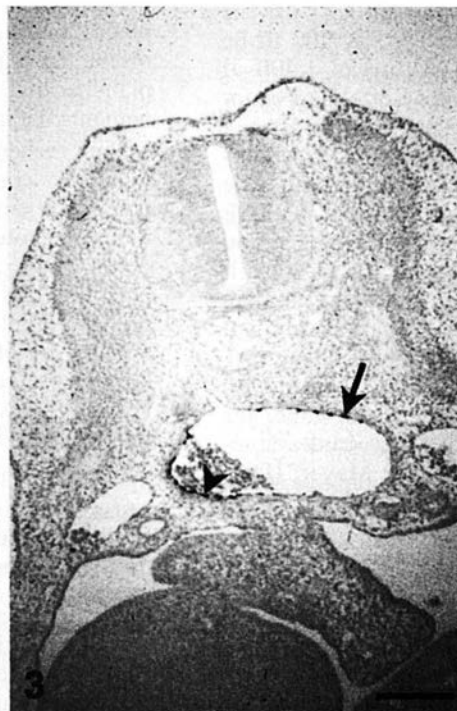
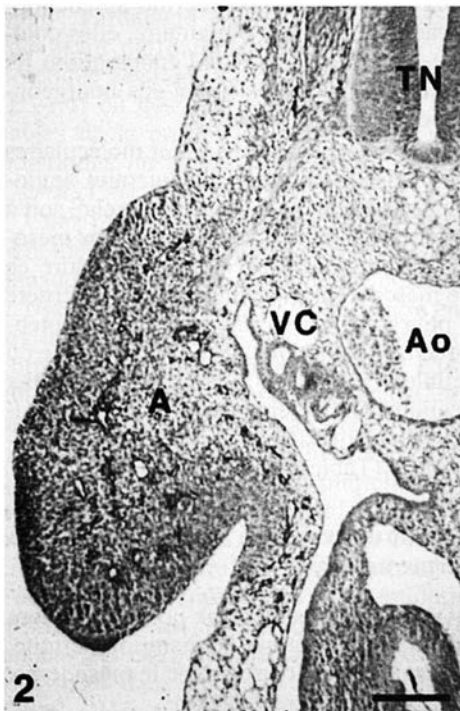


FIG. 2. – Coupe transversale d'un embryon de Poulet (E3,5) ayant reçu la greffe de somites de Caille deux jours auparavant. Marquage QH1. Les CE QH1⁺ issues des somites greffés, restreintes au coté opéré, se distribuent dans les territoires dorsaux de l'hôte, autour du tube nerveux (TN), de la veine cardinale (VC), dans l'aile (A) et la paroi. Sur d'autres coupes du même embryon des CE QH1⁺ gagnent également l'endothélium dorsolatéral de l'aorte (Ao). Barre : 100 μ m.

FIG. 3. – Coupe transversale d'un embryon de Poulet (E3,5) ayant reçu la greffe de mésoderme splanchnopleural de Caille deux jours auparavant. Marquage QH1. Sur cette coupe, au niveau de l'aorte des CE QH1⁺ participent à l'endothélium du toit (flèche) et surtout du plancher de l'aorte (tête de flèche). Barre : 100 μ m.

Tableau I. – Inducteurs du potentiel hémangiopoïétique.

Explants de caille greffés	Cellules QH1 ⁺ dans les structures dorsales	Cellules QH1 ⁺ dans l'aorte ventrale	
		Cellules endothéliales	Cellules hématoopoïétiques
Mésoderme somatopleural ou somitique	100 % (30/30*)	3 % (1/30)	0 % (0/30)
Mésoderme splanchnopleural	100 % (15/15)	80 % (12/15)	47 % (7/15)
Mésoderme somatopleural ou somitique traité avec	milieu de base	100 % (25/25)	4 % (1/25)
	endoderme de poulet	100 % (39/39)	56 % (22/39)
	VEGF (5 à 500 ng/ml)	100 % (46/46)	80 % (37/46)
	FGFb (1 à 200 ng/ml)	100 % (37/37)	57 % (21/37)
	TGF β1 (10 pg à 1 ng/ml)	100 % (34/34)	56 % (19/34)
			24 % (8/34)

* Nombre de cas positifs/nombre total de cas.

