

De l'aorte primitive à l'aorte définitive : angioblastes et hémangioblastes au cours de l'hématopoïèse

par Claire Pouget*, Marie-Aimée Teillet^o, Rodolphe Gautier* & Thierry Jaffredo*[#]

*UPMC, CNRS UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Bat. C, 6^{ème} étage, Case 24, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05 France; ^oLaboratoire d'Embryologie cellulaire et moléculaire du CNRS et du Collège de France, 49bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94130 Nogent-sur-Marne.

[#]Auteur pour la correspondance : jaffredo@ccr.jussieu.fr

Reçu le 1^{er} février 2005

RÉSUMÉ

L'hématopoïèse aortique est un mécanisme transitoire, extrêmement conservé dans toutes les classes de vertébrés. Elle est caractérisée par la production de véritables Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) qui naissent à partir de l'endothélium ventral du vaisseau par modification phénotypique des Cellules Endothéliales (CE). Ces CSH colonisent alors les organes hématopoïétiques définitifs. Nous nous sommes interrogés sur les mécanismes mis en place pour maintenir l'intégrité vasculaire pendant cette étape de production hématopoïétique. Il a été précédemment démontré que la vascularisation embryonnaire est assurée par deux contingents distincts de CE. L'un issu de la splanchnopleure, donnant des CE et des cellules hématopoïétiques (CH), l'autre provenant du somite et ne fournissant que des CE. Nous avons, à l'aide du modèle de greffe interspécifique caille/poulet, étudié la formation de l'aorte avant, pendant et après l'hématopoïèse. Nous avons pu montrer que 1) avant l'hématopoïèse le toit de l'aorte, initialement d'origine splanchnopleurale, est entièrement colonisé par des CE provenant des somites. Ce vaisseau subit donc un premier remodelage qui aboutit à la formation d'un nouveau toit et de nouveaux côtés constitués de CE d'origine somato-

pleurale alors que le cadran ventral reste formé par des hémangioblastes issus de la splanchnopleure; 2) pendant l'hématopoïèse, les CE somitiques commencent à coloniser la partie ventrale du vaisseau. Cette colonisation s'effectue par intercalation des CE sous les bourgeonnements de CSH; 3) après l'hématopoïèse, les hémangioblastes aortiques ont disparu du plancher de l'aorte et sont remplacés par les CE somitiques. L'aorte subit donc un deuxième remodelage qui conduit à rendre la totalité des CE du vaisseau d'origine somitique; 4) enfin, nous avons identifié une nouvelle population cellulaire issue du somite qui contribue à l'élaboration de la tunique musculaire lisse. Cette population colonise l'aorte de manière distincte des CE. Cette dichotomie a été confirmée par des expériences de traçage cellulaire, à l'aide de vecteurs rétroviraux non-réplicatifs, qui démontrent que les CE aortiques ne produisent pas de cellules musculaires lisses. Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur la production hématopoïétique de l'aorte et le devenir de l'endothélium hémogénique. Ils fournissent aussi des explications sur la nature transitoire de l'hématopoïèse aortique, observée dans toutes les classes de vertébrés.

SUMMARY From the primitive to the definitive aorta: angioblasts and hemangioblasts during aorta-associated haematopoiesis

Intra-aortic haematopoiesis is a transient phenomenon, present in all the vertebrate species examined. Aorta-associated haematopoiesis produces Haematopoietic Stem Cells (HSC) that emerge from the ventral aortic endothelium through endothelial cells (EC) that switch to HSC. HSC emergence is followed by the colonization of definitive haematopoietic organs. Since intra-aortic haematopoiesis is born from EC of the aortic floor, we wondered how vascular integrity was maintained during haematopoietic production. Trans-

plantation experiments have brought about evidence according to which two distinct endothelial lineages contribute to the embryonic vasculature. One comes from the splanchnic mesoderm and gives rise to EC and haematopoietic cells (HC). The other originates from the somite and is restricted to EC differentiation. We have used interspecific quail/chick grafts to study aortic organogenesis during the course of haematopoiesis. We demonstrate that: 1) before haematopoiesis, the aorta, originally entirely of splanchnic origin, is coloni-

zed by EC from the somite. This colonization contributes to create a new roof and sides, which are hence formed by somite-derived EC whereas the floor is contributed by splanchnopleural-derived EC; 2) as haematopoiesis proceeds, somite-derived EC begin to colonize the aortic floor and are found beneath HSC clusters; 3) after haematopoiesis, aortic hemangioblasts disappear from the endothelium and are replaced by somite-derived EC. At this stage, the whole aortic endo-

thelium is derived from somitic cells; 4) we have identified a new cell population from the somite that contributes to the vascular smooth muscle cells (VSMC). This population appears distinct from the somite-derived EC. Using lineage tracing with non-replicative retroviral vectors, we show that EC do not give rise to VSMC as previously thought. Taken together, our results bring about new lights on aorta morphogenesis and the time-restricted production of haematopoiesis.

