Dialogue inter-tissulaire et modulation de la voie Notch contrôlent l'induction de l'hématopoïèse aortique

Cécile Drevon, Charlotte Richard, Aveline Lempereur, Pierre-Yves Canto, Michèle Souyri, Thierry Jaffredo

CNRS, UPMC, UMR7622, bâtiment C, 6^e étage, case 24, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

cecile.drevon@snv.jussieu.fr
thierry.jaffredo@upmc.fr

Hématopoïèse aortique : généralités

Chez les embryons de vertébrés, l'aorte est reconnue comme un site majeur d'émergence des cellules souches hématopoïétiques fondatrices du système hématopoïétique adulte [1]. La production hématopoïétique aortique, très conservée chez les vertébrés, est caractérisée par l'apparition de petits bourgeonnements cellulaires qui prennent naissance à partir de l'endothélium du plancher de l'aorte, et qui seront libérés dans la lumière du vaisseau avant d'aller coloniser les organes hématopoïétiques définitifs. L'origine endothéliale de ces bourgeonnements a été clairement démontrée dans différents modèles animaux à l'aide de techniques de traçage cellulaire de l'endothélium et de ses dérivés [2-4], ainsi que par des approches directes de vidéo-cinématographie, soulignant le caractère fortement conservé de cette production [5-7,12]. La formation de ces bourgeonnements passe par la perte progressive des marqueurs endothéliaux et l'acquisition des marqueurs hématopoïétiques. Si les modalités cellulaires de cette émergence hématopoïétique commencent à être comprises, son contrôle moléculaire reste plus énigmatique, et plus particulièrement comment le programme hématopoïétique est induit dans l'endothélium et comment est contrôlée l'expression du facteur de transcription *runx1*, gène clé de la transition endothélio-hématopoïétique.

Dynamique de l'expression de *runx1* dans l'hématopoïèse aortique

Afin de répondre à cette question nous avons analysé l'expression des facteurs de transcription *runx1*, *c-myb* et *pu-1*, respectivement partenaire et cible de *runx1*, par hybridation *in situ* sur des coupes d'embryon de poulet à différents stades de la formation de l'aorte. L'embryon de poulet est un modèle intéressant car son développement procède de manière antéro-postérieure, ce qui permet d'isoler des étapes individualisées dans la formation de l'hématopoïèse aortique. De manière inattendue, *runx1* et ses partenaires ne sont pas exprimés au cours des premiers stades de formation de l'aorte (Figure 1A) mais apparaissent secondairement selon un schéma spatio-temporel strict. L'expression de *runx1*, suivie quelques heures plus tard par celles de *pu-1* et *myb*, apparaît tout d'abord latéralement dans l'endothélium aortique, au stade aortes paires, et ce une journée avant l'apparition de petits bourgeonnements hématopoïétiques appelés clusters aortiques (Figure 1B), puis elle s'étend en direction médiane jusqu'à occuper tout le plancher de l'aorte (Figure 1C, D, E). Cette dynamique d'expression de *runx1* dans l'endothélium suit l'installation du mésenchyme sous aortique (Figure 1). À l'aide d'une technique de traçage cellulaire utilisant des « tatouages » de petits groupes de cellules par des cristaux de carbocyanine Dil, nous avons pu établir que ce mésenchyme était originaire d'une bande de mésoderme

splanchnopleural (ventral) située entre 250 et 300 microns de la ligne médiane de l'embryon. Au-delà de cette distance les cellules mésodermiques marquées se trouvent associées au tube digestif, traduisant une régionalisation médio-latérale de la contribution du mésoderme splanchnopleural. Des résultats similaires ont été obtenus avec des greffes de mésoderme splanchnopleural de caille dans un embryon de poulet hôte [8].

Rôle du mésenchyme sous aortique dans l'initiation de l'hématopoïèse

Afin d'analyser fonctionnellement le rôle du mésenchyme sous-aortique sur l'hématopoïèse aortique, nous avons bloqué la mise en place du mésenchyme sous l'aorte à l'aide d'une fente réalisée *in vivo* sur l'un des côtés de l'embryon (Figure 1A, A'). Cette fente sépare l'embryon proprement dit de la lame latérale ; le côté non opéré servant de contrôle. Les embryons ont été observés 24 h et 48 h après l'opération. Un jour après l'opération, les aortes paires ont fusionné mais aucun signe moléculaire d'hématopoïèse n'est visible du côté opéré comme en témoigne l'absence d'expression de *runx1* (Figure 1B', C') alors que du côté non opéré, *runx1* est exprimé ventralement (Figure 1B, C). L'expression de la VE-cadhérine et de Delta-like 4 (DII4), l'un des ligands de Notch, montre que l'identité vasculaire et artérielle de l'aorte n'est pas perturbée par l'opération. Après 48 heures, un endothélium hématogène épaissi,

