

## L'embryologie des vaisseaux

Luc Pardanaud  
Delphine Moyon  
Anne Eichmann

**Comprendre comment se forme le réseau endothélial et débroussailler les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de ce processus constituent des enjeux très importants dans la perspective de l'angiogenèse thérapeutique. C'est pourquoi, l'étude de la mise en place du réseau endothélial chez l'embryon revêt un intérêt d'autant plus évident que les processus impliqués au cours de l'ontogenèse endothéliale doivent être, sinon similaires, du moins proches de ceux mis en œuvre lors des processus d'angiogenèse pathologique. Cette revue répertorie donc un certain nombre d'acteurs clés impliqués dans l'émergence, la différenciation et la maturation de l'arbre vasculaire.**

**L**e système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel à se mettre en place chez l'embryon. En effet, le bon développement des tissus dépend d'un apport adéquat d'oxygène *via* le cœur et les vaisseaux sanguins. La dissection fine des mécanismes cellulaires et moléculaires qui interviennent dans la différenciation du réseau endothélial constitue un défi, mais aussi une nécessité dans la perspective d'une modulation de l'angiogenèse dans un but thérapeutique, particulièrement dans le domaine de la recherche cardiovasculaire. La capacité d'induire l'apparition de néovaisseaux collatéraux lors d'une ischémie du myocarde, des membres ou d'autres tissus constituerait un atout essentiel pour le traitement de ces pathologies pour lesquelles aucune intervention pharmacologique n'est possible aujourd'hui, et qui ne peuvent bénéficier que d'une revascularisation chirurgicale. Supprimer la croissance

vasculaire anarchique qui facilite le développement d'un processus cancéreux ou inflammatoire est aussi un enjeu formidable pour les chercheurs et les cliniciens.

L'étude de la mise en place du réseau endothélial chez l'embryon revêt un intérêt majeur compte tenu de la très probable similitude des mécanismes contrôlant l'ontogenèse endothéliale et le processus d'angiogenèse pathologique.

### **Émergence des cellules endothéliales, notion d'hémangioblaste**

Les cellules endothéliales (CE) naissent dans le mésoderme, le feuillet intermédiaire de l'embryon qui ségrège lors du processus de la gastrulation (*figure 1*). Ce feuillet évolue rapidement pour donner une structure paraxiale, le somite, et à la périphérie le mésoderme latéral. Lors de la formation du coelome, le mésoderme latéral se différencie en deux

#### ADRESSE

L. Pardanaud, D. Moyon, A. Eichmann : Institut d'embryologie cellulaire et moléculaire du CNRS et du Collège de France, FRE2160, 49bis, avenue de la Belle-Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France.

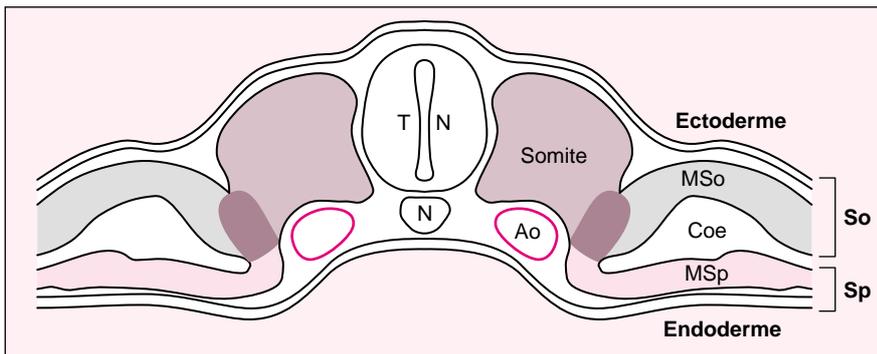


Figure 1. **Cartographie du mésoderme.** Le mésoderme se développe entre l'ectoderme et l'endoderme au cours du processus de gastrulation. Il se différencie en une structure axiale, la notochorde (N) sous le tube nerveux (TN), une structure paraxiale, le somite, dorsalement aux aortes (Ao) et en un mésoderme latéral. Lors de la formation du cœlome (Coe), le mésoderme latéral se scinde en un feuillet dorsal, le mésoderme somatopleural (MSo), et un feuillet ventral, le mésoderme splanchnopleural (MSp). L'association mésoderme somatopleural-ectoderme forme la somatopleure (So), l'association mésoderme splanchnopleural-endoderme forme la splanchnopleure (Sp).

feuillets: un feuillet dorsal, le mésoderme somatopleural, en étroit contact avec l'ectoderme, et un feuillet ventral, le mésoderme splanchnopleural, en étroit contact avec l'endoderme. L'association mésoderme somatopleural-ectoderme forme la somatopleure qui constituera la paroi et les membres, tandis que l'association mésoderme splanchnopleural-endoderme forme la splanchnopleure à l'origine des viscères.

L'émergence des précurseurs vasculaires est sous le contrôle de nombreuses molécules: citons parmi elles le facteur de croissance VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et deux de ses récepteurs, VEGF-R1 et VEGF-R2. Le VEGF, qui agit sous forme soluble, a une double action sur les cellules endothéliales: il est mitogène et augmente la perméabilité des vaisseaux. Le dosage du VEGF est critique puisque, chez la souris, l'inactivation d'un allèle du gène suffit à entraîner la mort des embryons entre 9,5 et 10,5 jours de gestation (E9,5-E10,5) en raison d'un développement insuffisant du réseau endothélial. Parmi les récepteurs qui relayent les effets biologiques du VEGF, VEGF-R2 apparaît comme le marqueur le plus précoce du lignage endothélial. Son inactivation chez la souris entraîne, chez les embryons homozygotes, une absence totale des CE et des cellules hématopoïétiques (CH). Les mutants

du VEGF-R1 sont différents: ils n'élaborent pas de réseau endothélial et meurent entre E9,5-E10. Il existe pourtant des CE et des cellules hématopoïétiques, mais le nombre de précurseurs endothéliaux est trop important et entraîne une désorganisation complète de l'arbre vasculaire (*voir* revue dans [1, 2]).