HÉMANGIOBLASTES ET PRODUCTION HÉMATOPOÏÉTIQUE : QUELQUES RAPPELS

Les cellules endothéliales (CE) et hématopoïétiques (CH) qui forment le système sanguin apparaissent dès les premiers stades de la gastrulation à partir de précurseurs mésodermiques qui ingressent au travers de la ligne primitive. CE et CH se développent en étroite association et partagent l'expression d'un nombre important de gènes au cours de la mise en place du système sanguin. Cette proximité anatomique et moléculaire, bien visible au niveau du Sac Vitellin (SV), a depuis longtemps suggéré l'existence d'un précurseur commun aux deux lignages, l'hémangioblaste (Murray, 1932; Sabin, 1920; Pardanaud *et al.*, 1989). Cette hypothèse s'est trouvée renforcée par l'apport des invalidations géniques chez la Souris montrant qu'un nombre important de gènes est fonctionnellement impliqué dans le développement des CE comme des CH.

Dans le SV, premier site d'hématopoïèse de l'embryon, les hémangioblastes forment des groupes compacts de cellules qui se différencient rapidement en îlots sanguins constitués de CE en périphérie et de CH au centre (Haar & Ackerman, 1971). En fusionnant de proche en proche, ces îlots sanguins forment le réseau vasculaire primitif et, dans le même temps, produisent les premières CH assurant l'apport d'oxygène aux tissus embryonnaires. Cette production hématopoïétique du SV n'est que transitoire et un deuxième site de production apparaît très rapidement au niveau de l'embryon lui-même dans la région aortique. Ce site, décrit depuis longtemps par de nombreux auteurs, présente une production hématopoïétique très stéréotypée. Les CH, situées dans la partie ventrale du vaisseau, sont visibles sous la forme de petits bourgeonnements de cellules rondes, faisant saillie dans la lumière de l'aorte, en étroite association avec les CE plus plates (Jordan, 1916, 1917; Turpen *et al.*, 1981; Dantschakoff, 1907; Sabin, 1917; Dieterlen-Lièvre *et al.*, 1977, 1975, 1981; Emmel, 1916; Smith & Glomski, 1982; Garcia-Porrero *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1997; Minot, 1912; Tavian *et al.*, 1996, 1999, 2001; Labastie *et al.*, 1998). Des expériences de culture cellulaire et de reconstitution à long terme d'animaux irradiés de manière sub-létale ont permis de montrer que l'aorte produit de véritables Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) qui colonisent, au moins en partie, les organes hématopoïétiques de l'adulte. Des expériences de tra-

çage cellulaire réalisées chez l'Oiseau ont pu montrer que les CH des bourgeonnements intra-aortiques dérivent des CE du plancher du vaisseau. Ces expériences ont consisté à marquer l'arbre vasculaire une journée avant l'apparition des premières CH aortiques et à suivre les dérivées des CE marquées au niveau de l'aorte. Deux types de traçage ont été réalisés à court terme avec des LDL acétylés qui sont spécifiquement endocytosés par les CE, ou à long terme à l'aide de vecteurs rétroviraux exprimant le gène rapporteur de la β -Galactosidase (LacZ). Dans les deux cas, les mêmes conclusions se sont imposées; les CE initialement marquées par les LDL ou les vecteurs rétroviraux à E2 se retrouvent à E3 dans les bourgeonnements intra-aortiques. Au cours de la production hématopoïétique, les hémangioblastes aortiques subissent une modification phénotypique caractérisée par la perte des marqueurs endothéliaux et l'acquisition des marqueurs hématopoïétiques (Jaffredo *et al.*, 1998, 2000; voir aussi Bollérot *et al.*, ce numéro). Cette production hématopoïétique diffère de celle du SV car les hémangioblastes aortiques sont présents longtemps avant l'émergence des CSH. De plus ils possèdent tous les attributs de CE *bona fide* et en assurent les fonctions (Fig. 1). Il y aurait donc au moins deux types d'hémangioblastes qui diffèreraient par leurs capacités de différenciation et sans doute par leur instruction.

