

Identification, émergence et mobilisation des cellules endothéliales circulantes chez l'embryon

par Luc Pardanaud

INSERM U36, Collège de France, 11, Place Marcelin Berthelot, 75005 Paris.

E-mail : luc.pardanaud@college-de-france.fr

Reçu le 15 décembre 2004

RÉSUMÉ

Au moyen de parabioses caille-poulet en utilisant comme marqueur l'anticorps monoclonal QH1, spécifique des cellules endothéliales et hématopoïétiques de la caille, nous mettons en évidence des cellules endothéliales circulantes chez l'embryon. Dans des conditions normales, ces cellules intègrent les endothéliums dans un grand nombre de tissus mais en assez faible quantité. Lorsque des réponses angiogéniques expérimentales sont créées, telles que des greffes sur la membrane chorioallantoïdienne ou des blessures, les cellules

endothéliales circulantes sont rapidement mobilisées dans les territoires concernés et leur nombre augmente de manière très importante. Notre travail montre de plus que ces cellules circulantes émergent très précocement chez l'embryon, avant le troisième jour embryonnaire chez l'oiseau, et que leur mobilisation est indépendante de la présence de la moelle osseuse puisque elle est effective avant que celle-ci ne commence à se différencier.

SUMMARY Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells in the embryo

Using quail-chick parabiosis and the QH1 monoclonal antibody, specific for the endothelial and hematopoietic cells of the quail species, as a marker, we identified circulating endothelial cells in the embryo. In normal conditions, these cells could integrate endothelia in many tissues but their number remained low. When artificial angiogenic responses were created, *i.e.*, in grafting experiments on the chorioallantoic membrane or wound healing, the circulating endothelial

cells were rapidly mobilized to reach the embryonic regions submitted to these processes and their number dramatically increased. Interestingly, 1) on one hand, these circulating endothelial cells were present early in ontogeny, before the third embryonic day in the quail embryo; 2) on the other hand, their mobilization was not dependent on the presence of the bone marrow since it was effective before the differentiation of this tissue.

INTRODUCTION

Des études récentes montrent que des précurseurs endothéliaux sont présents dans le sang adulte (Asahara *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Peichev *et al.*, 2000). *In vitro* ces cellules se différencient en cellules endothéliales, *in vivo* ces précurseurs peuvent être incorporés dans des sites de néovascularisation. Sur le plan thérapeutique, ces cellules circulantes pourraient être utilisées pour acheminer des molécules anti- ou pro-angiogéniques à des sites d'angiogenèse pathologique ou physiologique.

Qu'en est-il chez l'embryon ? Dans un système de greffes caille-poulet (Le Douarin, 1969) et en utilisant comme marqueur l'anticorps monoclonal QH1, spécifique des cellules endothéliales et hématopoïétiques de la caille (Pardanaud *et al.*, 1987), le groupe de F. Dieterlen a montré que lorsque des allantoïdes d'embryons de

caille sont greffées dans le cœlome d'embryons de poulet hôtes, le territoire transplanté produit des cellules endothéliales et hématopoïétiques capables, de coloniser la moelle osseuse. Compte tenu de l'éloignement entre le site de greffe (le cœlome) et le site d'essaimage (la moelle osseuse), il fut postulé que cette colonisation se faisait *via* la circulation sanguine (Caprioli *et al.*, 1998). Il nous semblait intéressant de développer une approche expérimentale directe pour étayer cette hypothèse.

SURVIE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES DANS LA CIRCULATION

En utilisant le système caille-poulet, nous avons, en premier lieu, vérifié que des angioblastes ou des cellules endothéliales conservent leurs capacités de différen-

tion et de colonisation lorsqu'ils sont injectés dans la circulation. Des suspensions cellulaires de somites ou de mésoderme splanchnopleural de caille, deux territoires identifiés comme sources de cellules endothéliales (Pardanaud *et al.*, 1996), ont été injectées dans le cœur d'un embryon de poulet hôte à trois jours de développement (E3). Le lendemain, l'hôte est sacrifié et les cellules endothéliales QH1⁺ sont recherchées sur coupes histologiques dans les tissus de poulet. Les résultats mettent en évidence que des cellules endothéliales de caille sortent des vaisseaux, migrent par voie interstitielle pour participer à la vascularisation de l'hôte démontrant que des angioblastes ou des cellules endothéliales survivent et conservent leurs propriétés lorsqu'ils sont introduits dans la circulation embryonnaire.

IDENTIFICATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CIRCULANTES

Pour démontrer la présence de cellules endothéliales circulantes chez l'embryon, des parabioses caille-poulet (Fig. 1) ont été réalisées avec des embryons de 48 h : de l'albumen ayant été retiré de l'œuf de poulet, le jaune fécondé de l'œuf de caille est déposé à côté du jaune de poulet. Après 5 jours d'incubation, des connexions vasculaires commencent à s'établir entre les deux membranes chorioallantoïdiennes (CAM) et les cellules sanguines originaires de la caille peuvent voyager dans les vaisseaux du poulet. Pour établir la présence de connexions vasculaires entre les deux embryons, des frottis sont réalisés avec du sang prélevé au niveau de la CAM ou du sac vitellin de l'embryon de poulet. L'immunocytochimie avec QH1 permet alors de repérer les éventuelles cellules positives originaires de la caille (Fig. 2). Les partenaires sont isolés 8 jours après la parabiose alors que la moelle osseuse est déjà différenciée. Dans ces conditions, l'analyse histologique avec QH1 montre que des cellules endothéliales de caille QH1⁺ circulent et conservent leurs capacités de différenciation et de colonisation. Elles sont retrouvées dans de nombreux territoires embryonnaires de poulet, quelle que soit leur origine ectodermique, mésodermique ou endodermique, mais toujours en faible nombre (Fig. 3).

ÉMERGENCE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CIRCULANTES

Afin de préciser le stade d'émergence des cellules endothéliales circulantes et notamment si elles sont présentes avant la différenciation de la moelle osseuse, une technique de parabiose *in vitro* sur milieu gélosé a été mise au point. Un blastoderme de caille et un autre de poulet sont placés sur un milieu semi solide dans une boîte de Pétri et sont mis en contact par l'intermédiaire de leur aire vasculaire préalablement sectionnée au niveau du sinus marginal périphérique. Placés à 37°C les deux embryons établissent des anastomoses vasculaires

qui permettent aux cellules hématopoïétiques de voyager d'un embryon à l'autre mais aussi à des cellules endothéliales QH1, rares, de coloniser les endothéliums du poulet (Fig. 4). Cette expérience met donc en évidence que des cellules endothéliales circulent très tôt au cours du développement embryonnaire. Une étude récente va dans ce sens en montrant, au moyen d'infections rétrovirales, que des cellules endothéliales issues des îlots sanguins extraembryonnaires participent à la vascularisation précoce des embryons (La Rue *et al.*, 2003).

Pour confirmer cette émergence précoce des cellules endothéliales circulantes, dans une deuxième approche, du sang d'embryons de caille a été récolté à différents stades de développement et les cellules blanches ont été isolées sur un gradient de Ficoll. Ces cellules sont injectées par voie intracardiaque dans la circulation d'embryons de poulet hôtes à E2. Les résultats montrent qu'à partir de sang d'embryons de caille à E3, E4, E5 et E15 des cellules endothéliales QH1⁺ participent à la vascularisation de l'hôte, notamment dans la tête, les viscères et le sac vitellin, et sont retrouvées viables dans l'embryon de poulet, longtemps après l'injection au-delà de E12. Des angioblastes ou leurs progéniteurs sont donc bien présents dans la circulation sanguine et survivent tout au long de la vie embryonnaire.

RÔLE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CIRCULANTES

L'existence des cellules endothéliales circulantes étant établie, quel(s) rôle(s) peuvent-elles jouer au cours du développement ?

