► Le système lymphatique est formé de vaisseaux qui drainent les liquides interstitiels dans tout l'organisme. La circulation de la lymphe dans les vaisseaux lymphatiques est unidirectionnelle : des tissus vers les ganglions lymphatiques puis les veines. Les ganglions sont des filtres mécaniques mais aussi des barrières immunitaires pouvant bloquer la progression de certains pathogènes et des cellules cancéreuses. Cependant, la plupart des études portant sur le système lymphatique et la cancérogenèse mettent en évidence le rôle de ce réseau dans la dissémination métastatique, les cellules tumorales l'empruntant afin d'atteindre d'autres organes. Des travaux récents décrivent pourtant un rôle bénéfique du système lymphatique et du VEGF-C (*vascular endothelial growth factor C*), l'un des principaux facteurs responsables du développement des vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs. Dans cette revue, nous illustrerons ce rôle ambivalent et émergeant du VEGF-C et du système lymphatique dans l'agressivité des cancers. ◀

VEGF-C et vaisseaux lymphatiques

Une épée à double tranchant dans le développement tumoral et la dissémination métastatique

Papa Diogop Ndiaye¹, Gilles Pagès^{1,2}

¹Université Côte d'Azur, Institut de recherche sur le cancer et le vieillissement de Nice, CNRS UMR 7284 ; Inserm U1081, Centre Antoine Lacassagne, 33, avenue de Valombrose, 06189 Nice, France.

²Centre scientifique de Monaco, Département de biologie médicale, 8, quai Antoine I^{er}, MC-98000 Monaco, Principauté de Monaco.

gpages@unice.fr

(*vascular endothelial growth factor*) C et D, deux facteurs de croissance majeurs des cellules endothéliales lymphatiques (CEL). Nous examinerons dans cette revue, le rôle du VEGF-C, de son récepteur VEGFR3, et du système lymphatique, depuis les phases précoces du développement tumoral jusqu'aux phases tardives de dissémination métastatique.

L'origine du système lymphatique

L'identification de marqueurs spécifiques des vaisseaux lymphatiques durant ce dernier quart de siècle a provoqué un regain d'intérêt dans l'étude du système lymphatique. Ce système et son rôle en conditions physiologiques et pathologiques sont ainsi de mieux en mieux compris. Le manque de marqueurs fonctionnels de ces vaisseaux avait conduit jusqu'à récemment au dogme stipulant l'absence de ces vaisseaux au sein de la tumeur [1]. Cependant, la découverte, en 2013, de « signatures fonctionnelles » a suggéré qu'ils étaient en fait présents à ce niveau, mais collapsés en raison de la pression intratumorale et, par conséquent, non fonctionnels [2]. Le réseau lymphatique péri-tumoral subit certaines modifications au cours de la tumorigénèse, notamment un élargissement des vaisseaux induit par la sécrétion de VEGF

Deux théories expliquent l'origine embryonnaire du système lymphatique. La première repose sur des expériences réalisées en 1902 par l'anatomiste Florence Sabin qui, par des injections d'encre de chine dans des embryons de porc, avait observé que les vaisseaux lymphatiques bourgeonnaient à partir de la veine cardinale¹ [3]. La seconde, repose sur l'observation, en 1910, par Georges Huntington et Charles F. W. McClure, qui étudiaient des coupes d'embryons de chat par un système de reconstruction en trois dimensions, que les vaisseaux lymphatiques provenaient de la différenciation de cellules mésenchymateuses [4]. Ces deux théories, de Sabin et de Huntington/McClure, appelées respectivement centrifuge et centripète, se sont affrontées durant près de 100 ans avant que les progrès de la génétique, de la biologie moléculaire et de l'imagerie les réconcilient finalement.

¹ Chez l'embryon, le sang revient au cœur par quatre veines cardinales, deux antérieures et deux postérieures. La veine cardinale antérieure est formée par le confluent jugulo-sub-clavier, la veine cardinale postérieure par le confluent iliaque commun. Dans chaque moitié du corps, veines cardinales antérieure et postérieure s'unissent pour former la veine cardinale commune. Les deux veines cardinales communes se portent transversalement vers le sinus veineux du cœur.

Figure 1. Les membres de la famille du VEGF, leurs récepteurs et corécepteurs.