Figure 1. Schéma expérimental de la mise en évidence du rôle du mésenchyme sous-aortique dans l'hématopoïèse analysé chez l'oiseau. Le côté contrôle est à gauche (blanc), le côté opéré, à droite (gris foncé). **A.** L'embryon repose à plat sur le jaune, les aortes sont paires, l'expression de *runx1* est absente, le mésoderme splanchnopleural est éloigné de l'aorte. **A'.** La flèche indique le tracé de la coupe qui va séparer le corps de l'embryon de la lame latérale. **B.** L'embryon commence à se soulever. Le mésoderme splanchnopleural vient au contact de la partie latérale de l'aorte. Suite à ce contact, les cellules endothéliales commencent à exprimer *runx1*. **B'.** La lame latérale ne peut pas entrer en contact avec l'aorte. L'expression de *runx1* n'est pas induite. **C.** Le mésenchyme sous aortique est en train de se former (rayures violettes). L'expression de *runx1* s'étend ventralement. **C'.** Aucune expression de *runx1* n'est visible du côté opéré. L'endothélium continue d'exprimer les transcrits VE-cadhérine et *Delta-like4* attestant du maintien de l'identité artérielle. **D.** L'endothélium exprimant *runx1* commence à s'épaissir et à exprimer des gènes hématopoïétiques (*c-myb*, *pu-1*, *CD41*). **D'.** Aucun changement du côté opéré. **E.** L'hématopoïèse se poursuit par l'apparition des bourgeonnements intra-aortiques qui expriment *runx1*, *CD41* et *CD45*. **E'.** Le côté opéré ne montre aucun signe d'hématopoïèse. Ao : aorte ; Co : coelome ; Dm : dermomyotome ; E : ectoderme ; En : endoderme ; N : notochorde ; S : somite ; Sc : scélrotome ; PI : pièce intermédiaire ; So : mésoderme somatopleural ; Sp : mésoderme splanchnopleural ; TD : tube digestif ; TN : tube nerveux ; VC : veine cardinale.

séquestrer. Dans ce schéma expérimental, les cellules des clusters aortiques ne sont pas marquées par le CFDA-SE, indiquant que le mésenchyme sous aortique ne contient pas les progéniteurs hématopoïétiques des clusters aortiques [8]. L'installation du mésenchyme sous aortique apparaît donc comme un commutateur clé responsable d'un dialogue endothélium-mésenchyme qui va induire l'expression de *runx1* et le programme hématopoïétique dans des cellules endothéliales instruites pour répondre à ce dialogue.

La voie de signalisation Notch et l'hématopoïèse aortique

La voie de signalisation Notch joue un rôle important au niveau de la communication intercellulaire et des choix binaires de destin cellulaire. Divers travaux ont montré que la voie Notch était requise pour l'hématopoïèse définitive (aortique) chez la souris et le poisson zèbre, et que sa diminution affectait la production hématopoïétique aortique [9-11]. En travaillant sur des stades précis de mise en place de l'hématopoïèse aortique, nous montrons au contraire qu'une diminution de la voie Notch est requise pour la production hématopoïétique aortique. Cette conclusion repose

sur un ensemble de données complémentaires: (1) les expressions de *runx1* et de *cjag1* et 2, orthologues aviaires des ligands de Notch *Jag1* et 2 chez les mammifères, sont mutuellement exclusives dans l'endothélium aortique; (2) l'électroporation d'un plasmide rapporteur de l'activité de Notch dans l'aorte d'oiseau montre que l'endothélium aortique et le mésenchyme sous-jacent expriment Notch, mais pas les clusters aortiques; (3) des analyses par PCR quantitative des populations cellulaires issues de l'endothélium homogénisé et des clusters hématopoïétiques de poulet et de souris, triées par cytométrie en flux, indiquent que la signalisation Notch s'éteint au fur et à mesure de la formation des clusters et de la maturation hématopoïétique aortique; (4) un traitement de 24 heures, soit de l'embryon entier, soit des cultures organotypiques d'aortes par le DAPT, inhibiteur chimique de la voie Notch qui bloque la γ -secrétase et empêche le clivage du domaine intracellulaire de Notch, augmente dramatiquement le nombre de cellules hématopoïétiques *CD45*⁺ produites par l'aorte. Des cellules *CD45*⁺ sont même trouvées au niveau des aortes paires et au niveau du toit de l'aorte, ce qui n'est jamais le cas en situation normale [8].

puis des clusters aortiques exprimant *runx1*, sont visibles du côté contrôle de l'embryon (Figure 1D, E), mais pas du côté opéré (Figure 1D', E').

Afin d'éliminer la possibilité que le mésenchyme sous aortique contienne des progéniteurs hématopoïétiques qui puissent contribuer ainsi à la formation des clusters aortiques, nous avons marqué spécifiquement le mésoderme de la lame latérale, mais pas les cellules endothéliales, à l'aide du traceur moléculaire CFDA-SE (*carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*). Cette molécule traverse librement la membrane cellulaire, puis est estérifiée dans le cytoplasme, ce qui contribue à la