Dans une première approche, la mobilisation de ces cellules a pu être mise en évidence au cours du processus d'angiogenèse. Au sein d'une parabiose à E10, des bourgeons de membres (Fig. 5) ou de viscères de poulet prélevés à E3 sont greffés sur la CAM de l'embryon de poulet. Après un à neuf jours, l'analyse immunohistochimique avec QH1 montre une participation importante des cellules endothéliales circulantes de caille aux endothéliums des organes greffés. Une observation intéressante concerne le nombre de cellules endothéliales QH1⁺ envahissant les greffons qui se trouve être significativement plus important au sein des membres qu'au sein des viscères. Cela s'explique par le fait que les bourgeons de membres étant soumis au processus d'angiogenèse (Pardanaud *et al.*, 1989), ils sont tributaires de la migration d'un contingent complet de cellules endothéliales pour assurer leur survie, tandis que les viscères, soumis au processus de vasculogenèse (Pardanaud *et al.*, 1989), possèdent leur propre contingent de précurseurs endothéliaux et réclament une participation moindre des cellules endothéliales extrinsèques pour assurer une connexion rapide avec le réseau vasculaire de la CAM.

Dans une seconde approche, la cinétique de la mobilisation des cellules endothéliales circulantes a été étudiée au cours du processus de cicatrisation. Des parabioses à E13 ont subi une blessure au niveau d'une des

