

Aspects cellulaires et moléculaires de l'émergence des cellules souches hématopoïétiques : implication de RUNX1/AML1

par Karine Bollérot¹, Virginie Escriou², Rodolphe Gautier¹, Daniel Scherman² & Thierry Jaffredo*

¹UPMC, CNRS UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05 ; ²UPCG, CNRS FRE 2463 INSERM U640, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06.

* Auteur pour la correspondance : jaffredo@ccr.jussieu.fr

Reçu le 1^{er} février 2005

RÉSUMÉ

Chez l'embryon de vertébré, le plancher de l'aorte est le site majeur de production des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) assurant le renouvellement des cellules sanguines chez l'adulte. Les CSH sont produites à partir des Cellules Endothéliales (CE) *via* une cascade complexe d'événements moléculaires qui sont, à l'heure actuelle, encore peu compris. Le facteur de transcription RUNX1/AML1 et son cofacteur CBF β , impliqués dans 20 % des leucémies myéloïdes aiguës, semblent contrôler ce processus. L'étude détaillée de l'expression de RUNX1 et des facteurs associés au cours de la production des CSH chez l'embryon d'oiseau, nous permet d'envisager les cascades moléculaires impliquées. Cependant, la fonction de RUNX1 est finement régulée à plu-

sieurs niveaux et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont difficiles à analyser par les approches génétiques classiques. Afin d'offrir de nouvelles possibilités d'étude, nous avons mis au point une technique permettant de cibler l'arbre vasculaire et les CE hémogéniques *in vivo*. Le transfert de gène est réalisé par lipofection après inoculation par injection intra-cardiaque chez l'embryon d'oiseau. Cette méthode a été optimisée pour permettre de mener des expériences de gain ou de perte de fonction de manière simple et efficace. Combiné aux avantages expérimentaux de l'embryon d'oiseau, ce nouveau système d'analyse génétique nous permet d'étudier en détail la fonction de RUNX1 dans la production des CSH à partir des CE.

SUMMARY Understanding the cellular and molecular aspects of Haematopoietic Stem Cell emergence and their regulation by RUNX1/AML1

In the vertebrate embryo, the ventral wall of the aorta is the major site of Haematopoietic Stem Cell (HSC) production. HSC, which are at the basis of the adult blood cells hierarchy, are generated from Endothelial Cells (EC) through a complex cascade of molecular events. The transcription factor RUNX1/AML1 and its cofactor CBF β , disrupted in 20 % of acute myeloid leukaemia cases, are thought to control this process. A detailed gene expression analysis of RUNX1 and its associated factors in the chick embryo, prompted us to speculate on the molecular cascades involved in HSC production. The function of RUNX1 is however tightly regulated at several levels, rendering analy-

sis through classical genetic approaches very difficult to manage. To offer new possibilities of investigation, we have designed a technique to target the blood forming system *in vivo*. Gene transfer was achieved by lipofection following delivery by intra-cardiac injection in the avian embryo. This method was optimised to allow a wide range of functional analysis, either by gain or loss of function, in a simple and efficient manner. In combination with experimental advantages of the avian embryo, this new system of genetic analysis allows us to perform a detailed study of RUNX1 function in HSC production from EC.

IMPLICATION DE RUNX1 DANS L'HÉMATOPOÏÈSE : FONCTIONS NORMALES ET DÉRÉGULATIONS

Les cellules du sang sont générées en continu à partir des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) caractérisées par un fort potentiel d'auto-renouvellement et de

différenciation. Chez l'adulte, les CSH sont stockées dans la moelle osseuse, mais elles sont produites très tôt, durant la vie embryonnaire. Les modalités du développement hématopoïétique sont conservées entre les différentes classes de vertébrés. Elles reposent sur des mécanismes cellulaires et moléculaires similaires, sinon identiques, chez l'Homme, la Souris ou l'Oiseau. En par-