L'existence de cet hémangioblaste aortique a été, par la suite, confirmée dans le modèle murin et plus récemment chez l'Homme (de Bruijn *et al.*, 2002; Oberlin *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 1998a, 1998b; Sugiyama *et al.*, 2003; Tavian *et al.*, 2001).

LIGNAGE HÉMANGIOPOÏÉTIQUE, ET CONSTRUCTION DE L'AORTE

Des expériences de transplantation entre la Caille et le Poulet avaient permis de mettre en évidence que le somite était une source de CE (Noden, 1989, 1991; Schramm & Solursh, 1990; Wilting *et al.*, 1995; Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1995; Pardanaud *et al.*, 1996). Étudiant l'origine de la vascularisation de l'embryon, Pardanaud *et al.* (1996) ont montré que les CE somitiques colonisent l'ensemble de la lame latérale où elles forment la vascularisation du corps et des membres, du tube nerveux, du rein et ainsi que des veines cardinales. Cette étude a aussi conduit à un résultat inattendu : le toit

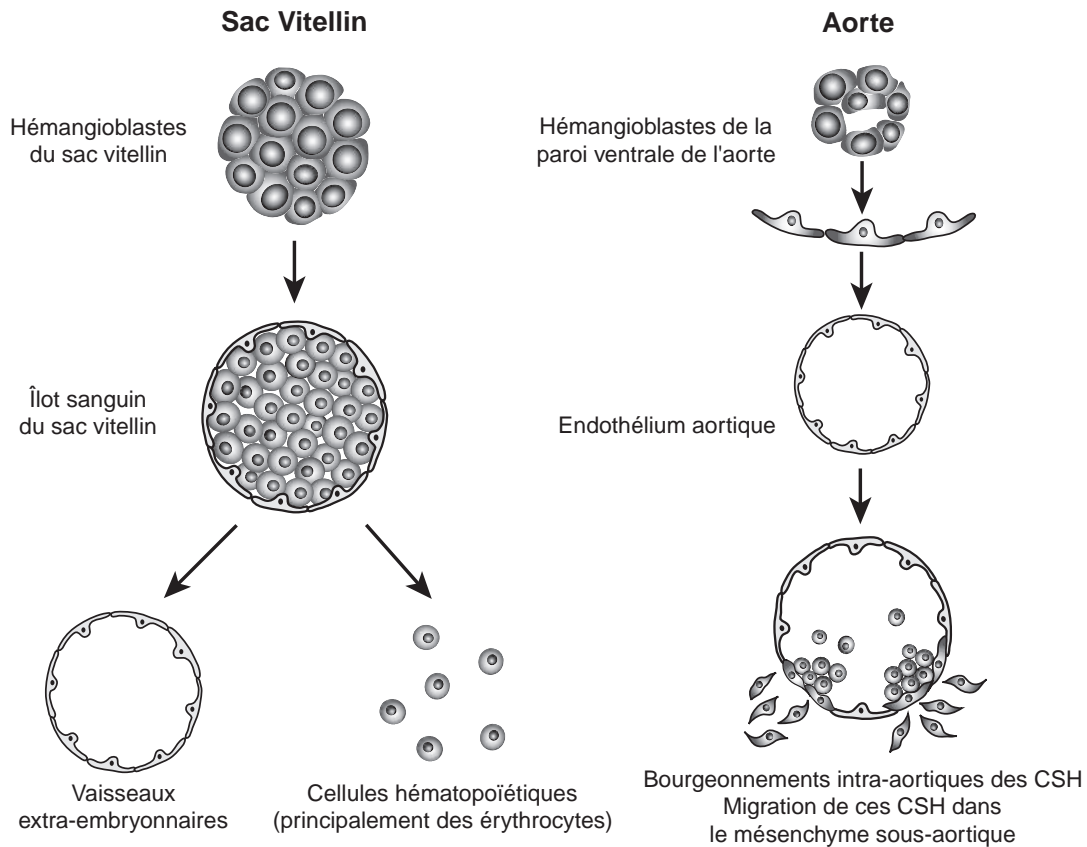


FIG. 1. – Comparaison entre l'hématopoïèse du SV et celle de l'aorte. Les hémangioblastes du SV donnent naissance aux îlots sanguins, avec en périphérie des CE et au centre des CH. Au cours de leur maturation, ces îlots vont former le système vasculaire extra-embryonnaire et les CH principalement des érythrocytes primitifs. Au niveau de l'aorte, les CSH naissent à partir des CE ventrales, bourgeonnent à l'intérieur du vaisseau ou ingressent dans le mésenchyme sous-aortique.