Tableau II. – Inhibiteurs du potentiel hémangiopoïétique.

Explants de caille greffés		Cellules QH1 ⁺ dans les structures dorsales	Cellules QH1 ⁺ dans l'aorte ventrale	
			Cellules endothéliales	Cellules hématoopoïétiques
Mésoderme somatopleural traité avec	EGF (1 à 100 ng/ml)	100 % (5/5*)	0 % (0/5)	0 % (0/5)
	TGFα (1 à 100 ng/ml)	100 % (5/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)
Mésoderme splanchnopleural traité avec	ectoderme de poulet	100 % (25/25)	8 % (2/25)	0 % (0/25)
	EGF (1 à 100 ng/ml)	100 % (26/26)	15 % (4/26)	4 % (1/26)
	TGFα	100 % (16/16)	19 % (3/16)	6 % (1/16)

* Nombre de cas positifs/nombre total de cas.

Nous avons testé l'effet de l'endoderme soit sur du mésoderme paraxial, soit sur du mésoderme somatopleural qui normalement ne produit aucune CE et est colonisé par des précurseurs vasculaires somitiques à destinée dorsale et sans capacité hématoopoïétique (Paradaud *et al.*, 1996).

A E2, du mésoderme axial ou somatopleural de caille a été associé transitoirement à de l'endoderme embryonnaire de poulet (E2) avant que le mésoderme ne soit greffé dans le coelome d'un poulet hôte de E2 (Fig. 4). Dans ces conditions, des CE originaires du greffon migrent au sein de l'endothélium ventral de l'aorte et participent aux bourgeonnements hématoopoïétiques (Tableau I). Des greffes témoins de mésoderme paraxial ou somatopleural non induit ne montrent ni CE ni CH dans le plancher de l'aorte (Tableau I).

Il apparaît donc que l'endoderme a un rôle inducteur sur la capacité hémangiopoïétique du mésoderme associé.

Des facteurs de croissance miment l'effet de l'endoderme

L'étape suivante a été de rechercher des molécules qui, dans le feuillet endodermique, pourraient être res-

ponsables de l'induction hémangiopoïétique. Nous avons donc essayé de mimer l'effet de l'endoderme avec des facteurs de croissance. Trois molécules, dont, pour certaines, l'expression au niveau du messager et/ou de la protéine a été montrée dans l'endoderme et dont les implications dans les processus de vascularisation et/ou d'hématoopoïèse ont été démontrées (Flamme & Risau, 1992; Gordon-Thomson & Fabian, 1994; Sanders *et al.*, 1994; Dickson *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1995; Flamme *et al.*, 1995a; Shalaby *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Oshima *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1997; Beck & D'Armour, 1997; Eichmann *et al.*, 1997), ont été testées : le VEGF, le FGF basique et le TGFβ1.

Du mésoderme paraxial ou somatopleural de caille, prélevé à E2 ou à E3, est cultivé pendant 12 à 36 h sur un milieu gélosé contenant ou non l'un des facteurs, avant d'être greffé dans le coelome d'un hôte poulet (Fig. 4). Chacune de ces trois molécules est capable, à des concentrations physiologiques, d'induire la participation des CE, issues du greffon, à l'endothélium aortique ventral, ainsi qu'aux bourgeonnements hématoopoïétiques (Fig. 5, Tableau I). Si l'effet inducteur est plus reproductible avec le VEGF (75 % des cas) qu'il ne l'est avec le FGFb ou le TGFβ1 (50 % des cas), il est,