D'autres facteurs qui conditionnent la spécification endothéliale d'une cellule, ont été identifiés (Ets1, Hex, Vezf1, des gènes *Hox*, des membres de la famille GATA...) mais les mécanismes moléculaires à l'œuvre restent flous. Les molécules responsables des interactions CE-CE et CE-matrice extracellulaire telles que la VE-cadhérine, la fibronectine ou les intégrines sont, quant à elles, importantes pour la différenciation de l'arbre vasculaire précoce (*voir* revue dans [3]).

Dans le sac vitellin, la mise en place du réseau endothélial débute avec l'émergence de cellules isolées se regroupant en amas qui forment les îlots sanguins au sein desquels les cellules périphériques se différencient en CE et les cellules centrales en CH. Le lien étroit entre ces deux types cellulaires a suggéré l'hypothèse d'un précurseur commun à ces deux lignages, l'hémangioblaste, correspondant à l'ancêtre commun émergeant dans le mésoderme [4].

De proche en proche, les CE des différents îlots sanguins établissent des

contacts conduisant à la formation d'un réseau vasculaire au sein du sac vitellin [5].

Chez l'oiseau, le territoire de l'hémangioblaste correspond aux deux tiers postérieurs de l'embryon au stade de la ligne primitive [4], une région qui exprime très fortement le VEGF-R2. L'expression précoce de ce récepteur dans le mésoderme d'embryons de souris et d'oiseau ainsi que l'absence de CE et de CH dans les embryons homozygotes déficients en VEGF-R2 suggèrent fortement l'identité entre les cellules VEGF-R2<sup>+</sup> et les hémangioblastes (*voir* revue dans [1]).

Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules VEGF-R2<sup>+</sup> ont été isolées à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire du VEGF-R2, à partir de suspensions cellulaires de la région postérieure d'embryons de poulet au stade de la gastrulation. La capacité de prolifération et de différenciation des cellules exprimant ou n'exprimant pas le récepteur à leur surface a été testée en milieu semi-solide en l'absence ou en présence de VEGF. Dans ces conditions, tous les précurseurs capables de former des colonies ségrègent dans la fraction VEGF-R2<sup>+</sup>. En l'absence de VEGF, les cellules VEGF-R2<sup>+</sup> donnent naissance à des colonies de CH, cellules érythroïdes, thrombocytes et monocytes. En présence de VEGF, la différenciation des CE est induite de manière dose-dépendante et s'accompagne d'une réduction sensible de la différenciation hématopoïétique. La population des cellules VEGFR2<sup>+</sup> de la région postérieure de l'embryon donne donc naissance à des CE et à des CH et peut être considérée comme une population d'hémangioblastes. L'expression du potentiel de différenciation endothéliale dépend du VEGF alors que la différenciation hématopoïétique apparaît constitutive [6]. Chez la souris, l'existence d'hémangioblastes a été démontrée à partir de cellules ES sevrées de LIF (*leukemia inhibiting factor*), triées au jour 2,5/3 sur leur expression du VEGF-R2 et cultivées par la suite en présence de cellules stromales OP9 (dépourvues de M-CSF) dans un milieu enrichi en cytokines. Dans ces conditions, la différenciation de CE, de CH et de cellules musculaires

lisses à partir d'une cellule VEGF-R2<sup>+</sup> est obtenue [7, 8].

Dans l'embryon proprement dit, le premier signe de la différenciation endothéliale est l'apparition, dans le mésoderme non encore scindé, d'angioblastes isolés qui vont s'associer les uns aux autres pour former un plexus vasculaire: chez l'embryon, il n'y a donc pas d'îlots sanguins. La mise en place de l'arbre endothélial primitif qui résulte de l'interconnexion des réseaux endothéliaux vitellin et intraembryonnaire et qui aboutit à la différenciation de l'endocarde et des deux aortes dorsales est un processus rapide puisque observé après trente heures chez l'oiseau [5], huit jours chez la souris [9] et trois semaines chez l'homme [10].

Par comparaison avec les hémangioblastes qui émergent précocément dans le sac vitellin, il existe, dans l'embryon, des cellules bipotentes qui ont une destinée endothéliale et hématopoïétique. Chez l'oiseau, les CE qui tapissent l'endothélium ventral de l'aorte à 3-4 jours de développement perdent leur caractère endothélial et acquièrent un phénotype hématopoïétique pour donner naissance à des CH qui sont libérées dans la lumière du vaisseau ou qui migrent dans le mésentère sous-jacent [10]. Enfin, récemment, l'identification d'hémangioblastes/angioblastes circulants, originaires de la moelle osseuse, a été rapportée chez l'adulte (voir revue dans [3]). Ces précurseurs, peu nombreux au demeurant, laissent entrevoir l'espoir d'une utilisation thérapeutique.