et les côtés de l'aorte, mais eux seuls, provenaient aussi des CE somitiques. L'aorte est donc un vaisseau chimérique formé de deux contingents distincts de CE : un premier d'origine splanchnopleurale, dénommé hémangiopoïétique, capable de donner des CE et des CH ; un deuxième, d'origine somitique, dénommé angiopoïétique, ne donnant que des CE. Cette régionalisation explique la restriction de l'hématopoïèse à la partie ventrale du vaisseau car seul le lignage hémangiopoïétique peut produire des CH. D'autres expériences ont démontré que le somite contribuait aussi à la formation des vaisseaux lymphatiques (Wilting *et al.*, 2000). Les mécanismes de reconnaissance des CE dans l'embryon et leur participation à la vascularisation des différents organes ou structures apparaissent très conservés dans les différentes classes de vertébrés car des somites de souris greffés dans un environnement poulet donnent globalement les mêmes contributions que celles observées avec les greffes Caille/Poulet (Ambler *et al.*, 2001). Considérant la capacité angiopoïétique du somite et la production forte mais transitoire des CH aortiques, nous nous sommes posés la question de savoir comment l'intégrité de l'aorte était maintenue pendant l'hématopoïèse. En d'autres termes si les CE du plancher de l'aorte sont

engagées dans l'hématopoïèse, comment l'intégrité vasculaire est-elle maintenue ? Pour répondre à cette question, nous avons 1) précisé l'identité moléculaire des CE somitiques et 2) étudié la contribution du somite à la formation de l'aorte avant, pendant et après l'hématopoïèse. L'identité moléculaire du lignage endothélial somitique a été établie à l'aide de sondes codant pour des facteurs connus pour être impliqués dans le développement endothélial et hématopoïétique. Il s'agit des facteurs de transcription GATA-2 et Scl/Tal1 et du VEGF-R2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2). Au niveau des somites, les transcrits de ces facteurs sont initialement localisés dans le cadran latéro-dorsal. Ils ne sont détectés ni dans le mésoderme présomitique ni dans les deux derniers somites formés. Cette population cellulaire marquée migre au cours du développement (Noden, 1989, 1991 ; Wilting, 1995, 2000) ; certaines cellules colonisent la lame latérale alors que d'autres semblent se diriger vers l'aorte et entrent en contact avec le toit du vaisseau. Pour étudier la contribution des somites à la formation de l'aorte nous avons utilisé le système Caille/Poulet (Le Douarin *et al.*, 1969) pour discriminer les CE issues du somite de celles provenant de la splanchnopleure. Nous avons remplacé la totalité du mésoderme présomi-

tique de poulet par le territoire équivalent de caille. Les embryons greffés ont été étudiés par immunohistochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux reconnaissant des types cellulaires particuliers : QH1 qui marque les CE et les CH de caille à l'exception des érythrocytes matures (Pardanaud *et al.*, 1987) et QCPN qui reconnaît tous les noyaux des cellules de caille (Carlson et Carlson, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). À E3, 24 h après l'opération, la vascularisation du derme, du tube nerveux, de la lame latérale, du pronéphros et des veines cardinales est assurée par les cellules somitiques de caille, ce qui confirme les travaux de Pardanaud *et al.* (1996). Au niveau de l'aorte, alors que les expériences précédentes faisaient état d'une contribution relativement faible, nous avons mis en évidence un remplacement total du toit du vaisseau par des cellules issues du matériel somitique greffé (Fig. 2A et B). La faible contribution observée précédemment (Pardanaud *et al.*, 1996) était sans doute due au nombre restreint de somites greffés. En effet, lorsque nos greffons de plaque segmentaire étaient courts, les contributions observées étaient toujours mosaïques. À E4, 36 h après la greffe, alors que l'hématopoïèse aortique s'achève, nous observons des CE somitiques dans le plancher de l'aorte à proximité immédiate des bourgeonnements intra-aortiques. Fait remarquable, alors que dans la partie dorsale du vaisseau les CE somitiques ne colonisent jamais le côté contralatéral à la greffe, les CE de caille identifiées dans le plancher de l'aorte sont souvent retrouvées du côté non-greffé. À E5, 72 h après la greffe, alors que l'hématopoïèse est achevée, toute l'aorte correspondant au niveau de la greffe est constituée de CE d'origine somitique (Fig. 2C et D) ce qui signifie que l'ancien plancher qui contenait des hémangioblastes (de poulet dans cette expérience) ont disparu et ont été remplacés par des angioblastes de caille. Si nous rapprochons ces résultats de nos expériences de traçage cellulaire, ces expériences démontrent que l'endothélium ventral de l'aorte passe totalement dans le compartiment hématopoïétique. Cette disparition des hémangioblastes aortiques est à mettre en relation avec le caractère très transitoire de l'hématopoïèse aortique. Lorsque les derniers hémangioblastes ont disparu du plancher de l'aorte la production hématopoïétique cesse.