ticulier, les aspects cellulaires de la production des CSH ont d'abord été établis chez l'embryon d'oiseau avant d'être confirmés chez les mammifères. Les CSH sont produites de façon transitoire au début du développement dans le territoire intra-embryonnaire. Secondairement, elles colonisent le foie fœtal, le thymus, la rate et enfin la moelle osseuse pour assurer leur différenciation (Dieterlen-Lièvre, 1975; Lassila *et al.*, 1978; Turpen *et al.*, 1981; Ciau-Uitz *et al.*, 2000; Cumano *et al.*, 1996; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Tavian *et al.*, 1996). Les études menées chez l'oiseau et la souris ont montré que l'aorte est le site majeur de production des CSH (Cormier & Dieterlen-Lièvre, 1988; Godin *et al.*, 1993; Medvinsky *et al.*, 1993). Cette production est caractérisée par le bourgeonnement des CSH dans la lumière de l'aorte, au contact de l'endothélium ventro-latéral. Des expériences de traçage cellulaire réalisées chez l'oiseau ont montré que les CSH des bourgeonnements intra-aortiques dérivent directement des Cellules Endothéliales (CE) aortiques (Jaffredo *et al.*, 1998; Jaffredo *et al.*, 2000). Ces données, confirmées chez les mammifères (de Bruijn *et al.*, 2002; Oberlin *et al.*, 2002; Péault & Tavian, 2003; Sugiyama *et al.*, 2003) mettent en évidence l'existence d'un endothélium hémogénique dans l'embryon à l'origine des CSH fondatrices de l'hématopoïèse adulte.

L'émergence des CSH à partir des CE suppose la mise en place d'une régulation transcriptionnelle complexe, engageant les cellules dans la voie hématopoïétique aux dépens de la voie endothéliale. Bien que le contrôle moléculaire d'un tel processus soit encore peu connu, on sait que le facteur de transcription RUNX1 (encore appelé AML1, pour Acute Myeloid Leukemia) en est un régulateur essentiel. RUNX1 et son co-facteur CBF β forment l'hétérodimère CBF (Core Binding Factor). Les données cliniques impliquent le complexe CBF dans 20 à 25 % des leucémies myéloïdes aiguës (Speck & Gilliland, 2002; Kurokawa & Hirai, 2003). Le gène codant pour RUNX1, porté par le chromosome 21, est une cible fréquente dans les leucémies associées à des translocations chromosomiques. Il est touché par les translocations t(8;21)(q22;q22) et t(12;21)(p13;q22) dans les leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës et dans la translocation t(16;21)(q24;q22) dans les leucémies et les myelodysplasies liées aux thérapies anticancéreuses. Le cofacteur CBF β , qui augmente l'affinité de RUNX1 pour l'ADN, est lui aussi touché dans les leucémies myéloïdes aiguës par les réarrangements chromosomiques inv(16;21)(q24;q22), t(16;16) et del(16;q22).

L'implication croissante de CBF dans les pathologies hématologiques a intensifié les recherches sur son rôle au cours de l'hématopoïèse. L'ensemble des données indique aujourd'hui qu'il régule non seulement la différenciation des lignages hématopoïétiques en activant la transcription de gènes cibles hématopoïétiques (1L3, GMCSF, CSF-R1, TCR β , myéloperoxydase, neutrophile élastase; Perry *et al.*, 2002) mais aussi la production précoce des CSH chez l'embryon. Les embryons de souris délétés des gènes RUNX1 ou CBF β sont en effet incapables de produire des CSH et présentent une ané-

mie sévère au niveau du foie fœtal (Okuda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996a; Sasaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996b; Okada *et al.*, 1998). L'analyse détaillée des mutants RUNX1 a révélé un blocage très précoce de l'hématopoïèse définitive chez ces embryons résultant de l'absence de bourgeonnements intra-aortiques (North *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2000; Mukoyama *et al.*, 2000; Yokomizo *et al.*, 2001). L'hypothèse a donc été émise que RUNX1 puisse être un régulateur clé, requis au niveau de l'endothélium hémogénique pour permettre la production des CSH. Un grand nombre de données obtenues *in vitro* et *in vivo* chez la souris vont aujourd'hui dans ce sens. Notamment, l'analyse d'embryons RUNX1^{l2/+} montre que RUNX1 est exprimé à la fois dans les CE du plancher de l'aorte et dans toutes les CSH capables de reconstitution à long terme (North *et al.*, 1999; North *et al.*, 2002). L'enjeu est aujourd'hui de comprendre le rôle exact de RUNX1 au cours de la différenciation des CE en CSH et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