Une hétérogénéité du mésoderme latéral quant à l'émergence de cellules endothéliales s'installe rapidement au cours du processus de gastrulation: l'analyse de l'expression de marqueurs spécifiques des CE tels que VEGF-R2 ou les facteurs de transcription *c-ets1* (figure 2) et SCL/TAL montre que, si tout le feuillet mésodermique transcrit ces gènes au début de la gastrulation, les ARNm se restreignent ensuite à la partie ventrale du mésoderme latéral. Lorsque le coelome se forme, ces transcrits ne sont exprimés que dans le feuillet splanchnopleural, au niveau des vaisseaux sanguins, tandis que dans le mésoderme somatopleural ces gènes ne sont transcrits que dans les rares CE [12-15]. Cette

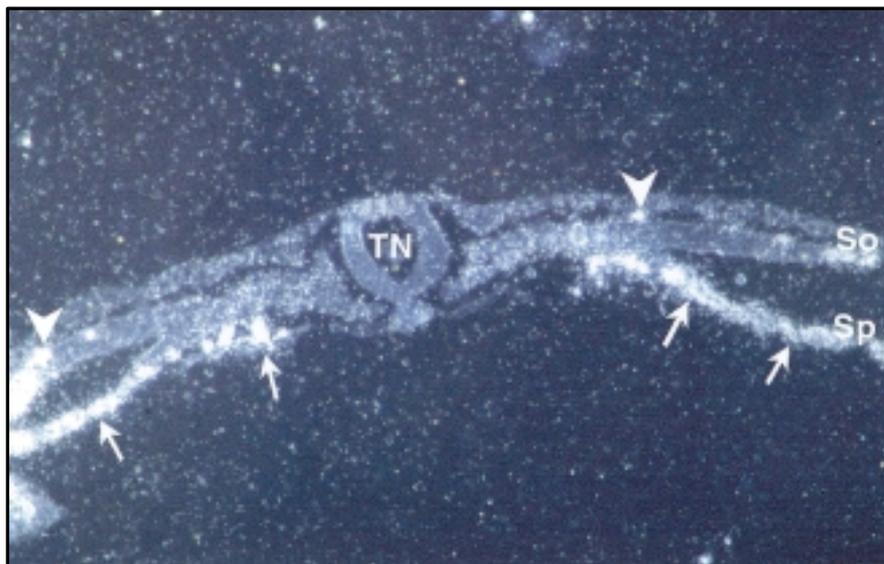


Figure 2. **Hétérogénéité moléculaire du mésoderme latéral.** Coupe transversale d'un embryon de poulet à jour 2 hybridée avec une sonde spécifique du proto-oncogène *c-ets1*. Au niveau du mésoderme, les ARNm *c-ets1* sont abondamment transcrits dans le feuillet splanchnopleural (flèches) alors que, seuls quelques spots *c-ets1*<sup>+</sup> sont détectés dans le feuillet somatopleural (têtes de flèche) (x 110). So: somatopleure; Sp: splanchnopleure; TN: tube nerveux.

expression régionalisée, qui préfigure la future architecture du plexus endothélial primaire, se traduit par une hétérogénéité fonctionnelle mise en évidence dans le système caille-poulet [16].

De la somatopleure et de la splanchnopleure de caille ont été greffées dans le membre d'un hôte poulet. L'existence d'un marqueur endothélial et hématopoïétique spécifique de la caille, QH1, permet d'identifier l'origine des CE présentes chez les receveurs [5].

Dans ces conditions, seule la splanchnopleure donne naissance à de nombreuses CE qui se dispersent dans le membre de poulet, notamment au sein de la moelle osseuse. Par ailleurs, elle produit des CH retrouvées dans le mésenchyme du membre hôte ou parmi la population d'ostéoclastes présents dans l'os.

Lorsque les fragments de splanchnopleure sont greffés dans le coelome de l'hôte, microenvironnement favorable à la multiplication et à la survie des CH, ils donnent également des CE, mais de surcroît ils produisent d'importants agrégats de CH [17].

## Développement vasculaire et organogenèse

Dans le modèle aviaire, le système des chimères caille-poulet a permis de démontrer que la vascularisation des organes se met en place selon deux processus distincts, l'angiogenèse et la vasculogenèse [18]. L'angiogenèse correspond à la vascularisation d'un territoire par l'intermédiaire d'un plexus vasculaire extérieur à ce territoire d'où émergent des CE qui envahissent le tissu. A l'inverse, la vasculogenèse est le développement d'un réseau endothélial intrinsèque à partir de précurseurs vasculaires présents *in situ*.

Il faut noter qu'aujourd'hui, la définition originale de ces deux substantifs a été quelque peu détournée dans la mesure où le terme de vasculogenèse est souvent utilisé pour désigner la formation d'un réseau vasculaire très tôt au cours de l'ontogenèse, tandis que l'angiogenèse désigne la croissance et la maturation du plexus primitif en un réseau complexe. C'est ainsi que, selon les auteurs, angiogenèse et vas-

culogénèse désignent soit l'origine extrinsèque ou intrinsèque du réseau vasculaire [19] soit deux étapes distinctes de la différenciation endothéliale [20]. En ce qui nous concerne, nous nous en tiendrons à la première définition qui est aussi la définition initiale de ces deux termes.

Les membres sont vascularisés *via* le processus d'angiogénèse (figure 3A); dans le modèle caille-poulet, la greffe d'un bourgeon d'aile ou de patte d'une espèce dans le coelome d'un embryon de l'autre espèce conduit à l'envahissement du greffon par des CE originaires de l'hôte. Les viscères, quant à eux, sont soumis au processus de vasculogénèse (figure 3B); lorsqu'un bourgeon viscéral d'une espèce est implanté dans le coelome d'un embryon de l'autre espèce, l'arbre vasculaire se développe à partir du rudiment greffé [18].

Ainsi, au sein des viscères, le mésoderme splanchnopleural produit son propre contingent de CE alors que, au sein des membres, le mésoderme somatopleural n'a pas cette capacité et il est vascularisé par le processus d'angiogénèse. La question se pose alors de savoir d'où viennent les précurseurs endothéliaux qui colonisent les membres ?

### Cartographie endothéliale du mésoderme

Pour répondre à cette question, la cartographie des territoires du mésoderme capables de produire des précurseurs endothéliaux a été entreprise à l'aide de greffes caille-poulet afin de préciser les migrations et la destinée finale des précurseurs endothéliaux qui en émergent.