LE SOMITE, SOURCE DE CELLULES MUSCULAIRES LISSES

En même temps que nous observons la colonisation de l'aorte par des CE somitiques de caille, nous avons noté la présence de cellules de caille, QCPN⁺/QH1⁻ autour de l'aorte, dans une localisation correspondant à celle de la tunique musculaire lisse. Nous avons mis en évidence que ces cellules expriment une isoforme d'actine spécifique des muscles lisses (α SMA). En plus des CE, le somite fournit donc des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). La mise en place de la tunique musculaire lisse s'initie dès E4, en parallèle avec le remodelage de l'endothélium aortique. À E5/E6, la

tunique musculaire est constituée de plusieurs épaisseurs de cellules toutes originaires du somite. Cette contribution aux muscles lisses est très inattendue. Jusqu'à présent, l'origine des CMLV troncales était inconnue. En revanche l'origine des CMLV et des péricytes dans la tête, le cou et le cœur a été bien identifiée. Différents groupes ont pu mettre en évidence une participation des cellules de crêtes neurales (CCN) à la formation de la tunique musculaire lisse des artères dérivant des arcs branchiaux (Le Lièvre & Le Douarin, 1975), de la face et du cerveau antérieur (Etchevers *et al.*, 2001). Pour la région cardiaque, péricytes et CMLV ont une double origine les artères coronaires sont colonisées par des progéniteurs issus du tissu épicaudique (Mikawa *et al.*, 1996, Pérez-Pomares *et al.*, 2002) alors que les CMLV du septum cardiaque et des artères pulmonaires proviennent des CCN (Waldo *et al.*, 1998). Concernant le tronc de l'embryon, deux hypothèses étaient proposées l'une suggérait que le recrutement des CMLV se faisait localement, à partir du mésoderme entourant les vaisseaux, grâce à des molécules libérées par les CE (Drake *et al.*, 1998; Hungerford *et al.*, 1999), l'autre, sur la base d'expériences de traçage cellulaire menées chez l'oiseau, proposait un mécanisme de transdifférenciation des CE aortiques vers la voie musculaire lisse (DeRuiter *et al.*, 1997). Cette dernière vue s'est trouvée renforcée lorsque Yashimata *et al.*, (2000) ont montré que des cellules ES triées sur la base de leur expression pour VEGF-R2, puis traitées par le PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-BB), perdaient leur marqueur endothélial au profit de l'apparition de l' α SMA. D'autres expériences du groupe de Gordon Keller ont permis d'isoler des cellules présentant des caractéristiques d'hémangioblastes, capables d'exprimer des marqueurs spécifiques du lignage musculaire lisse en plus de marqueurs endothéliaux et hématopoïétiques (Huber *et al.*, 2004). Nous avons voulu tester, *in vivo*, si les CE de l'aorte pouvaient se transdifférencier vers la voie musculaire lisse. Pour cela, nous avons marqué les CE vasculaires avec des rétrovirus non-réplicatifs exprimant des gènes rapporteurs. Deux jours après inoculation, l'arbre vasculaire embryonnaire présente de nombreux clones de CE. Au niveau de l'aorte, comme dans les autres vaisseaux, nous n'avons pas constaté de cellules infectées présentant de phénotype de CMLV. Quelques rares cellules infectées ayant des caractéristiques de macrophages sont trouvées au sein de la tunique musculaire. Nous n'observons donc pas, au niveau des vaisseaux, de passage des CE vers les CMLV comme suggéré dans les expériences citées plus haut.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons montré que l'aorte est le siège de remodelages cellulaires cruciaux nécessaires à la formation d'une aorte définitive. Les somites contribuent ainsi à la régionalisation du vaisseau avant l'hématopoïèse en formant le toit aortique, puis en fournissant un nouveau plancher au vaisseau après hématopoïèse.