**Endoderme de poulet
+ mésodermes somatopleural ou
somitique de caille**



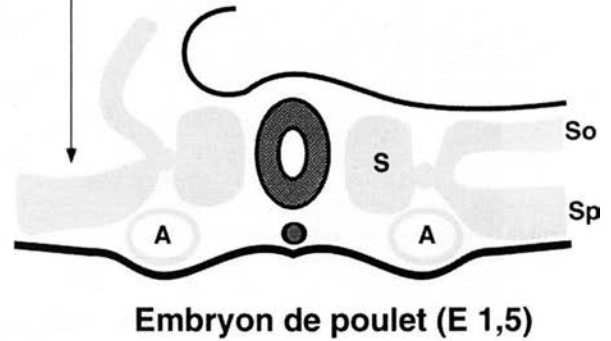
Une nuit d'association

**Mésodermes somatopleural
ou somitique de caille**



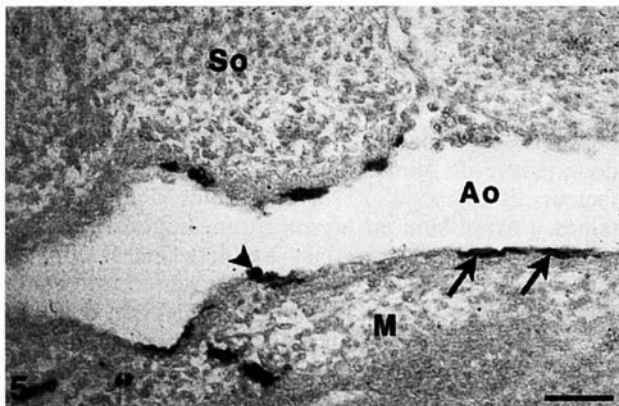
Une nuit

**Mésodermes
somatopleural ou
somitique de caille**



Embryon de poulet (E 1,5)

FIG. 4. – Représentation schématique du protocole réalisé pour tester l'effet de l'endoderme ou de facteurs de croissance sur les mésodermes somatopleural et somitique.



FIGS 5 et 6. – Colonisation du plancher de l'aorte par des cellules de Caille issues de mésoderme somatopleural, non hémangiopoïétique, traité par des facteurs de croissance. Coupes longitudinales. Marquage QH1.

FIG. 5. – Induction par du VEGF. L'embryon hôte a 3,5 jours. Des CE QH1⁺ envahissent le mésentère dorsal (M), le toit et le plancher de l'aorte (Ao; flèches). A ce niveau, une CH QH1⁺ (tête de flèche) bourgeonne dans la lumière du vaisseau. So : somite; barre : 20 μ m.

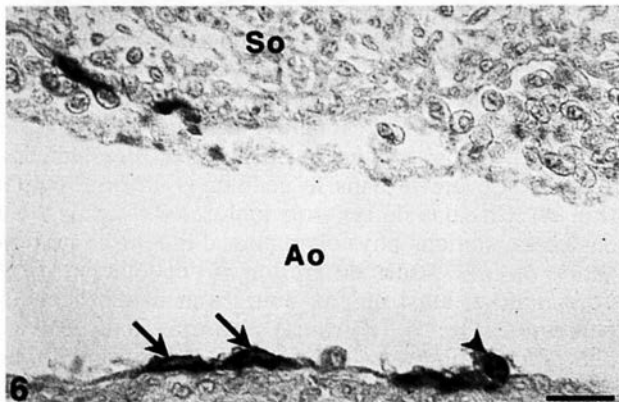


FIG. 6. – Induction par du FGFb. L'embryon hôte a 3,5 jours. Des CE QH1⁺ (flèches) et une CH QH1⁺ (tête de flèche) sont présentes dans l'endothélium ventral de l'aorte (Ao). So : somite; barre : 20 μ m.

dans tous les cas, significatif par comparaison avec les greffes témoins (Tableau I).

Ces résultats montrent que le VEGF, le FGFb et le TGF β 1 peuvent mimer l'effet de l'endoderme en ce qui concerne l'induction hémangiopoïétique. Ces molécules sont donc capables de spécifier la capacité angiopoïétique du mésoderme somatopleural ou somitique en un potentiel hémangiopoïétique qui normalement est propre au mésoderme splanchnopleural.