Le mésoderme paraxial donne naissance à la vascularisation de la région dorsale et de la paroi du corps de l'hôte. Des CE originaires du greffon apparaissent dans l'aorte, en positions dorsale et latérale, dans les veines cardinales postérieures, les vaisseaux intersegmentaires, les méninges, les dérivés somitiques, le pronéphros, le mésonéphros et le membre (figure 4A). Ce mésoderme ne contribue en aucun cas à la vascularisation des viscères, ce qui corrobore les travaux antérieurs démontrant que des précurseurs intrinsèques émergent dans la splanchnopleure [21].

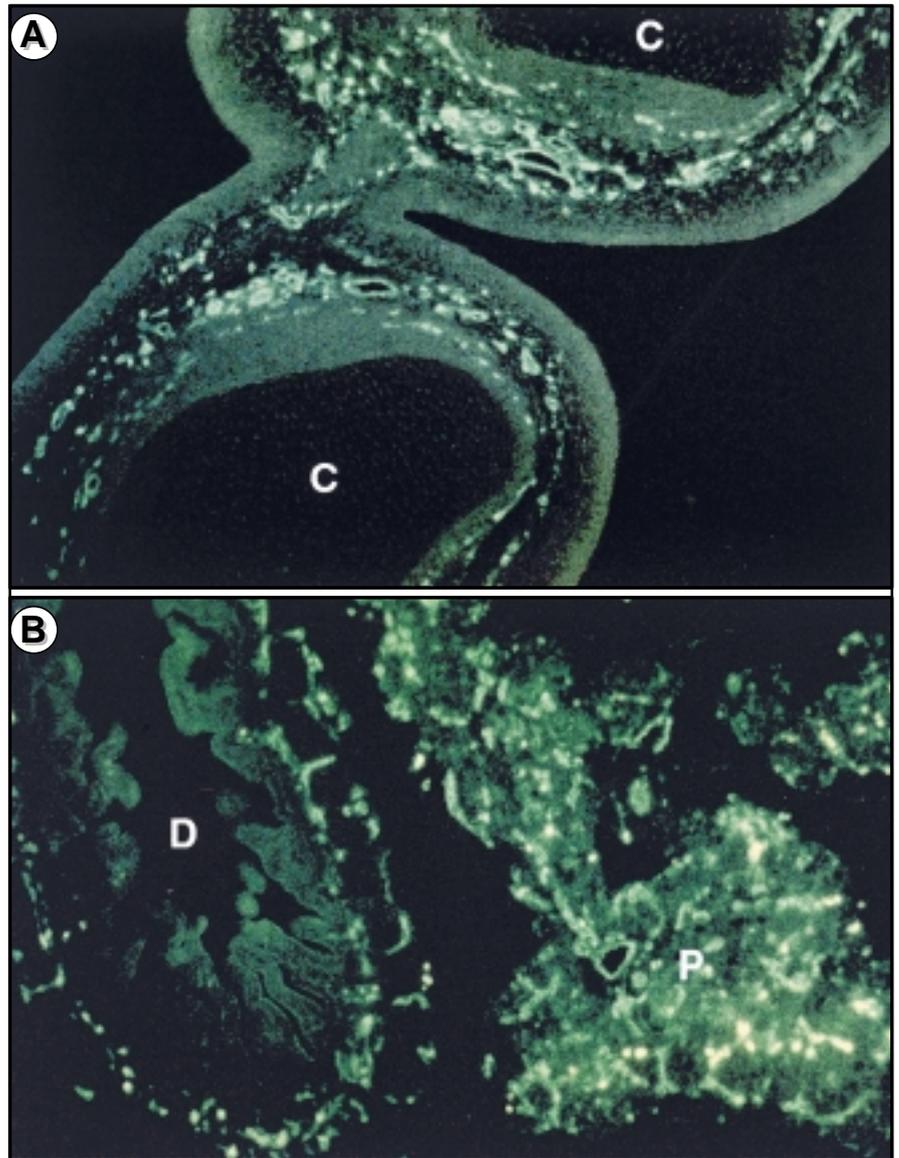


Figure 3. **Vascularisation et organogénèse.** A. Coupe d'une aile d'un embryon de poulet greffée chez un hôte caille: l'angiogénèse étant à l'œuvre dans les membres, tout le réseau endothélial autour des structures cartilagineuses de poulet (C) provient de l'hôte caille et est QH1<sup>+</sup> (fluorescence verte). B. Coupe d'un duodénum (D) et d'un pancréas (P) d'un embryon de caille greffés chez un hôte poulet: les viscères étant soumis au processus de vasculogénèse, l'arbre vasculaire des greffons de caille se différencie in situ et est marqué par QH1 (fluorescence verte) (x 110).

En ce qui concerne la production de CH, le mésoderme paraxial n'est pas à l'origine des bourgeonnements intra-aortiques ventraux présents à E3,5-E4 chez l'oiseau [21], qui correspondent au premier processus d'hématopoïèse diffuse intraembryonnaire [22] et dont des analogues sont présents chez la souris [23] et l'homme [10].

Afin de comprendre la restriction de

la migration des CE issues du mésoderme paraxial à la région dorsale de l'aorte, la capacité de migration de ces cellules a été comparée, dans le système caille-poulet, avec celle des CE issues du mésoderme splanchnopleural.