EXPRESSION DE RUNX1 ET DIFFÉRENCIATION DE L'ENDOTHÉLIUM HÉMOGÉNIQUE

Pour préciser l'implication de RUNX1 au cours de la différenciation de l'endothélium hémogénique vers la voie hématopoïétique, nous avons cloné le gène codant pour ce facteur chez l'oiseau et analysé son expression au cours de l'hématopoïèse aortique. L'expression de RUNX1 est initiée à 2 jours de développement (E2) dans une petite population de CE située latéralement au sein des aortes paires (Fig. 1A). Ces cellules expriment des marqueurs endothéliaux tels que le VEGF-R2 mais n'expriment pas encore de marqueur hématopoïétique tel que c-Myb (Fig. 1B) ou CD45 (Fig. 1I). Entre E2 et E3, l'aorte impaire se forme par fusion des deux aortes paires sur la ligne médiane. Parallèlement à cette fusion, on observe une extension des domaines latéraux d'expression de RUNX1 qui s'étendent alors ventralement pour constituer la totalité du plancher de l'aorte. Parmi ces cellules, certaines commencent à exprimer des gènes d'identité hématopoïétique bien qu'elles aient encore une morphologie endothéliale. Sur des coupes histologiques adjacentes, on observe les premières cellules exprimant les facteurs de transcription c-Myb (Fig. 1D) ou PU.1 (non montré) parmi les CE exprimant RUNX1 (Fig. 1C). Sachant que c-Myb et PU.1 sont des partenaires fonctionnels de RUNX1 (Hernandez-Munain *et al.*, 1994; Petrovick *et al.*, 1998), il serait intéressant de savoir si RUNX1 contrôle leur expression dans les CE hémogéniques et/ou interagit avec ces facteurs pour contrôler la différenciation des CE en CSH. Ces résultats montrent, en outre, que l'acquisition d'une identité moléculaire hématopoïétique par les CE hémogéniques s'opère très tôt, alors qu'elles sont encore parfaitement intégrées dans l'endothélium ventral. Nous avons également pu constater que ces cellules commencent à exprimer le marqueur panleucocytaire CD45 (Fig. 1J). Par la suite, la maturation de l'endothélium hémogénique se caractérise par