Un contact avec l'ectoderme abolit le potentiel hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural

Dans une même approche, nous avons recherché s'il était possible d'inhiber la capacité hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural. Nous avons testé l'effet de l'ectoderme connu pour induire une zone avasculaire dans le bourgeon de membre (Feinberg *et al.*, 1983 ; Wilson *et al.*, 1989). Lorsque du mésoderme splanchnopleural de caille est associé transitoirement à de l'ectoderme de poulet avant d'être greffé dans un hôte poulet, celui-ci perd sa potentialité hémangiopoïétique et sa capacité à produire des CE est réduite. Les CE QH1⁺, issues du greffon, envahissent les territoires dorsaux de l'hôte, participent à l'endothélium dorso-latéral de l'aorte mais ne sont plus capables de pénétrer au sein de l'endothélium aortique ventral ni de fournir les CH qui bourgeonnent dans la lumière du vaisseau (Tableau II).

L'effet de l'ectoderme peut être reproduit par un traitement avec de l'EGF ou du TGF α

Dans le but de mimer l'effet de l'ectoderme, nous avons choisi de tester l'EGF et le TGF α , deux molécules qui partagent le même récepteur et qui sont exprimées dans certaines cellules ectodermiques. De plus, il a été montré, chez le Porc, que l'EGF s'exprime dans le mésoderme de l'amnios, une annexe embryonnaire totalement avasculaire (Vaughan *et al.*, 1992).

Du mésoderme splanchnopleural de caille a été cultivé transitoirement sur un milieu semi-solide enrichi avec de l'EGF ou avec du TGF α avant d'être greffé dans un embryon de Poulet. Dans ces expériences, les CE issues du greffon ne peuvent pénétrer dans l'endothélium aortique ventral, ni participer aux bourgeonnements hémangiopoïétiques (Tableau II).

Il apparaît donc que, comme l'ectoderme, l'EGF et le TGF α abolissent la capacité hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural en modifiant la destinée des cellules QH1⁺ émigrantes.

DISCUSSION

Nos expériences de manipulations du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique ont donc conduit à modifier et même à inverser ces capacités en réalisant soit des associations entre différents territoires mésodermiques avec de l'endoderme ou de l'ectoderme, soit en traitant

ces régions du mésoderme par des facteurs de croissance. Nos résultats établissent que l'architecture embryonnaire modèle le système sanguin (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999).

Des données de la littérature ont mis en évidence un rôle trophique de l'endoderme sur l'émergence des CE et des CH dans le mésoderme, mais n'ont pas permis de conclure à une véritable induction. En revanche nos tests *in vivo* ont montré que l'endoderme doit avoir un rôle instructeur dans la mesure où il induit l'acquisition d'un potentiel nouveau au sein du mésoderme somatopleural ou somitique.

Afin d'appréhender les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'effet de l'endoderme, nous avons sélectionné des facteurs de croissance exprimés dans ce feuillet. Les messagers du VEGF sont détectés précocement dans l'endoderme (Breier *et al.*, 1995 ; Dumont *et al.*, 1995 ; Flamme *et al.*, 1995a) et l'un de ses récepteurs, flk1, est transcrit dans le mésoderme dès l'initiation de la gastrulation (Eichmann *et al.*, 1993 ; Millauer *et al.*, 1993). Les souris VEGF-/- meurent *in utero* des suites d'une désorganisation importante des lignages endothélial et hématopoïétique (Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara *et al.*, 1996). Flk1 est indispensable à l'établissement et/ou à la croissance du lignage endothélial (Shalaby *et al.*, 1995) et, chez le Poulet, des cellules flk1⁺ triées à partir de blastulas ont la capacité de donner *in vitro* des CE ou des colonies hématopoïétiques (Eichmann *et al.*, 1997). A des stades plus tardifs, l'injection de VEGF conduit à accroître la densité du réseau endothélial et à l'apparition de vaisseaux dans des territoires normalement avasculaires (Drake & Little, 1995 ; Flamme *et al.*, 1995b).