L'identification du gène *PROX1* (*prospero homeodomain 1*), exprimé dans certaines cellules endothéliales de la veine cardinale [5], a en effet permis de valider la théorie de F. Sabin : les cellules exprimant *PROX1* forment le bourgeon qui donne naissance au sac lymphatique primitif puis au réseau lymphatique. *PROX1* code un facteur de transcription dont l'expression est essentielle à la différenciation des CEL et son invalidation entraîne une létalité embryonnaire chez la souris en raison d'un défaut de spécification de ces cellules [6]. Les CEL ont une origine différentes selon l'organisme considéré : elles proviennent de cellules endothéliales veineuses et de lymphangioblastes dans des embryons de poulets [7] ou de grenouilles [8], ou de veines primitives chez le poisson zèbre [9]. Un suivi des cellules par une méthode de « *lineage tracing* » a été réalisé dans un modèle de souris génétiquement modifiées. Le traçage des cellules modifiées exprimant LacZ, associé à un marquage par un anticorps spécifique de la protéine *PROX1*, a permis de révéler l'existence chez cet animal, d'un petit nombre de CEL exprimant *PROX1* dans et à proximité de la veine cardinale dès le jour 9,5 du développement embryonnaire (E9,5) [10]. Les cellules endothéliales de la veine cardinale antérieure sont, dans ce cas, probablement la source la plus précoce de progéniteurs de CEL exprimant *PROX1*. Elles contribuent au développement des sacs lymphatiques et des vaisseaux lymphatiques périphériques. Quelques CEL persistent cependant au niveau de la veine, afin de constituer les valves qui empêcheront le reflux vers le sang [11]. La théorie de F. Sabin sur l'origine embryonnaire des vaisseaux lymphatiques est désormais bien établie [50] (→).

Mais la participation de cellules d'une autre origine n'est pas à exclure, notamment la transdifférenciation de leucocytes ou de macrophages en CEL, chez l'adulte [12]. L'expression de *PROX1* dépend du facteur de transcription *SOX18* (*SRY box 18*), détectable avant *PROX1* dans une sous-population de cellules endothéliales de la veine cardinale. L'invalidation du gène *Sox18* provoque des œdèmes sous-cutanés et est létale à E14,5 [13]. Le facteur *COUP-TFII* (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) est également exprimé dans les cellules endothéliales veineuses à E8,5 [14] et dans les CEL durant l'embryogenèse et à l'âge adulte. Son invalidation provoque un défaut de formation des vaisseaux lymphatiques durant le développement embryonnaire [15]. Il régule l'expression du récepteur du VEGF, *VEGFR3* [16] dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (E10, 5) [17], une expression qui

sera ensuite restreinte aux CEL [5]. *VEGFR3* dépend également de *PROX1* qui, lui-même, dépend de *VEGFR3* afin de maintenir l'identité et le nombre de cellules progénitrices de CEL [18]. Le ligand le mieux caractérisé de *VEGFR3* est le VEGF-C, qui est produit à E10,5 par les cellules mésenchymateuses proches des CEL bourgeonnantes qui expriment le récepteur [19]. L'invalidation de VEGF-C n'a pas d'effet sur *PROX1* et donc sur la différenciation des CEL. Néanmoins, en l'absence de VEGF-C, les CEL ne bourgeonnent pas et ne forment pas de sac lymphatique primitif [19]. Le rôle du VEGF-D est moins bien compris. Chez le poisson zèbre, il régule l'angiogenèse et la lymphangiogenèse au cours du développement [20]. Chez la souris, des expériences de double invalidation des gènes *Vegfd* et *Sox18* suggèrent qu'ils contrôlent le développement vasculaire en modulant l'activité de *SOX18* [21]. *CCBE1* (*collagen- and calcium-binding EGF domain 1*) est nécessaire à la maturation et à l'activation du VEGF-C [22]. L'invalidation de son gène induit une diminution, au niveau de la veine cardinale, des CEL qui expriment *PROX1* et *LYVE-1* (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1*) avec pour conséquence une mauvaise vascularisation lymphatique, de sévères œdèmes et une mortalité *in utero* chez la souris [23]. *LYVE-1* est exprimé entre E9,5 et E10,5 au niveau de l'endothélium veineux embryonnaire [24], avant *PROX1* [5]. Il est également présent dans une sous-population de macrophages et de cellules de la rate. Son invalidation n'empêche pas le développement du réseau lymphatique [25]. La podoplanine (*PDPN*) est produite par les cellules fibroblastiques réticulaires des ganglions lymphatiques et par les CEL [26]. Son expression débute à E10,5 dans les cellules exprimant *PROX1* qui migrent hors de la veine cardinale [27]. *PDPN* se situe en aval de *PROX1* dans la cascade de signalisation induisant le développement du système lymphatique : des sites de fixation fonctionnels de *PROX1* ont en effet été identifiés dans le promoteur du gène *Pdpn* [28]. *PDPN* est nécessaire au processus d'initiation et de maintien de la séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques, un processus auquel participe également *CLEC2* (*C-type lectin domain family 2*), un récepteur présent à la surface des plaquettes, et qui est à l'origine de leur agrégation, qui permet la séparation entre le sang et la lymphe [29]. L'invalidation de son gène provoque ainsi un mélange de sang et de lymphe dans l'embryon de souris et chez la souris adulte [30].