Au niveau de l'aorte, des cellules QH1<sup>+</sup> produites par le mésoderme splanchnopleural se retrouvent dans la région ventrale de l'endothélium

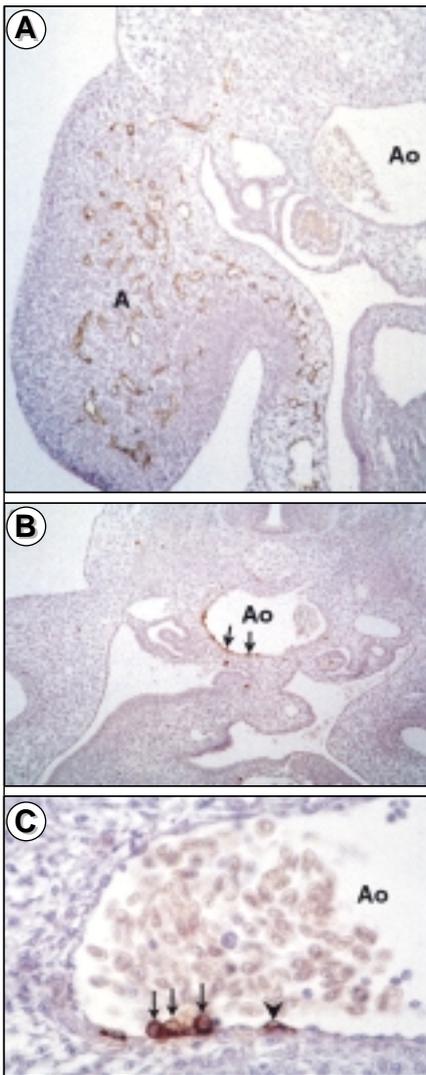


Figure 4. **Potentiels angiopoïétique et hémangiopoïétique.** **A.** Coupe transversale troncale d'un embryon de poulet à jour 4 dont un somite a été substitué deux jours auparavant par un somite de caille. Le somite greffé donne naissance à une importante population de CE QH1<sup>+</sup> qui vascularise les dérivés dorsaux de l'hôte, en particulier l'aile (A). Au niveau de l'aorte (Ao), des CE QH1<sup>+</sup> participent à l'endothélium dorsolatéral du vaisseau (pas visible sur cette coupe). **B** et **C.** Coupes transversales troncales d'un embryon de poulet à jour 4 dont un somite a été substitué deux jours auparavant par un fragment de mésoderme splanchnopleural de caille. Les CE issues du mésoderme greffé sont capables de participer à l'endothélium ventral de l'aorte (Ao, flèches dans B, tête de flèche dans C) et de donner naissance aux CH qui y bourgeonnent (flèches dans C). **A.** x 160; **B.** x 110; **C.** x 525.

m/s n°5, vol. 17, mai 2001

du vaisseau (figure 4B) et participent aux bourgeonnements hématopoïétiques intraaortiques (figure 4C). Par ailleurs ces cellules QH1<sup>+</sup> participent à la vascularisation des viscères. Les CE issues du mésoderme splanchnopleural migrent donc plus loin et dans d'autres territoires que celles produites par le mésoderme paraxial [21].

Ainsi, deux territoires mésodermiques distincts participent à la vascularisation de l'embryon, un territoire dorsal, le mésoderme paraxial, qui ne produit que des CE; un territoire ventral, le mésoderme splanchnopleural, où se différencient des CE seules capables de gagner l'endothélium aortique ventral et de participer à la formation des bourgeonnements hématopoïétiques (figure 5). Ces expériences ont permis de définir un potentiel angiopoïétique au sein du mésoderme paraxial et un potentiel hémangiopoïétique au sein du mésoderme splanchnopleural. De plus, il apparaît que l'endothélium de l'aorte a une double origine, somitique, dorsalement et splanchnopleurale, ventralement (figure 5).

Pourquoi la potentialité hémangiopoïétique est-elle restreinte au compartiment splanchnopleural ? L'une des hypothèses est que l'endoderme, qui est en contact étroit avec le mésoderme splanchnopleural au début du développement, pourrait jouer un

rôle inducteur de la capacité hémangiopoïétique de ce mésoderme. Pour étayer cette hypothèse, l'effet de l'endoderme a été testé 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 hématopoïétique.

Du mésoderme paraxial ou somatopleural de caille a été associé transitoirement à de l'endoderme embryonnaire de poulet avant d'être greffé dans le coelome d'un poulet hôte. Dans ces conditions, des CE originaires du greffon de caille migrent au sein de l'endothélium ventral de l'aorte de poulet et participent aux bourgeonnements hématopoïétiques. L'endoderme a donc un rôle inducteur sur la capacité hémangiopoïétique du mésoderme associé [24].

L'effet de l'endoderme peut être mimé par des facteurs de croissance tels que le VEGF, le FGFb et le TGFβ1, capables d'induire au sein des mésodermes paraxial et somatopleural un potentiel hémangiopoïétique qui normalement est dévolu au seul mésoderme splanchnopleural [24].

Une approche identique permettrait-elle d'inhiber la capacité hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural ? Dans ce but, l'effet de

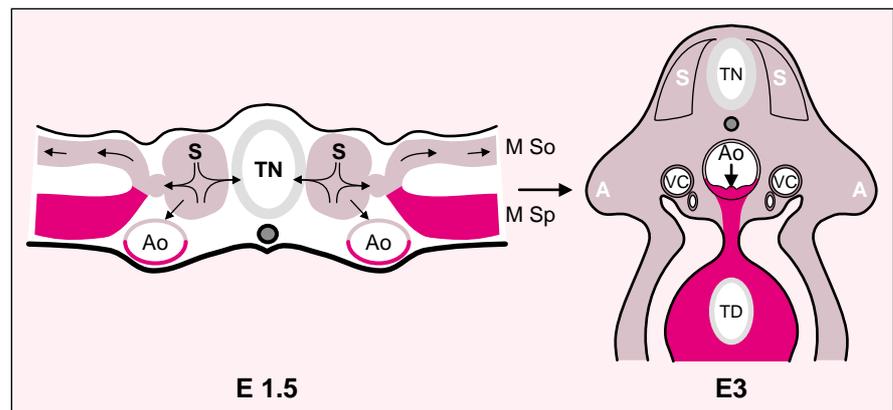


Figure 5. **Deux territoires mésodermiques distincts produisent des CE.** Le somite (S) donne naissance à des progéniteurs endothéliaux qui colonisent (flèches) le tube nerveux (TN), le mésoderme somatopleural (MSo) et le toit de l'aorte (Ao). Ces CE assurent la vascularisation des dérivés dorsaux de l'embryon (en bistre) en particulier les ailes (A) et les pattes, la paroi, les veines cardinales (VC). Le mésoderme splanchnopleural (MSp) produit des CE qui vascularisent les viscères comme le tube digestif (TD), forment l'endothélium ventral de l'aorte et y donnent naissance aux bourgeonnements hématopoïétiques (flèche).