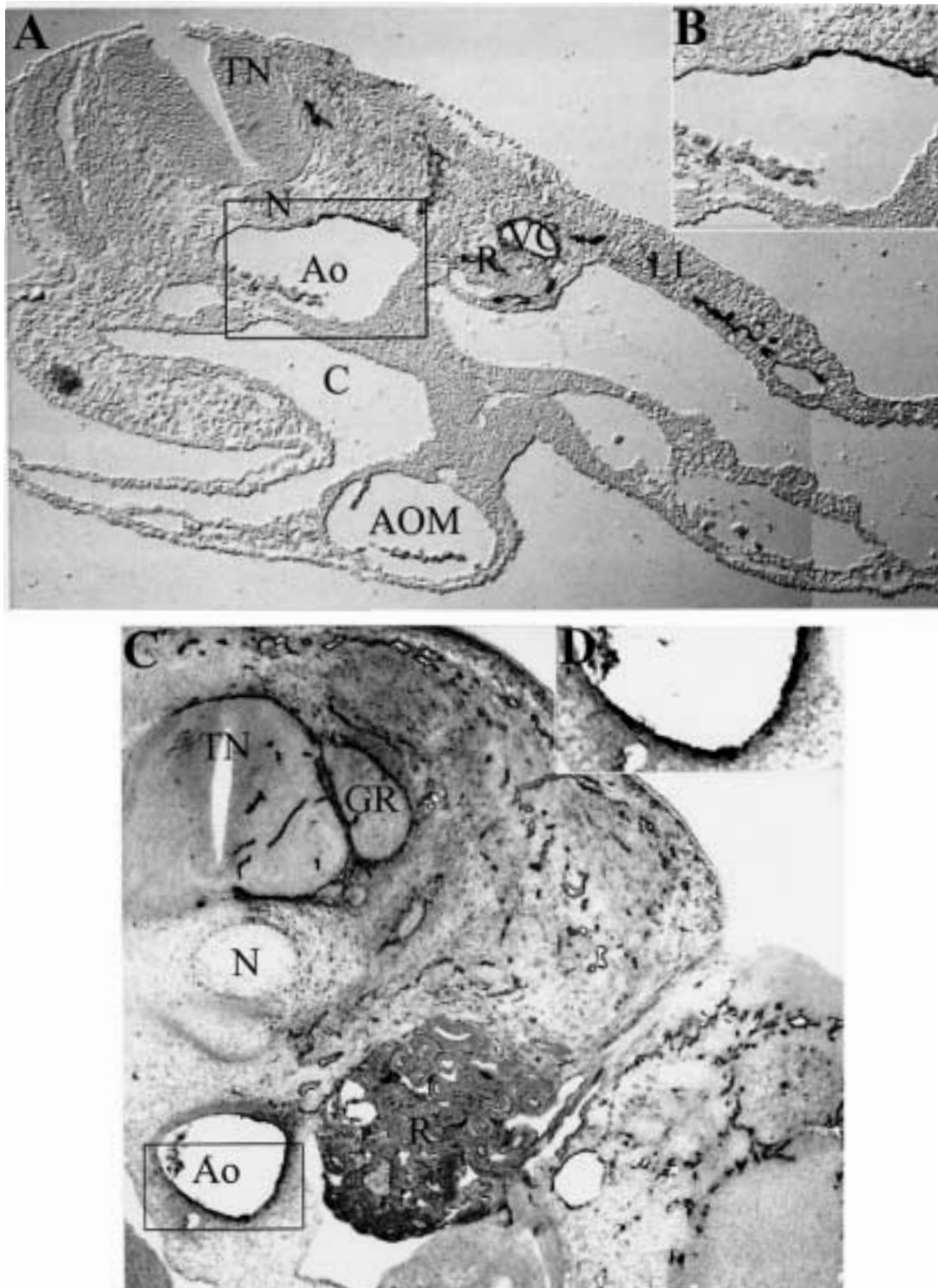


FIG. 2. – Immunohistochimie anti-QH1 sur coupes transversales d'embryons de E2,5 (A et B) et E6 (C et D). Ces embryons de poulet ont subi une substitution hémilatérale de la plaque segmentaire (matériel présomitique) par la plaque segmentaire d'un embryon de caille isochronique. A : 24 h plus tard, les cellules QH1, en noir, ont donné la vascularisation du tube neural, de la lame latérale, du rein et du toit de l'aorte du côté greffé. La veine cardinale est entièrement d'origine somitique. B : détail de la région aortique selon le cadre en A. C : 96 h après la greffe, les cellules QH1 ont colonisé toute la paroi du corps de l'embryon. Au niveau de l'aorte, les hémangioblastes ont disparu et ont été remplacés par des cellules endothéliales somitiques. D : agrandissement de la paroi ventrale de l'aorte selon le cadre en C.

Ao : aorte, AOM : artères omphalo-mésentériques, C : cœlome, GR : ganglion rachidien, LL : lame latérale, N : notochorde, R : rein, TN : tube neural, VC : veine cardinale.

Nous avons aussi identifié le somite comme une source de CMLV pour l'aorte. Nos travaux se portent actuellement sur l'existence d'une dichotomie possible entre le lignage musculaire lisse et péricytaire. La difficulté de cette démonstration est qu'il n'existe pas de marqueur discriminant les péricytes des CMLV. Le seul critère permettant d'identifier clairement les deux populations est la position de ces cellules par rapport à la lame basale qui sépare le compartiment CE/péricyte et CMLV. Nous voulons, par des techniques classiques de greffes, savoir si la mise en place des péricytes est antérieure à celle des CMLV et surtout si les péricytes sont ou non originaires des somites. Dans un second temps, nous voudrions, par des techniques de cultures d'explants, identifier le compartiment somitique qui donne naissance aux CMLV.

Remerciements. – Ce travail a été subventionné par le CNRS et l'Université Pierre et Marie Curie ainsi que par des contrats de l'Association pour la Recherche sur le Cancer (n° 3312), la Ligue Régionale contre le Cancer, comité de Paris et l'Action Concertée Incitative (n° 22-2002-296). C. P. est financée par une bourse doctorale du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambler C. A., Nowicki J. L., Burke A. C. & Bautch V. L., Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev. Biol.*, 2001, 234, 352-364.
- Danschakoff V., Ueber das erste Auftreten der Blutelemente beim Hühnerembryo. *Folia Haematol.*, 1907, 4, 159-166.
- de Bruijn M. F., Ma X., Robin C., Ottersbach K., Sanchez M. J., & Dzierzak E., Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity*, 2002, 16, 73-83.
- DeRuiter M. C., Poelmann R. E., VanMunsteren J. C., Mironov V. & Markwald R. R., Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins *in vivo* and *in vitro*. *Circ. Res.*, 1997, 80, 444-451.
- Dieterlen-Lièvre F., On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1975, 33, 607-619.
- Dieterlen-Lièvre F., Martin C. & Beaupain D., Origin of erythropoietic and lymphopoietic stem cells in the avian embryo, studied in interspecific chimaeras. *Folia Biol. (Praha)*, 1977, 23, 373-375.
- Dieterlen-Lièvre F. & Martin C., Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.*, 1981, 88, 180-189.
- Drake C. J., Hungerford J. E. & Little C. D., Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998, 857, 155-179.
- Emmel V. E., The cell clusters in the dorsal aorta of mammalian embryos. *Am. J. Anat.*, 1916, 19, 401-416.