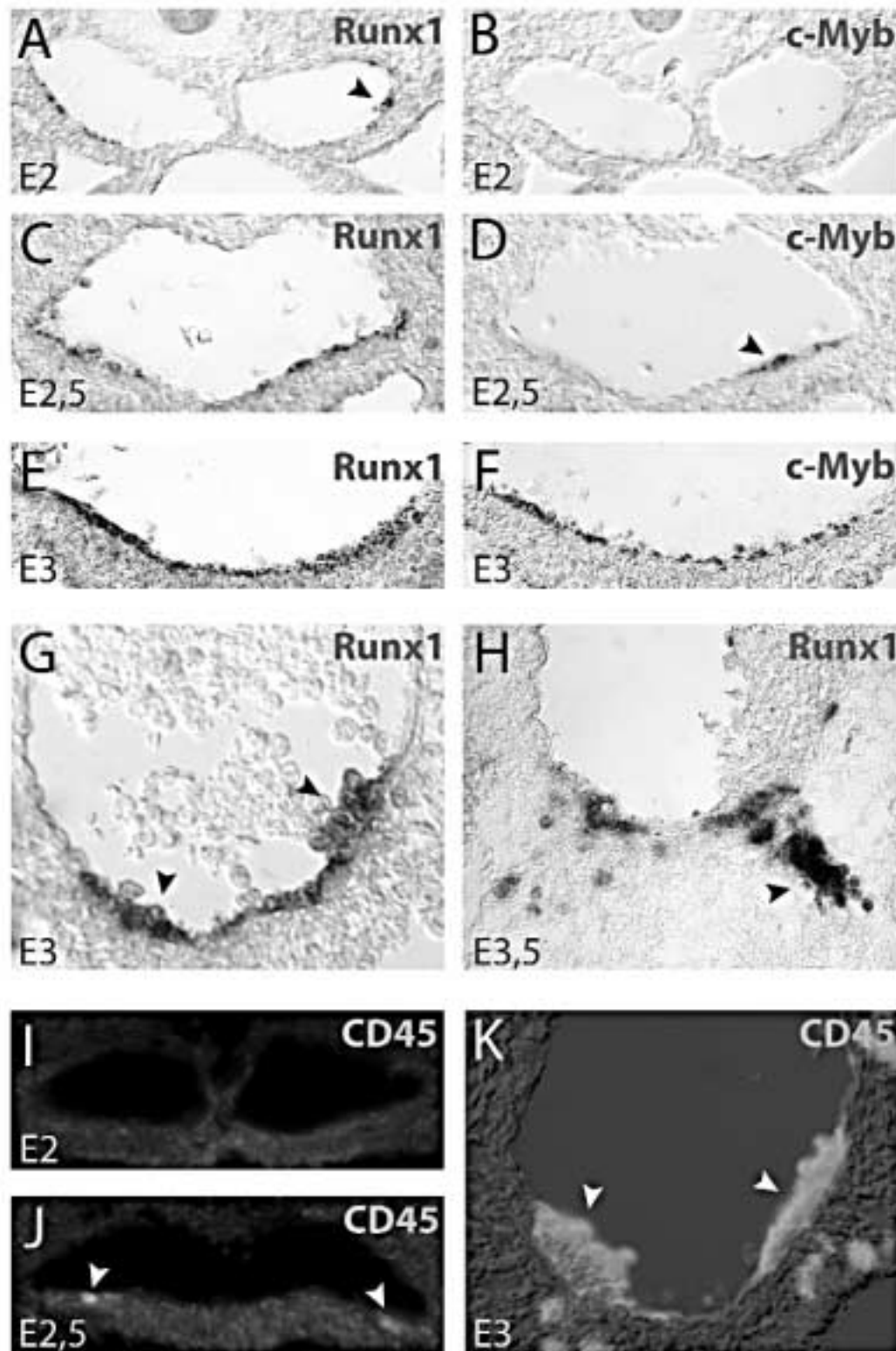


FIG. 1. – Caractérisation moléculaire des étapes de différenciation de l'endothélium homogène.

A à F. Expression de RUNX1 (colonne de gauche) et c-Myb (colonne de droite) caractérisée par hybridation *in situ* sur coupes adjacentes à E2 (A et B), à E2,5 (C et D) et à E3 (E et F).

G et H. Expression de RUNX1 dans les CSH bourgeonnant à E3 (G) et dans le mésenchyme sous-aortique à E3,5 (H).

I à K. Expression de CD45 révélée par immunodétection à E2 (I), à E2,5 (J) et à E3 (K).

une augmentation de l'expression de RUNX1 et une extension de l'expression des marqueurs hématopoïétiques à l'ensemble des cellules exprimant RUNX1 (Fig. 1E et 1F). Les CE hémogéniques changent de forme, s'épaississent, témoignant d'une transition morphologique entre CE plates et CSH rondes. Finalement, les cellules bourgeonnent dans la lumière de l'aorte ou ingressent dans le mésenchyme sous-jacent (Fig. 1G et 1H). Elles ont alors une morphologie ronde, expriment fortement RUNX1, c-Myb, PU.1 et CD45 mais n'expriment plus le VEGF-R2 ni la VE-cadhérine. D'après leur localisation très latérale, les premières cellules bourgeonnantes semblent correspondre aux premières cellules ayant exprimé RUNX1 au stade des aortes paires. L'ensemble de ces données montre que l'expression de RUNX1 préfigure la maturation des CE hémogéniques. L'hématopoïèse aortique se déroule ensuite selon un continuum d'états de transition moléculaires et morphologiques entre CE et CSH. Enfin, il semble que ce processus, qui se déroule en 24 h à 36 h, soit finement régulé dans le temps et dans l'espace selon un gradient antéro-postérieur et latéro-ventral corrélé à la morphogénèse de l'aorte.