l'ectoderme, connu pour induire une zone avasculaire dans le bourgeon de membre, a été testé. 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 la potentialité hématopoïétique et sa capacité angiopoïétique est réduite. Les CE QH1<sup>+</sup>, issues du greffon, 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. L'ectoderme abolit le potentiel hémangiopoïétique du mésoderme splanchnopleural en modifiant la destinée des cellules QH1<sup>+</sup> émigrantes. Cet effet peut être mimé par l'EGF et le TGF $\alpha$  [24]. Ces expériences suggèrent qu'il existe un gradient dorso-ventral contrôlant la potentialité angiopoïétique/hémangiopoïétique chez l'embryon: une activité promotrice de l'endoderme, ventralement, et une activité inhibitrice de l'ectoderme, dorsalement.

### Remodelage et identité artérielle et veineuse

Il a longtemps été admis que l'identité artérielle ou veineuse d'un vaisseau était principalement assujettie aux forces hémodynamiques résultant de l'établissement de la circulation. Il est vrai qu'elles jouent un rôle puisque chez l'oiseau, par exemple, les vaisseaux sanguins de grand diamètre du sac vitellin ne se développent qu'après la connexion du plexus vasculaire primitif avec les vaisseaux intraembryonnaires *via* les artères et les veines omphalomésentériques. L'absence de connexion, telle qu'elle est observée chez les embryons de caille déficients en acide rétinoïque, conduit à la régression complète des vaisseaux vitellins et à la mort des embryons [25]. Cependant, le développement de tous les vaisseaux majeurs ne dépend pas des forces mécaniques engendrées par la circulation: le tube cardiaque, les arcs aortiques, l'aorte dorsale et les veines cardinales ont déjà acquis un grand diamètre alors que la circulation n'est pas établie et les forces hémodynamiques inexistantes. Les forces de cisaillement induites par les contraintes hémodynamiques

sont impliquées dans l'étape de remodelage correspondant à la mise en place du mur vasculaire autour des tubes endothéliaux. Des séquences nucléotidiques spécifiques (*shear stress responsive elements*) sont ainsi intégrées au promoteur de certains gènes tel que celui codant pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). La transcription du PDGF est induite dans l'endothélium vasculaire en réponse aux forces de cisaillement [26]. Cette molécule est un chimioattractant pour les cellules de muscle lisse qui sont ainsi recrutées pour former le mur vasculaire. La différenciation du mur est contrôlée par un couple ligand-récepteur, les angiopoïétines (Ang1 et Ang2) et leur récepteur Tie2, qui affecte la croissance et le maintien des vaisseaux sanguins en stabilisant l'interaction des cellules murales avec les néovaisseaux ou en promouvant les branchements et l'angiogenèse (*voir revue dans* [3]). Ultérieurement, le système angiotensine et les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs interviennent dans le contrôle physiologique du tonus vasculaire.

En ce qui concerne l'identité artérielle ou veineuse d'un vaisseau, hormis les différences histologiques au niveau de la composition de la paroi et la présence de valvules dans certaines veines, des arguments moléculaires récents permettent l'identification de tubes artériels ou veineux. Des expériences de délétion des gènes de l'éphrine B2 et d'EphB4, un couple ligand-récepteur initialement caractérisé dans le système nerveux, montrent que ces deux molécules ont un rôle clé dans le développement vasculaire. L'éphrine B2 et l'EphB4 ont des patrons de distribution réciproques, l'éphrine B2 marquant l'endothélium des artères, l'EphB4 celui des veines. La distribution complémentaire de ces deux gènes suggère qu'ils sont impliqués très tôt dans l'établissement de l'identité artéro-veineuse, en assurant peut-être la fusion des tubes artériels et veineux à leurs jonctions. La létalité précoce des souris n'exprimant plus ces protéines pourrait s'expliquer par un défaut de fusion à l'interface artère-veine (*voir revue dans* [27]). L'éphrine B2 est aussi impliquée plus tardivement au cours

de la différenciation artérielle en contrôlant les interactions entre les CE et les cellules musculaires lisses recrutées pour former le mur vasculaire (*voir revue dans* [27]). Chez l'adulte, les processus d'angiogenèse physiologique ou tumorale conduisent à la formation de néovaisseaux qui expriment à nouveau le gène de l'éphrine B2: ce constat aboutit à reconsidérer le dogme bien établi selon lequel l'angiogenèse adulte conduit à la formation de vaisseaux non différenciés ou de veines et suggère que l'éphrine B2 doit jouer un rôle important dans ces sites d'angiogenèse (*voir revue dans* [27]).

Chez le poisson zèbre, deux gènes spécifiques des artères ont été clonés, *gridlock* [28] et *deltaC* [29] un ligand de la famille Notch. Ces deux gènes sont exprimés dans les CE artérielles présomptives avant le début de la circulation sanguine. Cette observation pourrait suggérer une spécification très précoce du mésoderme, dès la gastrulation, en un territoire artériel et un territoire veineux, qui achèverait peut-être la construction d'un plexus vasculaire fonctionnel avant l'établissement de la circulation.