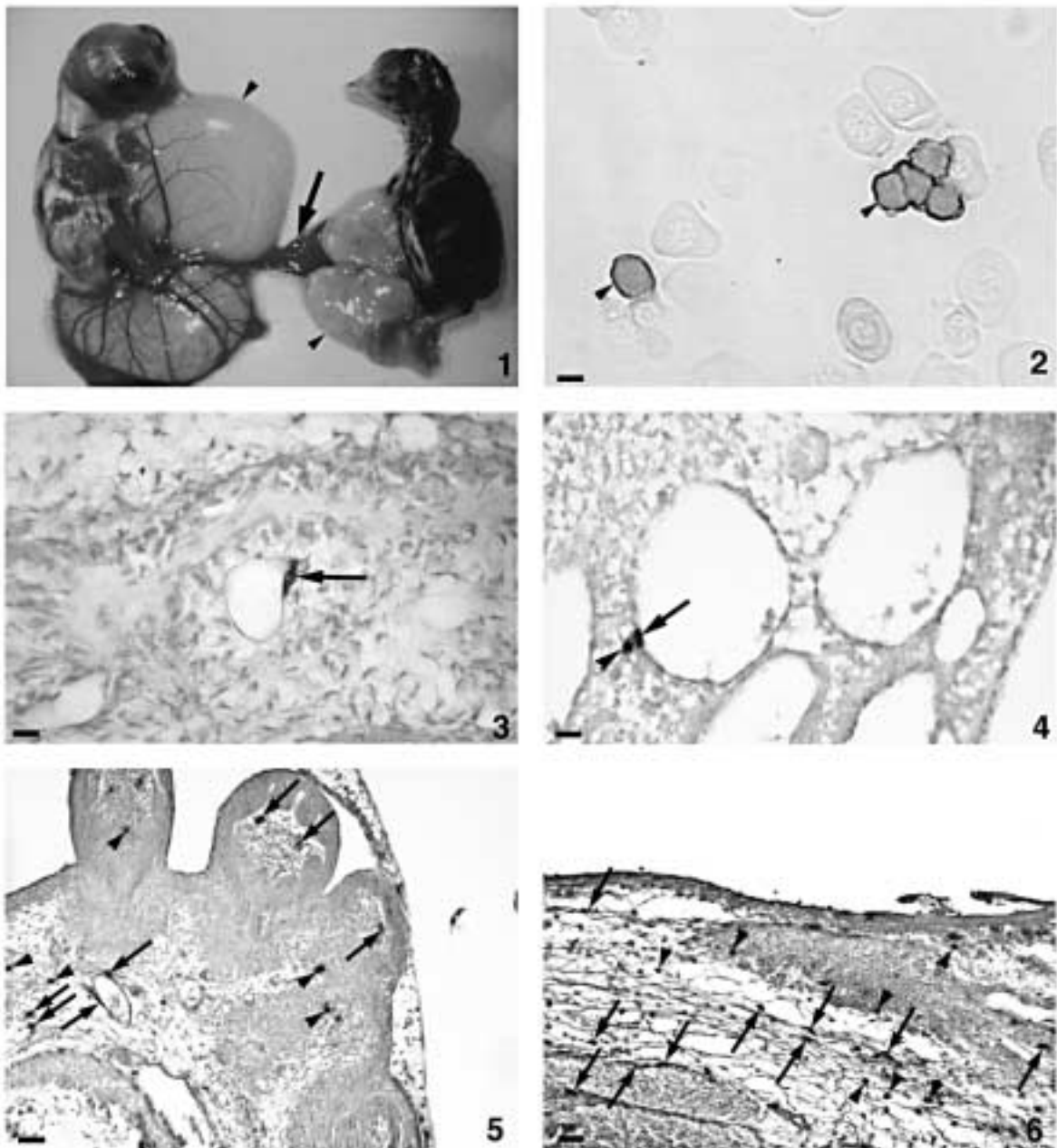


FIG. 1. – Aspect d'une parabiose à E15 une fois sortie de l'œuf. Les embryons, le poulet à gauche et la caille à droite, isolés avec leur sac vitellin (têtes de flèche), ont établi des connexions vasculaires *via* leur CAM respective (flèche).

FIG. 2. – Immunocytochimie avec QH1 réalisée sur un frottis sanguin d'un embryon de poulet issu d'une parabiose à E8. Les cellules de caille QH1⁺ (têtes de flèche), présentes dans le sang du poulet, témoignent de la présence de connexions vasculaires entre les deux embryons. Barre = 25 μ m.

FIG. 3. – Immunohistochimie avec QH1 réalisée sur une coupe transversale de cerveau d'un embryon de poulet issu d'une parabiose à E12. Une cellule endothéliale QH1⁺ (flèche) est intégrée dans un endothélium de poulet. Barre = 50 μ m.

FIG. 4. – Immunohistochimie avec QH1 réalisée sur une coupe transversale d'un embryon de poulet à E3 issu d'une parabiose réalisée à E2. Au niveau de l'aorte qui est double à ce stade, une cellule endothéliale QH1⁺ est intégrée à l'endothélium QH1⁻ de poulet (flèche). Une cellule hématopoïétique QH1⁺ a également migré dans le mésenchyme périaortique (tête de flèche). Barre = 50 μ m.

FIG. 5. – Coupe transversale de membre de poulet greffé pendant 9 jours sur la CAM d'un embryon de poulet issu d'une parabiose à E15. Immunohistochimie avec QH1. De nombreuses cellules endothéliales circulantes QH1⁺ (flèches) vascularisent le greffon où se retrouvent également des cellules hématopoïétiques QH1⁺ (têtes de flèche). Barre = 125 μ m.

FIG. 6. – Coupe transversale de membre de poulet, issu d'une parabiose à E14, ayant subi une blessure la veille. Immunohistochimie avec QH1. De nombreuses cellules endothéliales QH1⁺ (flèches) participent à la cicatrisation du membre blessé. Des cellules hématopoïétiques QH1⁺ envahissent aussi le tissu (têtes de flèche). Barre = 125 μ m.

ailes de l'embryon de poulet. Les résultats montrent que rapidement, dès 6 h après l'opération, un nombre significativement plus important de cellules endothéliales QH1⁺ se retrouve dans les endothéliums du membre blessé par rapport au nombre de cellules endothéliales QH1⁺ comptabilisé dans les membres témoins, non opérés (Fig. 6, Tableau I). Ce nombre reste à un niveau comparable, au moins jusqu'à 48 h après l'opération, dernier stade choisi pour cette cinétique dans la mesure où, au-delà, l'embryon de caille est alors près d'éclore (Tableau I). Dans tous les cas, la mobilisation des cellules endothéliales circulantes QH1⁺ se restreint exclusivement au membre blessé puisque le nombre de cellules endothéliales qui envahit le membre controlatéral ou d'autres organes tels que le cœur et le foie (Tableau I) reste équivalent au nombre de cellules endothéliales QH1⁺ répertorié dans les tissus contrôles correspondants.