RUNX1 initie-t-il ce processus? Est-il impliqué dans la perte de l'identité endothéliale des CE hémogéniques? Est-il impliqué dans l'acquisition et/ou le maintien de l'identité hématopoïétique? A-t-il un rôle plus tardif dans l'acquisition et/ou le maintien par les CSH de leur potentiel de différenciation et d'aurenouvement? Ces questions sont difficiles à aborder car les différentes études biochimiques et fonctionnelles semblent indiquer que RUNX1 peut potentiellement être impliqué à tous les niveaux dans ce processus. La protéine RUNX1 a, en effet, une structure moléculaire complexe lui permettant de réguler l'expression des gènes à différents niveaux et par des stratégies multiples (Ito *et al.*, 1999; Telfer & Rothenberg, 2001; Perry *et al.*, 2002; Kurokawa & Hirai, 2003; Durst & Hiebert, 2004). RUNX1 peut à la fois activer ou inhiber la transcription de ses gènes cibles. Son activité transcriptionnelle est conditionnée par sa capacité à interagir avec un grand nombre de cofacteurs ou de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation endothéliale ou hématopoïétique. En outre, il existe chez les mammifères plus d'une dizaine d'isoformes possibles de RUNX1 dans lesquelles des domaines essentiels de la protéine sont délétés. RUNX1 possède également des propriétés d'attachement à la matrice nucléaire et peut participer à la localisation subnucléaire de complexes transcriptionnels. Enfin, certaines de ses interactions, notamment avec les histones déacétylases, lui permettent d'inhiber l'expression des gènes de façon épigénétique par modification de la chromatine. Une étude récente montre, dans un contexte cellulaire, que la forme transcriptionnellement active de RUNX1 est nécessaire à la production de CSH à partir de CE hémogéniques (Goyama *et al.*, 2004). Bien que ces résultats n'excluent pas l'implication de RUNX1 dans d'autres types de régulations (épigénétiques par exemple), il semble que le facteur soit nécessaire pour réguler (activer ou inhiber) le programme génétique des CE hémogéniques. En accord

avec cette hypothèse l'absence de CBF β , cofacteur nécessaire à l'activité transcriptionnelle de RUNX1, provoque chez des embryons de souris mutantes le même phénotype que celui obtenu en l'absence de RUNX1. Nous avons cloné le gène codant pour CBF β chez l'Oiseau et analysé son expression au cours de la différenciation du plancher de l'aorte. Nous avons été surpris de voir que l'expression de CBF β n'est pas détectable dans les premières étapes de différenciation des CE. L'expression du cofacteur semble s'initier plus tardivement, entre E2,5 et E3, et augmente significativement dans les CSH bourgeonnantes. Il pourrait s'agir ici d'un niveau de régulation supplémentaire de la fonction de RUNX1 au cours de l'hématopoïèse aortique.

MISE AU POINT D'UN SYSTÈME D'ANALYSE FONCTIONNELLE DE L'ENDOTHÉLIUM HÉMOGÉNIQUE : TRANSFECTION *IN VIVO* DES CE

Les analyses transgéniques réalisées chez la souris sont aujourd'hui les seules études fonctionnelles visant à perturber *in vivo* la production des CSH. Ces approches, souvent longues, ne sont pas utilisables pour analyser la fonction des acteurs multiples d'un complexe transcriptionnel ou l'implication de différentes isoformes d'une même molécule. La compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la production des CSH nécessitait donc la mise au point d'un système efficace de transfert de gène *in vivo* dans les CE, permettant de réaliser facilement des pertes ou des gains de fonction sur RUNX1, ses isoformes ou ses partenaires. Dans ce but, nous avons développé une méthode de transfection des CE *in vivo* chez l'embryon d'Oiseau. L'approche consiste à injecter dans la circulation, par voie intra-cardiaque, des liposomes véhiculant des acides nucléiques (lipoplexes) (Fig. 2A). Nous utilisons une formulation lipidique originale (Byk *et al.*, 2001) permettant une efficacité maximale de transfert de gène sans toxicité. L'injection dans la circulation, et donc le contact entre l'inoculat et les CE, permet de cibler l'endothélium vasculaire *sensu stricto*. Lorsque de tels lipoplexes sont couplés à la rhodamine et injectés à E3, on peut visualiser leur distribution dans l'ensemble de l'arbre vasculaire embryonnaire (Fig. 2B et 2C) ou extra-embryonnaire (Fig. 2D). Cette méthode permet de surexprimer dans les CE tout cDNA porté par un simple vecteur d'expression plasmidique avec la précision spatiotemporelle imposée par notre étude. Après l'injection de liposomes véhiculant un plasmide d'expression de la GFP, on peut visualiser les CE GFP⁺ dans tout le réseau endothélial (Fig. 2E-G). Si les embryons sont transfectés à E2, on observe à E3 un ciblage efficace de l'endothélium hémogénique et le bourgeonnement de CSH CD45⁺ exprimant la GFP (Fig. 2H et 2I).