Chez l'oiseau, nous avons mis en évidence récemment l'existence de deux autres marqueurs de l'identité artéro-veineuse, la neuropiline 1 (NP1) et Tie2. NP1 est un récepteur largement exprimé dans le système nerveux et dont un des ligands, la collapsine/sémaphorine III est un chémorépulseur des axones. Dans le système endothélial, l'absence ou la surexpression de NP1 entraîne de graves séquelles vasculaires. Il faut noter que les effets de la surexpression de NP1 ne concernent que le compartiment artériel [30]. Chez l'oiseau, NP1 se restreint très rapidement à l'endothélium artériel embryonnaire et extraembryonnaire et cette spécificité persiste dans tous les tissus au moins jusqu'à E10. Le récepteur Tie2 est exprimé dans toutes les CE au début du développement; au moment de l'organogenèse, la distribution de Tie2 se modifie, la transcription est réduite dans l'endothélium artériel alors qu'elle demeure très importante dans l'endothélium veineux. Ayant entre les mains deux gènes de la spécificité artéro-veineuse chez l'oiseau, nous nous sommes posé la question de

savoir si l'identité artérielle ou veineuse des CE était établie durablement une fois qu'elles ont acquis l'expression de marqueurs spécifiques ou s'il existe une plasticité vasculaire. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le système caille-poulet et greffé chez le poulet des fragments d'artères ou de veines prélevés chez la caille à différents âges. Il apparaît que des CE dont l'identité artérielle ou veineuse est moléculairement définie conservent une plasticité pendant une grande partie de la vie embryonnaire et ainsi, des CE artérielles à E7 sont capables de s'intégrer à un endothélium veineux et *vice versa*. Cependant, cette plasticité disparaît au cours des stades tardifs du développement. Les mécanismes responsables de la restriction progressive de la plasticité demeurent inconnus. Une explication serait qu'après un stade de développement défini, les gènes spécifiquement exprimés par les endothéliums artériel et veineux ne pourraient plus être réglés négativement et interdiraient la colonisation des artères par des CE de type veineux et celle des veines par des CE de type artériel. La recherche des interactions entre les différentes molécules connues pour s'exprimer sélectivement dans les artères et les veines, ainsi que la connaissance de la séquence temporelle de toutes ces interactions, renforceraient la connaissance du système endothélial et devraient aider à développer des thérapies pour pallier certains désordres vasculaires.

### Ontogenèse du système lymphatique

A l'inverse de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, la lymphangiogénèse a été très peu étudiée notamment en raison de l'absence de marqueurs spécifiques des CE lymphatiques. Cependant, dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, des études décrivaient déjà le système lymphatique chez l'embryon d'oiseau au moyen d'injections dans le réseau sanguin et ont permis de mettre en évidence un réseau lymphatique entourant les artères chorioallantoïdiennes et l'aorte.

En règle générale, le système lymphatique se développe plus tard que le système vasculaire. Chez l'oiseau, les

vaisseaux lymphatiques sont détectés vers E4-E5 [31] alors que les vaisseaux sanguins émergent trois jours auparavant [5]. Chez l'homme, le primordium lymphatique est identifiable après 6 à 7 semaines de gestation, soit 3 semaines après le développement des vaisseaux sanguins [32].

En ce qui concerne l'origine des vaisseaux lymphatiques, il n'y a pas de réponse claire aujourd'hui. Les premiers territoires lymphatiques, les plexus rétropéritonéal, postérieur et jugulaire, étant toujours adjacents à des veines et y étant connectés, il est admis que les premiers vaisseaux lymphatiques dérivent de l'endothélium veineux [32]. Cependant des expériences récentes menées dans le modèle aviaire montrent l'émergence d'angioblastes lymphatiques dans le mésenchyme de l'aile et suggèrent que le système lymphatique de l'aile ne se différencie pas exclusivement à partir de vaisseaux lymphatiques préexistants mais aussi par le recrutement *in situ* de lymphangioblastes qui, comme les CE vasculaires du membre, ont une origine somitique [33, 34].

Au contraire de la plupart des capillaires vasculaires, les capillaires lymphatiques ne développent pas de membrane basale continue et l'absence de laminine et de collagène de type IV permet de discriminer entre les deux types de vaisseaux. Cependant les vaisseaux lymphatiques collecteurs ont une membrane basale et possèdent une *adventitia* et une *media* (voir revue dans [35]). Bien que les premiers vaisseaux lymphatiques accompagnent les veines, plus tardivement, ils se différencient également le long des artères. Toutefois, la fusion des CE artérielles avec les CE lymphatiques n'est jamais observée. Certains organes tels que le cerveau et la moelle osseuse ne développent pas de système lymphatique en raison de l'existence probable de facteurs « anti-lymphangiogéniques » non encore identifiés (voir revue dans [35]).

Parmi les marqueurs du système lymphatique, il faut noter le couple VEGF C-VEGF-R3. Au cours de l'ontogénèse précoce, VEGF-R3 est exprimé dans toutes les CE, puis son expression se restreint aux CE lymphatiques [36]. La potentialité lymphangiogénique du VEGF C a été montrée dans les modèles aviaire et murin. L'application de ce facteur

sur la membrane chorioallantoïdienne d'un embryon de poulet entraîne le développement de nouveaux vaisseaux lymphatiques ainsi que la prolifération et la migration de lymphangioblastes [37]. La surexpression de VEGF C dans la peau de souris transgéniques induit la prolifération des CE lymphatiques [38]. Récemment, il a été montré qu'une pathologie humaine héréditaire entraînant des œdèmes lymphatiques est liée à des mutations hétérozygotes du gène codant pour VEGF-R3. Ces défauts génétiques aboutissent à l'inactivation du domaine tyrosine kinase du récepteur et conduisent à l'inhibition partielle de la voie de signalisation de VEGF-R3 [39].

### Régression vasculaire et apoptose

Parmi tous les tubes endothéliaux qui se forment au cours de l'ontogénèse, seule une minorité persiste jusqu'à l'âge adulte. La plupart des capillaires du plexus vasculaire initial régressent. Le flux sanguin apparaît déterminant dans ce processus puisque des capillaires non perfusés régressent préférentiellement au cours du développement. Cependant, le système vasculaire est déjà différencié alors que la circulation sanguine n'est pas encore établie. Cela suggère que les CE répondent différemment aux variations mécaniques avant et après l'établissement de la circulation (voir revue dans [40]).