MOBILISATION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CIRCULANTES EN ABSENCE DE MOELLE OSSEUSE

Afin de déterminer si la mobilisation des cellules endothéliales circulantes QH1⁺ est possible avant la différenciation de la moelle osseuse, les greffés sur CAM de bourgeons de membres de poulet ainsi que l'opération consistant à blesser une aile de l'embryon de poulet ont été réalisées dans des parabioses entre E6 et E8. Dans tous les cas, l'analyse immunohistochimique est entreprise à E9, un stade pour lequel la moelle osseuse de l'embryon de caille n'est pas encore différenciée. Dans ces conditions, des cellules endothéliales circulantes QH1⁺ colonisent les

greffons ou envahissent le membre blessé. En ce qui concerne l'expérience de blessure (Tableau II), leur nombre est certes restreint par rapport à celui observé avec le même protocole à E13, mais est significativement plus important que le nombre de cellules endothéliales QH1⁺ immigrantes comptabilisé dans les ailes témoins ou controlatérales (Tableau II). Il apparaît donc que la présence de la moelle osseuse n'est pas indispensable à la mobilisation des cellules endothéliales circulantes.

CONCLUSION

Ces travaux sur les cellules endothéliales circulantes montrent qu'elles émergent très tôt au cours de l'ontogenèse mais que leur participation au processus de vascularisation est mineure dans des conditions physiologiques normales. En revanche les cellules endothéliales circulantes embryonnaires sont mobilisables au cours de processus nécessitant une néoangiogenèse et leur nombre croît alors considérablement. Cette étude met également en lumière que la mobilisation de ces cellules circulantes est effective alors même que la moelle osseuse n'est pas encore différenciée. Ce dernier point est en corrélation avec des travaux récents, menés chez l'adulte, montrant que la moelle osseuse ne semble pas être la source des cellules endothéliales circulantes capables d'assurer la néovascularisation dans des processus tumoraux ou ischémiques (Beck *et al.*, 2003; Gothert *et al.*, 2004; Hillebrands *et al.*, 2002; Machein *et al.*, 2003; Rajantie *et al.*, 2004; Voswinckel *et al.*, 2003). Elle apparaît plutôt comme une niche recelant des précurseurs des cellules du mur vasculaire et des cellules hématopoïétiques

Tableau I. – Par rapport aux témoins (histogramme noir) la concentration de cellules endothéliales QH1⁺ est significativement plus importante tout au long de la cinétique dans les ailes blessées (histogrammes gris foncé; $p = 0,02$ à 6 h, $p = 0,002$ à 12 h, $p = 0,02$ à 24 h et $p = 0,008$ à 48 h). Cette différence significative s'observe aussi lorsque ces mesures sont comparées avec celles des membres controlatéraux (histogrammes gris clair; $p = 0,01$ à 6 h, $p = 0,02$ à 12 h, $p = 0,03$ à 24 h et $p = 0,008$ à 48 h).

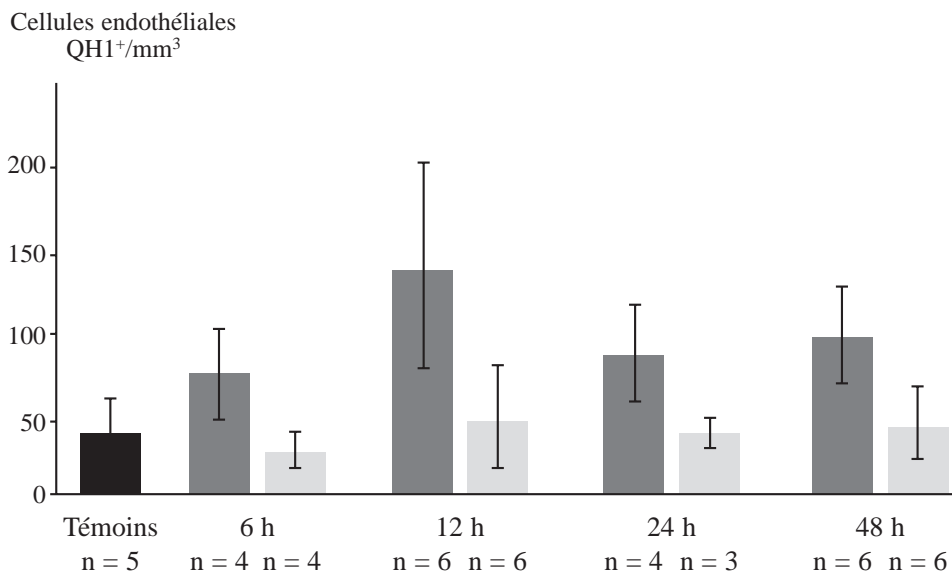
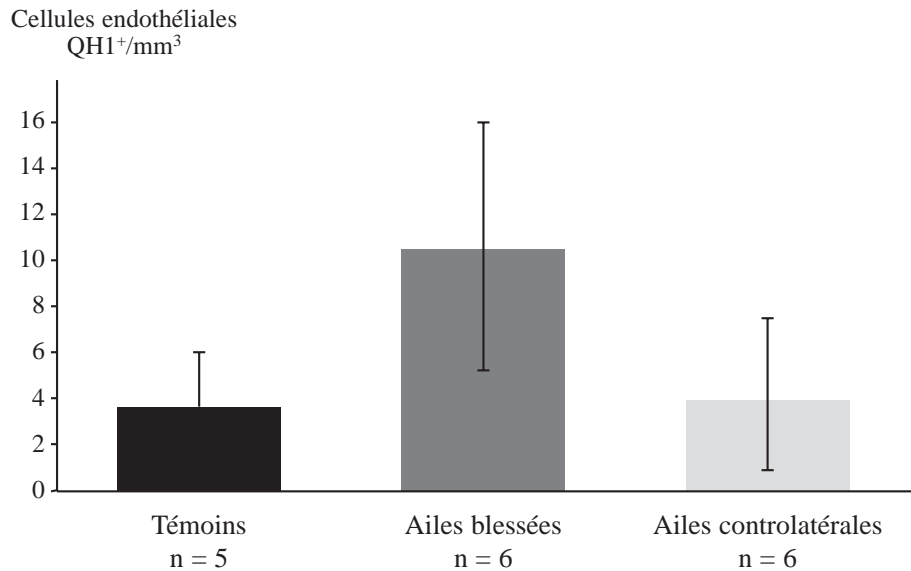