Pour valider cette technique sur le plan fonctionnel, nous avons surexprimé le facteur angiogénique VEGF122 à E3 et observé son effet sur la mise en place des vais-

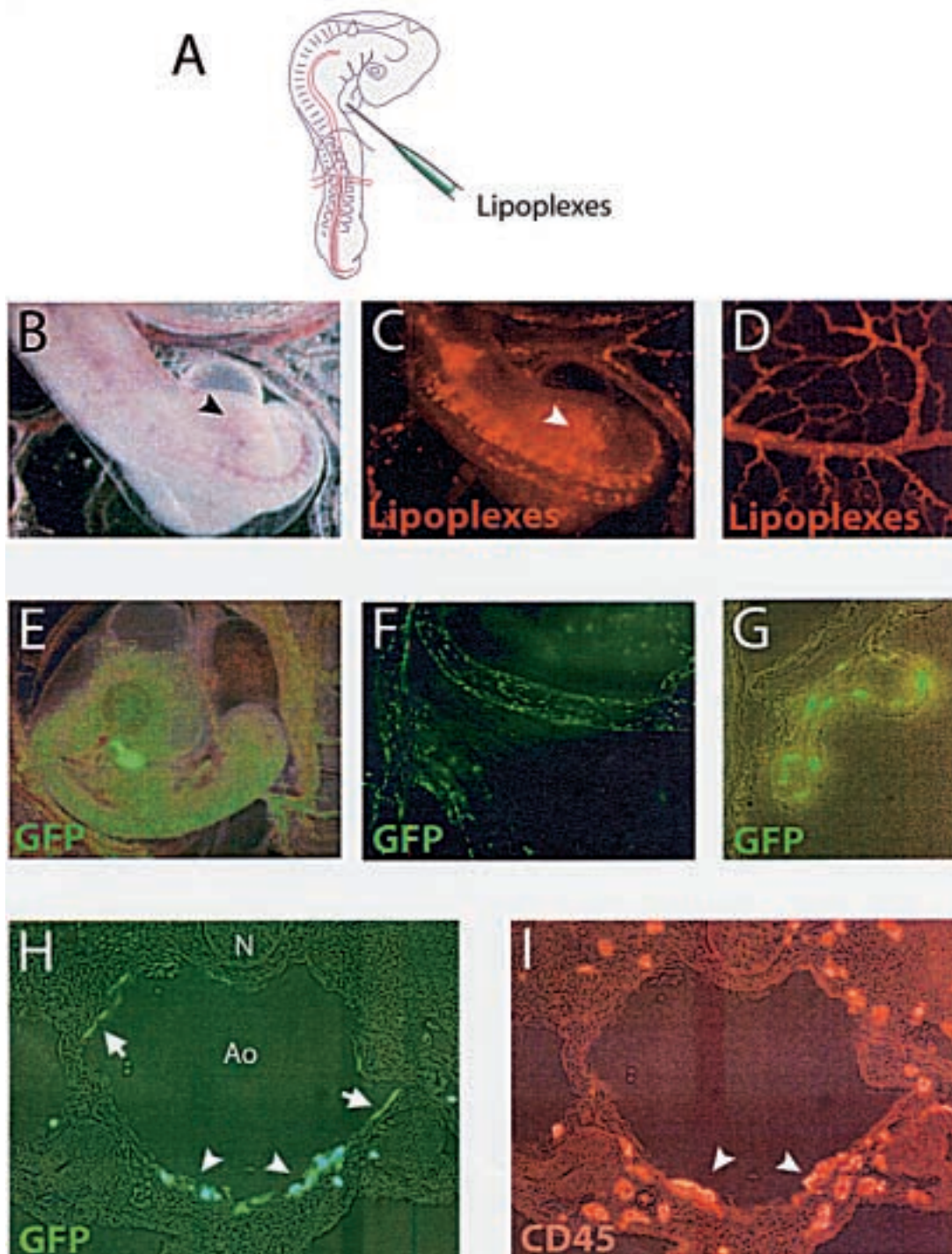


FIG. 2. – Système de transfert de gène *in vivo* dans l'arbre vasculaire de l'embryon d'oiseau.