- Etchevers H. C., Vincent C., Le Douarin N. M. & Couly G. F., The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, 2001, 128, 1059-1068.
- Garcia-Porrero J. A., Godin I. E. & Dieterlen-Lièvre F., Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 1995, 192, 425-435.
- Haar J. L. & Ackerman G. A., A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat. Rec.*, 1971, 170, 199-223.
- Huber T. L., Kouskoff V., Fehling H. J., Palis J. & Keller G., Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*, 2004, 432, 625-630.
- Hungerford J. E. & Little C. D., Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J. Vasc. Res.*, 1999, 36, 2-27.
- Jaffredo T., Gautier R., Eichmann A. & Dieterlen-Lièvre F., Intra-aortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, 1998, 125, 4575-4583.
- Jaffredo T., Gautier R., Brajeul V. & Dieterlen-Lièvre F., Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev. Biol.*, 2000, 224, 204-214.
- Jordan H. E., Evidence of hemogenic capacity of endothelium. *Anat. Rec.*, 1916, 10, 417-420.
- Jordan H. E., Aortic cell clusters in vertebrate embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. NY*, 1917, 3, 149-156.
- Labastie M. C., Cortes F., Romeo P. H., Dulac C. & Péault B., Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood*, 1998, 92, 3624-3635.
- Le Lièvre C. S. & Le Douarin N. M., Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1975, 34, 125-154.
- Le Douarin N. M., Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme « marquage biologique » dans des recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogenèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1969, 103, 435-452.
- Mikawa T. & Gourdie R. G., Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev. Biol.*, 1996, 174, 221-232.
- Minot C. S., The origin of the angioblast and the development of the blood. Keibel F., Mall F. P., Human Embryology, 1912, vol. 2.
- Murray P. D. F., The development *in vitro* of the blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc. London*, 1932, 11, 497-521.
- Nishikawa S. I., Nishikawa S., Kawamoto H., Yoshida H., Kizumoto M., Kataoka H. & Katsura Y., *In vitro* generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity*, 1998, 8, 761-769.
- Nishikawa S. I., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N. & Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1 + VE-cadherin + cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, 125, 1747-1757.
- Noden D. M., Embryonic origins and assembly of embryonic blood vessels. *An. Rev. Pulmon. Dis.*, 1989, 140, 1097-1103.
- Noden D. M., Origins and patterning of avian outflow tract endocardium. *Development*, 1991, 111, 867-876.
- Oberlin E., Taviani M., Blazsek I. & Peault B., Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*, 2002, 129, 4147-4157.
- Pardanaud L., Altmann C., Kitos P., Dieterlen-Lièvre F. & Buck C., Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 1987, 100, 339-349.
- Pardanaud L., Yassine F. & Dieterlen-Lièvre F., Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and hemopoiesis during avian ontogeny. *Development*, 1989, 105, 473-485.
- Pardanaud L. & Dieterlen-Lièvre F., Does the paraaxial mesoderm of the avian embryo have hemangioblastic capacities? *Anat. Embryol.*, 1995, 192, 301-308.
- 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.
- Perez-Pomares J. M., Carmona R., Gonzalez-Iriarte M., Atencia G., Wessels A. & Munoz-Chapuli R., Origin of coronary endo-

- thelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int. J. Dev. Biol.*, 2002, 46, 1005-1013.
- Sabin F. R., Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.*, 1917, 226, 61-124.
- 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. *Contributions to Embryology*, 1920, 9, 213-262.
- Schramm C. & Solursh M., The formation of pre-muscle masses during chick wing bud development. *Anat. Embryol.*, 1990, 182, 235-247.
- Smith R. A. & Glomski C. A., "Hemogenic endothelium" of the embryonic aorta: does it exist? *Dev. Comp. Immunol.*, 1982, 6, 359-368.
- Sugiyama D., Ogawa M., Hirose I., Jaffredo T., Arai K. & Tsuji K., Erythropoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells at the pre-liver stage. *Blood*, 2003, 101, 4733-4738.
- Tavian M., Coulombel L., Luton D., Clemente H. S., Dieterlen-Lièvre F. & Péault B., Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 1996, 87, 67-72.
- Tavian M., Hallais M. F. & Péault B., Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development*, 1999, 126, 793-803.
- Tavian M., Robin C., Coulombel L. & Péault B., The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity*, 2001, 15, 487-495.
- Turpen J. B., Knudson C. M. & Hoefen P. S., Embryonic origin of hematopoietic precursor cells from the region of the presumptive mesonephros in *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, 1981, 199, 261A.
- Waldo K., Miyagawa-Tomita S., Kumiski D. & Kirby M. L., Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure. *Dev. Biol.*, 1998, 196, 129-144.
- Wilting J., Brand-Saberi B., Huang R. J., Zhi Q. X., Kontges G., Ordahl C. P. & Christ B., Angiogenic potential of the avian somite. *Dev. Dyn.*, 1995, 202, 165-171.
- Wilting J., Papoutsis M., Schneider M. & Christ B., The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev. Dyn.*, 2000, 217, 271-278.
- Wood H. B., May G., Healy L., Enver T. & Morriss-Kay G. M., CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*, 1997, 90, 2300-2311.
- Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K. & Nishikawa S., Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, 408, 92-96.