TABLEAU II. – La concentration de cellules endothéliales QH1⁺ est significativement plus importante dans les ailes blessées (histogramme gris foncé, $p = 0,02$) par rapport aux ailes témoins (histogramme noir). Cette différence significative s'observe aussi lorsque ces mesures sont comparées avec celles des membres controlatéraux (histogramme gris clair $p = 0,05$).



directement mobilisés au cours des processus de néoangiogenèse (Rajantie *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAPHIE

- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., Van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schattemen G. & Isner J. M., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275, 964-967.
- Beck H., Voswinckel R., Wagner S., Ziegelhoeffer T., Heil M., Helisch A., Schaper W., Acker T., Hatzopoulos A. K. & Plate K. H., Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2003, 23, 709-717.
- 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.
- Gothert J. R., Gustin S. E., Van Eekelen J. A., Schmidt U., Hall M. A., Jane S. M., Green A. R., Gottgens B., Izon D. J. & Begley C. G., Genetically tagging endothelial cells *in vivo*: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood*, 2004, 104, 1769-1777.
- Hillebrands J. L., Klatter F. A., Van Dijk W. D. & Rozing J., Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis. *Nat. Med.*, 2002, 8, 194-195.
- La Rue A. C., Lansford R. & Drake C. J., Circulating blood island-derived cells contribute to vasculogenesis in the embryo proper. *Dev. Biol.*, 2003, 262, 162-172.
- Le Douarin N. M., Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme « marquage biologique » dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogenèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 1969, 103, 435-452.
- Lin Y., Weisdorf D. J., Solovey A. & Heibel R. P., Origin of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105, 71-77.
- Machein M. R., Renninger S., de Lima-Hahn E. & Plate K. H., Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol.*, 2003, 13, 582-597.
- 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 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.
- Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M. C., Hicklin D. J., Witte L., Moore M. A. S. & Rafii S., Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95, 952-958.
- Rajantie I., Ilmonen M., Alminaita A., Ozerdem U., Alitalo K. & Salven P., Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*, 2004, 104, 2084-2086.
- Takahashi T., Kalca C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearny M., Magner M., Isner J. M. & Asahara T., Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*, 1999, 5, 434-438.
- Voswinckel R., Ziegelhoeffer T., Heil M., Kostin S., Breier G., Mehling T., Haberberger R., Clauss M., Gaumann A., Schaper W. & Seeger W., Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth. *Circ. Res.*, 2003, 93, 372-379.