A. Schéma de l'injection des lipoplexes (liposomes + acides nucléiques) par voie intra-cardiaque à E3.

B à D. Distribution des lipoplexes couplés à la rhodamine dans le réseau vasculaire intra- (B et C : partie postérieure de l'embryon) et extra-embryonnaire (D : détail du sac vitellin).

E à G. Expression de la GFP 24 h après transfection à E3. La GFP est exprimée dans l'ensemble du réseau vasculaire intra- (E : embryon *in toto*) et extra-embryonnaire (F : gros plan des artères vitellines et G : coupe au niveau d'un vaisseau).

H et I. Transfection au niveau de l'endothélium aortique 24 h après injection à E2. Double marquage par la GFP (H) et l'anticorps anti-CD45 (I). H : la GFP est exprimée par les CE (flèches) et par les CSH bourgeonnant dans la lumière du vaisseau (tête de flèche). I : détection de l'expression de CD45 au niveau des bourgeonnements intra-aortiques montrés en H (têtes de flèche). Le marquage détecté en dehors de l'aorte correspond aux macrophages tissulaires.

seaux. En analysant les embryons à E6, nous avons constaté des modifications sévères de la formation des vaisseaux intra- et extra-embryonnaires. Nous avons également testé la possibilité d'utiliser ce système pour mener des expériences de perte de fonction par ARN interférence. Les résultats obtenus montrent que les liposomes permettent un transfert très efficace de siRNA dans les CE. En outre, lorsque des siRNA dirigés contre la GFP sont co-transfectés avec un plasmide exprimant la GFP, on observe une extinction spécifique de la GFP.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

RUNX1 est une protéine «organisatrice» modulant l'assemblage, l'adressage et l'activité des complexes transcriptionnels. En accord avec ce modèle, le dosage de RUNX1 est particulièrement important aussi bien durant l'hématopoïèse que dans le développement des leucémies (Cai *et al.*, 2000; Lacaud *et al.*, 2004). Notamment, certaines leucémies sont directement corrélées à l'haplo-insuffisance de RUNX1 ou à une amplification de son locus (Speck & Gilliland, 2002). Ainsi, sa fonction normale au cours de l'hématopoïèse, ou son potentiel oncogénique ne peuvent être pleinement compris *in vivo* qu'en intégrant des données concernant ses activités biochimiques. Le système de transfert de gène que nous avons mis au point offre la possibilité de combiner des expériences de perte ou de gain de fonction de plusieurs molécules. Nous allons le mettre en œuvre pour une analyse détaillée de l'implication de RUNX1 et de ses partenaires dans la différenciation de l'endothélium hémogénique. Le système constitue en effet, par rapport au système transgénique murin, une alternative rapide pour tester l'impact de formes moléculaires sauvages ou transformantes sur la différenciation hématopoïétique liée à l'endothélium ou à la physiologie vasculaire. En outre, nous avons pu adapter ce système à l'embryon de Souris, ouvrant ainsi de nouvelles voies d'investigation non seulement chez l'Oiseau mais aussi chez les Mammifères.

Ce travail a été subventionné par le CNRS, l'INSERM, les Universités Pierre et Marie Curie et René Descartes et l'ENSCP ainsi que par l'Association pour la Recherche contre le Cancer (contrat n° 3312), la Ligue Régionale Contre le Cancer (comité de Paris) et l'ACI n° 22-2002-296. K. B. est bénéficiaire du Ministère de la Recherche et de la Technologie, de l'Association pour la Recherche Contre le Cancer, de la Ligue Nationale contre le Cancer et de la Société Française d'Hématologie.