En ce qui concerne le rôle du FGFb, des expériences *in vitro* ont montré que ce facteur promeut la différenciation des îlots sanguins, l'émergence de CE flk1⁺ (Flamme & Risau, 1992) et la synthèse d'hémoglobine (Gordon-Thomson & Fabian, 1994).

Les souris TGF β 1-/- ont un sac vitellin dont l'architecture vasculaire est anormale en raison de mauvaises connections entre les CE et les cellules mésodermiques et de la présence de capillaires distendus (Dickson *et al.*, 1995). Les souris TGF β 1R2-/- meurent aussi *in utero* en raison de défauts dans les processus de vasculogénèse et d'hématopoïèse (Oshima *et al.*, 1996). Chez les Oiseaux, bien que les transcrits et la protéine TGF β 1 soient détectés dans l'endoderme et le mésoderme (Sanders *et al.*, 1994), *in vitro* cette molécule ne semble pas impliquée dans l'émergence de CE et de CH à partir de suspensions cellulaires de blastulas (Flamme & Risau, 1992).

Dans notre protocole expérimental, chacun de ces trois facteurs peut conférer un potentiel hémangiopoïétique aux progéniteurs issus des mésodermes somitique ou somatopleural, cette induction étant plus importante avec le VEGF dont l'efficacité est même supérieure à celle de l'endoderme.

Le rôle de l'ectoderme dans le développement du bourgeon de membre est bien connu (Tabin, 1995 ; Tickle, 1995). Il y induit une zone avasculaire dans le mésoderme sous-jacent (Feinberg *et al.*, 1983 ; Wilson *et*

al., 1989). Nous avons choisi de tester l'EGF et le TGF α car ces molécules s'expriment dans les cellules d'origine ectodermique (Hursh *et al.*, 1987; Snead *et al.*, 1989). De plus, l'EGF est détecté, chez le Porc, dans le mésoderme somatopleural de l'amnios, une annexe embryonnaire totalement avasculaire (Vaughan *et al.*, 1992).

Nos résultats montrent que l'ectoderme, l'EGF et le TGF α abolissent le potentiel hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural, la capacité angiopoïétique étant maintenue mais réduite de telle sorte que le mésoderme traité est envahi par des CE de l'hôte : normalement, la vascularisation des dérivés splanchnopleuraux est assurée par des angioblastes intrinsèques (Pardanaud *et al.*, 1989; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1993a).

La manipulation du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique chez l'embryon nous permet donc de postuler l'existence de deux gradients qui modulent les capacités du mésoderme à produire, soit seulement des CE, soit des CE et des CH; le premier gradient, négatif, a pour origine l'ectoderme, le second gradient, positif, provient de l'endoderme (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999).

Quel que soit le rôle joué *in vivo* par les facteurs de croissance que nous avons testés, il est probable que d'autres molécules sont impliquées dans le contrôle du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique. Parmi les candidats possibles, il y a BMP4 dont le rôle est important dans la formation du système sanguin chez le Xénope (Jones *et al.*, 1996). Chez l'Oiseau, cette molécule est notamment transcrite caudalement, au niveau du mésoderme latéral (Pourquie *et al.*, 1996; Watanabe & Le Douarin, 1996; Tonegawa *et al.*, 1997), région riche en angioblastes.

CONCLUSION

La capacité de différents facteurs de croissance à contrôler le potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique des différents territoires mésodermiques, mise en évidence par nos expériences, ouvre une voie dans l'identification des facteurs opérant *in situ* dans l'embryon. Il est indispensable de déterminer, au niveau protéique, l'expression de ces différentes molécules afin de pouvoir la relier éventuellement aux rôles inducteur ou inhibiteur de ces facteurs dans l'hémangiopoïèse. L'utilisation locale de récepteurs dominants négatifs peut permettre l'identification des facteurs de croissance impliqués. En effet, arriver à distinguer précisément les processus mis en jeu dans le contrôle du potentiel angiopoïétique/hémangiopoïétique devrait nous permettre de mieux comprendre la mise en place de la vascularisation au cours de l'ontogenèse.