La régression des capillaires dans les territoires préchondrogéniques avant la différenciation cartilagineuse, ou celle du système vasculaire hyaloïde conduisant à la translucidité du corps vitré compatible avec la vision, sont des processus impliquant une apoptose au sein des CE. Un autre exemple concerne la régression des arcs aortiques qui se forment transitoirement chez les mammifères alors qu'ils persistent chez certaines espèces de poissons. Il apparaît évident que la mort cellulaire qui accompagne la régression vasculaire est strictement contrôlée par l'environnement proche, quelle que soit l'origine des CE. Une apoptose endothéliale génétiquement programmée n'est probablement pas envisageable au cours de la majorité des processus de régression vasculaire (voir revue dans [40]).

## Conclusions

L'analyse cellulaire et moléculaire du développement endothélial montre que de nombreux processus complexes, dont certains sont encore mal compris, contribuent à l'édification d'une architecture vasculaire stable. Depuis l'émergence de l'hémangioblaste dans l'embryon précoce jusqu'à la différenciation d'un réseau endothélial spécialisé, le nombre de types cellulaires, de couples récepteurs-ligands, de facteurs de transcription et de molécules de la matrice extracellulaire mis en jeu est important. Cependant, les progrès récents de l'embryologie expérimentale permettent de compléter petit à petit l'immense puzzle que constitue la compréhension de la mise en place du réseau vasculaire. Les mécanismes impliqués au cours de l'ontogenèse endothéliale commencent à être identifiés; il faut maintenant les comparer aux processus qui interviennent dans l'angiogenèse pathologique afin de mettre en œuvre l'application directe de ces résultats à l'élaboration de protocoles thérapeutiques ■

## Remerciements

Nous remercions Francis Beaujean, Michel Fromaget et Sophie Gournet pour l'iconographie.

## RÉFÉRENCES

- Eichmann A, Corbel C. Les précurseurs des cellules endothéliales chez l'embryon d'oiseau. *Pathol Biol* 1999; 47: 307-13.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999; 126: 3015-25.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
- Murray PDF. The development *in vitro* of blood of the early chick embryo. Cambridge: Strangeways Res Lab 1932: 497-521.
- 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: 339-49.
- Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin N. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5141-6.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadiletriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125: 725-32.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92-6.
- Drake CJ, Fleming PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 2000; 95: 1671-79.
- Tavian M, Hallais MF, Péault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999; 126: 793-803.
- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 1998; 125: 4575-83.
- Eichmann A, Marcelle C, Bréant C, Le Douarin NM. Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech Dev* 1993; 42: 33-48.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lièvre F. Expression of *c-ets1* in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhes Comm* 1993; 1: 151-60.
- Quéva D, Leprince D, Stéhélin D, Vandebunder B. p54<sup>c-ets1</sup> and p68<sup>c-ets1</sup>, the two transcription factor encoded by the *ets* locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* 1993; 8: 2511-20.
- Drake CJ, Brandt SJ, Trusk TC, Little CD. TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol* 1997; 192: 17-30.
- Le Douarin N. 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: 435-52.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lièvre F. Does the paraaxial mesoderm of the avian embryo have a hemangioblastic capacity? *Anat Embryol* 1993; 192: 301-8.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 1989; 105: 473-85.
- Risau W, Lemmon V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 1988; 125: 441-50.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lièvre F. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 1996; 122: 1363-71.
- Dieterlen-Lièvre F. Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol* 1984; 3: 75-80.
- Godin I, Dieterlen-Lièvre F, Cumano A. Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraortic splanchnopleura in mouse embryo, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 773-7.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lièvre F. Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development* 1999; 126: 617-27.
- Heine UI, Roberts AB, Munoz EF, Roche NS, Sporn MB. Effects of retinoid deficiency on the development of the heart and vascular system of the quail embryo. *Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985; 50: 135-52.
- Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Gimbrone MA. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4591-5.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.
- Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MA, Weinstein B, Fischman MB, Gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in the zebrafish. *Science* 2000; 287: 1820-4.
- Smithers L, Haddon C, Jiang Y, Lewis J. Sequence and embryonic expression of deltaC in the zebrafish. *Mech Dev* 2000; 90: 119-23.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126: 4895-902.
- Clark ER, Clark EL. On the origin and early development of the lymphatic system of the chick. *Contrib Embryol* 1920; 9: 947-82.
- van der Putte SC. The development of the lymphatic system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1975; 51: 3-60.
- Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, Wilting J. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn* 1999; 216: 311-9.

## RÉFÉRENCES

34. Wilting J, Papoutsi M, Schneider M, Christ B. The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev Dyn* 2000; 217: 271-8.
35. Wilting J, Kurz H, Oh SJ, Christ B. Angiogenesis and lymphangiogenesis: analogous mechanisms and homologous growth factors. In: Little CD, Mironov V, Sage EH, eds. *Vascular morphogenesis: in vivo, in vitro, in mente*. Basel: Birkhäuser, 1998; 1.2: 21-34.
36. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 11; 92: 3566-70.
37. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, et al. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188: 96-109.
38. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997 30; 276: 1423-5.
39. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 2000; 25: 153-9.
40. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.

## Summary

### Endothelial ontogeny

Understanding how blood vessels differentiate and dissecting the cellular and molecular mechanisms involved in this process have become important challenges in relation to therapeutic angiogenesis. Thus, the interest in the endothelial ontogeny appears obvious because the mechanisms at work in this system may be also involved during pathological angiogenesis. This paper presents an overview of some key factors playing a role during the emergence, the differentiation and the remodeling of the vascular tree.

## TIRÉS À PART

L. Pardanaud.

*m/s* n°5, vol. 17, mai 2001