BIBLIOGRAPHIE

- de Bruijn M. F., Speck N. A., Peeters M. C. & Dzierzak E., Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity*, 2002, 16, 673-683.
- Byk G., Scherman D., Schwartz B. & Dubertret C., in US Patent 6 171 6122001.
- 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.
- Cai Z., de Bruijn M., Ma X., Dortland B., Luteijn T., Downing J. R. & Dzierzak E., Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity*, 2000, 13, 423-431.
- Ciau-Uitz A., Walmsley M. & Patient R., Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell*, 2000, 102, 787-796.
- Cormier F. & Dieterlen-Lièvre F., The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development*, 1988, 102, 279-285.
- Cumano A., Dieterlen-Lièvre F. & Godin I., Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*, 1996, 86, 907-916.
- Durst K. L. & Hiebert S. W., Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene*, 2004, 23, 4220-4224.
- Godin I. E., Garcia-Porrero J. A., Coutinho A., Dieterlen-Lièvre F. & Marcos M. A., Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature*, 1993, 364, 67-70.
- Goyama S., Yamaguchi Y., Imai Y., Kawazu M., Nakagawa M., Asai T., Kumano K., Mitani K., Ogawa S., Chiba S., Kurokawa M. & Hirai H., The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood*, 2004, 104, 3558-3564.
- Hernandez-Munain C. & Krangel M. S., Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 473-483.
- Ito Y., Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells*, 1999, 4, 685-696.
- 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.
- Kurokawa M. & Hirai H., Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci.*, 2003, 94, 841-846.
- Lacaud G., Kouskoff V., Trumble A., Schwantz S. & Keller G., Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon *in vitro* differentiation of ES cells. *Blood*, 2004, 103, 886-889.
- Lassila O., Eskola J., Toivanen P., Martin C. & Dieterlen-Lièvre F., The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimaeras. *Nature*, 1978, 272, 353-354.
- Medvinsky A. L., Samoylina N. L., Muller A. M. & Dzierzak E. A., An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature*, 1993, 364, 64-67.
- Medvinsky A. & Dzierzak E., Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 1996, 86, 897-906.
- Mukoyama Y., Chiba N., Hara T., Okada H., Ito Y., Kanamaru R., Miyajima A., Satake M. & Watanabe T., The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev. Biol.*, 2000, 220, 27-36.
- North T., Gu T., Stacy T., Wang Q., Howard L., Binder M., Marin-Padilla M. & Speck N. A., *Cbfa2* is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development*, 1999, 126, 2563-2575.
- North T., de Bruijn M. F., Stacy T., Talebian L., Lind E., Robin C., Binder M., Dzierzak E. & Speck N. A., Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity*, 2002, 16, 661-672.

- Oberlin E., Tavian M., Blazsek I. & Péault B., Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*, 2002, 129, 4147-4157.
- Okada H., Watanabe T., Niki M., Takano H., Chiba N., Yanai N., Tani K., Hibino H., Asano S., Mucenski M. L., Ito Y., Noda T. & Satake M., AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene*, 1998, 17, 2287-2293.
- Okuda T., van Deursen J., Hiebert S. W., Grosveld G. & Downing J. R., AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 1996, 84, 321-330.
- Peault B. & Tavian M., Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2003, 996, 132-140.
- Perry C., Eldor A. & Soreq H., Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. *Leuk. Res.*, 2002, 26, 221-228.
- Petrovick M. S., Hiebert S. W., Friedman A. D., Hetherington C. J., Tenen D. G. & Zhang D. E., Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 3915-3925.
- Sasaki K., Yagi H., Bronson R. T., Tominaga K., Matsunashi T., Deguchi K., Tani Y., Kishimoto T. & Kamori T., Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 12359-12363.
- Speck N. A. & Gilliland D. G., Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 502-513.
- 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. & Peault B., Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 1996, 87, 67-72.
- Telfer J. C. & Rothenberg E. V., Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev. Biol.*, 2001, 229, 363-382.
- Turpen J. B., Knudson C. M. & Hoefen P. S., The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cytogenetically labeled tissue anlagen: localization of a prospective stem cell compartment. *Dev. Biol.*, 1981, 85, 99-112.
- Wang O., Stacy T., Miller J. D., Lewis A. F., Gu T. L., Huang X., Bushweller J. H., Bories J. C., Alt F. W., Ryan G., Liu P. P., Wynshaw-Boris A., Binder M., Marin-Padilla M., Sharpe A. H. & Speck N. A., The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function *in vivo*. *Cell*, 1996, 87, 697-708.
- Wang Q., Stacy T., Binder M., Marin-Padilla M., Sharpe A. H. & Speck N. A., Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 3444-3449.
- Yokomizo T., Ogawa M., Osato M., Kanno T., Yoshida H., Fujimoto T., Fraser S., Nishikawa S., Okada H., Satake M., Noda T., Nishikawa S. & Ito Y., Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells*, 2001, 6, 13-23.