BIBLIOGRAPHIE

- Beck L. & D'Amore P. A., Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, 1997, 11, 365-373.
- Breier G., Clauss, M. & Risau W., Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Developmental Dynamics*, 1995, 204, 228-239.
- Caprioli A., Jaffredo T., Gautier R., Dubourg C. & Dieterlen-Lièvre F., Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95, 1641-1646.
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Ederhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. & Nagy A., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380, 435-439.
- Dickson M. C., Martin J. S., Cousins F. M., Kulkarni A. B., Karisson S. & Akhurst R. J., Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta1 knock out mice. *Development*, 1995, 121, 1845-1854.
- Dieterlen-Lièvre F., Intraembryonic hematopoietic stem cells. In *Hematology/Oncology clinics of North America 11* (Ed. L. Zon, W.B. Saunders Company), 1997, pp 1149-1171.
- Drake C. J. & Little C. D., Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995, 92, 7657-7661.
- Drake C. J., Brandt S. J., Trusk T. C. & Little C. D., TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev. Biol.*, 1998, 192, 17-30.
- Dumont D. J., 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., Bréant 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., Corbel C., Nataf V., Vaigot P., Bréant C. & Le Douarin N. M., Ligand-dependant 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.
- Feinberg R. N., Repo M. A. & Saunders J. W., Ectodermal control of the avascular zone of the peripheral mesoderm in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 1983, 226, 391-398.
- Ferrara N., Carvermoore K., Chen H., Dowd M., Lu L., Oshea K. S., Powellbraxton L., Hillan K. J. & Moore M. W., Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996, 380, 439-442.
- Fishman M. C. & Chien K. R., Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development*, 1997, 124, 2099-2117.
- Flamme I., Is extraembryonic angiogenesis in the chick embryo controlled by the endoderm? *Anat. Embryol.*, 1989, 180, 259-272.
- Flamme I. & Risau W., Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*. *Development*, 1992, 116, 435-439.
- 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.*, 1995a, 169, 699-712.
- Flamme I., Vonreuten M., Drexler H. C. A., Syedali S. & Risau W., Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev. Biol.*, 1995b, 171, 399-414.
- George E. L., Georges-Labouesse E. N., Patelking R. S., Rayburn H. & Hynes R. O., Defects in mesoderm, neural tube

- and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 1993, 119, 1079-1091.
- Gordon-Thomson C. & Fabian B. C., Hypoblastic tissue and fibroblast growth factor induce blood tissue (haemoglobin) in the early chick embryo. *Development*, 1994, 120, 3571-3579.
- Hursh D. A., Andrews M. E. & Raff R. A., A sea urchin gene encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor. *Science*, 1987, 237, 1487-1490.
- Jaffredo T., Gautier R., Brajeul V. & Dieterlen-Lièvre F., Filiation entre cellules endothéliales et cellules souches hématopoïétiques intraembryonnaires. *J. Soc. Biol.*, 1999, 193.
- Jones C. M., Dale L., Hogan B. L. M., Wright C. V. E. & Smith J. C., Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development*, 1996, 122, 1545-1554.
- Kessel J. & Fabian B. C., The pluripotency of the extraembryonic mesodermal cells of the early chick blastoderm: effects of AP and AOV environments. *Dev. Biol.*, 1986, 116, 319-327.
- Kessel J. & Fabian B. C., Inhibitory and stimulatory influences on mesodermal erythropoiesis in the early chick blastoderm. *Development*, 1987, 101, 45-49.
- Liao E. C., Paw B. H., Oates A. C., Pratt S. J., Postlethwait J. H. & Zon L. I., SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes and Dev.*, 1998, 12, 621-626.
- Mews M. & Meyer M., Modulation of Schwann cell phenotype by TGF- β 1: inhibition of PO mRNA expression and downregulation of the low affinity NGF receptor. *Glia*, 1993, 8, 208-217.
- Millauer B., Witzmannvoos S., Schnurch H., Martinez R., Moller N. P. H., 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.
- Miura Y. & Wilt F. H., Tissue interaction and the formation of the first erythroblasts of the chick embryo. *Dev. Biol.*, 1969, 19, 201-211.
- Miura Y. & Wilt F. H., The formation of blood-islands in dissociated-reaggregated chick embryo yolk sac cells. *Exp. Cell Res.*, 1970, 59, 217-226.
- Murray P. D. F., The development *in vitro* of blood of the early chick embryo. *Strangeways Res. Labor. Cambridge*, 1932, 497-521.
- Oshima M., Oshima H. & Taketo M. M., TGF- β receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.*, 1996, 179, 297-302.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anat. Embryol.*, 1993a, 187, 107-114.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Expression of c-ets1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion and Communication*, 1993b, 1, 151-160.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Does the paraxial mesoderm of the avian embryo have hemangioblastic capacities? *Anat. Embryol.*, 1995, 192, 425-435.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development*, 1999, 126, 617-627.
- Pardanaud L., Altmann C., Kitos P., Dieterlen-Lièvre F. & Buck C. A., Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 1987, 100, 339-49.
- Pardanaud L., Yassine F. & Dieterlen-Lièvre F., Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development*, 1989, 105, 473-485.
- Pardanaud L., Luton D., Prigent M., Bourcheix L. M., Catala M. & Dieterlen-Lièvre F., Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development*, 1996, 122, 1363-1371.
- Pourquie O., Fan C. M., Coltey M., Hirsinger E., Watanabe Y., Bréant C., Francis-West P., Brickell P., Tessier-Lavigne M., & Le Douarin N. M., Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP-4. *Cell*, 1996, 84, 461-471.
- Sanders E. J., Hu N. & Wride M. A., Expression of TGF β 1/3 during early chick embryo development. *Anatomical Record*, 1994, 238, 397-406.
- Schreiber A. B., Winkler M. E. & Derynck R., Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 1986, 232, 1250-1252.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. & Schuh A. C., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1 deficient mice. *Nature*, 1995, 376, 62-66.
- Snead M. L., Luo W., Oliver P., Nakamura M., Don-Wheeler G., Bessem C., Bell G. I., Rall L. B. & Slavkin H. C., Localisation of epidermal growth factor in tooth and lung during embryonic mouse development. *Dev. Biol.*, 1989, 134, 420-429.
- Stewart R., Nelson J. & Wilson D. J., Epidermal growth factor promotes chick embryonic angiogenesis. *Cell Biol. Int. Reports*, 1989, 13, 957-965.
- Tabin C., The initiation of the limb bud: growth factors, hox genes, and retinoids. *Cell*, 1995, 80, 671-674.
- Tickle C., Vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1995, 5, 478-484.
- Tonegawa A., Funayama N., Ueno N. & Takahashi Y., Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP. *Development*, 1997, 124, 1975-1984.
- Vaughan T. J., James P. S., Pascall J. C. & Brown K. D., Expression of the genes for TGF α , EGF and the EGF receptor during early pig development. *Development*, 1992, 116, 663-669.
- Visvader J. E., Fujiwara Y. & Orkin S. H., Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes and Development*, 1998, 12, 473-479.
- Watanabe Y. & Le Douarin N. M., A role for BMP-4 in the development of subcutaneous cartilage. *Mech. Dev.*, 1996, 57, 69-78.
- Wilson D. J., McNeill J. & Hinchliffe J. R., Posterior half amputation of the chick wing bud: the response of the developing vasculature, and subsequent wound healing. *Anat. Embryol.*, 1989, 180, 383-391.
- Wilt F. H., Erythropoiesis in the chick embryo: the role of endoderm. *Science*, 1965, 147, 1588-1590.
- Wolff E. T. & Haffen K., Sur le développement et la différenciation sexuelle de gonades embryonnaires d'oiseau en culture *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 1952, 119, 381-403.
- Yang J. T., Rayburn H. & Hynes R. O., Embryonic mesodermal defects in α -5 integrin deficient mice. *Development*, 1993, 119, 1093-1105.