Le réseau lymphatique dans les tumeurs

Dans le microenvironnement tumoral, les vaisseaux lymphatiques proviennent essentiellement de vaisseaux préexistants [31]. Sous l'action du VEGF-C, et/ou du VEGF-D, produits par les cellules tumorales, les cellules

(→) Voir la Nouvelle de T. Jaffredo, m/s n° 6-7, juin-juillet 2008, page 567

Figure 2. Interactions entre cellules du microenvironnement tumoral et du réseau lymphatique. 1. Les cellules présentatrices d'antigène rejoignent les ganglions et activent les lymphocytes T. 2. Les lymphocytes T activés rejoignent la tumeur et participent à l'immunité antitumorale. 3. L'élargissement des vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux permet aux cellules tumorales de pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques. 4. Des cellules tumorales envahissent les ganglions et disséminent dans l'organisme via les vaisseaux lymphatiques. 5. Les cellules tumorales produisent du VEGF-C, ce qui stimule la création de nouveaux vaisseaux lymphatiques. 6. Les cellules tumorales disséminent dans d'autres tissus, dont l'os.

immunitaires et les fibroblastes du microenvironnement tumoral, de nouveaux branchements s'établissent, qui colonisent la périphérie de la tumeur [32]. Ces facteurs induisent la prolifération et la migration des CEL en stimulant l'expression de VEGFR3 (Figure 1), conduisant ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques et au développement du système lymphatique. Au cours du développement tumoral, le système lymphatique participe aux échanges entre les cellules tumorales et le sang : du plasma s'infiltre constamment dans le milieu interstitiel, constituant ainsi la lymphe qui assure le transport des nutriments jusqu'aux cellules. Ces échanges sont bidirectionnels. Ils permettent l'évacuation des déchets métaboliques. Ce processus est indispensable à la croissance des cellules tumorales afin d'éliminer les toxines qu'elles produisent au cours de leur importante prolifération. Ces déchets seront ainsi canalisés par le réseau lymphatique avant leur élimination via la circulation sanguine [33]. La prolifération et la migration des CEL, qui contribuent au développement du réseau lymphatique, favorisent le développement des tumeurs [34]. Cette prolifération des CEL est également associée à la dilatation des vaisseaux lymphatiques que l'on observe dans plusieurs cancers (Figure 2) [35].

La prostaglandine E2 et ses récepteurs EP2, EP3 et EP4, qui sont exprimés par les cellules tumorales et les cellules immunitaires, forment un axe de signalisation qui stimule l'expression du VEGF-C et promeut la lymphangiogenèse et les métastases [36, 37]. Cette voie de signalisation et le système lymphatique tumoral sont donc principalement associés à une progression tumorale.

Le VEGF-C, la lymphangiogenèse et les métastases

Durant ces 20 dernières années, la découverte de marqueurs lymphatiques a permis de mieux comprendre le fonctionnement de ce système, son rôle et celui du VEGF-C, dans la dissémination métastatique [32].

Le VEGF-C est en effet l'un des principaux facteurs qui stimulent la lymphangiogenèse et induisent des métastases dans de nombreux cancers [38]. Le blocage de l'axe VEGF-C, -D/VEGFR3 inhibe la lymphangiogenèse tumorale et toute intervention sur cette voie modifie le développement lymphatique. Ainsi, la voie WNT1, qui inhibe l'expression de VEGF-C dans les mélanomes, réduit le développement des vaisseaux lymphatiques [39]. L'inhibition de la neuropiline 2 (NRP2), le corécepteur de VEGFR3, réduit, quant à elle, la migration des CEL, mais pas leur prolifération *in vitro* et *in vivo*, diminuant ainsi l'incidence de métastases lymphatiques [40]. L'inhibition de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) altère la lymphangiogenèse et les métastases [41] dans les cancers de la tête et du cou. Bien d'autres molécules, comme le VEGF-A, le FGF2 (*fibroblast growth factor*), ou l'EGF (*epidermal growth factor*), favorisent le développement du système lymphatique dans le microenvironnement tumoral [42]. Pourtant, dans un modèle murin de xénogreffe d'adénocarcinome pancréatique, l'inhibition du TGF β (*transforming growth factor- β*) stimule le développement du système lymphatique, via l'expression de VEGF-C, révélant ainsi un rôle pour cette molécule, non plus de facilitateur, mais de répresseur de la lymphangiogenèse. Plusieurs molécules sont donc capables de freiner ou d'accélérer le développement du réseau lymphatique dans l'environnement tumoral.

Les vaisseaux lymphatiques sont plus perméables que les vaisseaux sanguins. Leur élargissement dans la périphérie de la tumeur augmente également la surface de contact accessible aux cellules tumorales et donc

leur entrée dans les vaisseaux qu'elles utilisent pour coloniser d'autres organes (Figure 2). Au sein de la tumeur, plusieurs cellules produisent le VEGF-C ou le VEGF-D et surtout leur récepteur VEGFR3. Une expression élevée des facteurs lymphangiogéniques, et la lymphangiogenèse qui en découle, ont été corrélées au développement des métastases et constituent des facteurs de mauvais pronostic. Les acteurs participant à la lymphangiogenèse tumorale représentent donc des cibles thérapeutiques pertinentes dans les tumeurs métastatiques. Actuellement, les effets de leur activation ou de leur inhibition sur les différents types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral ne sont cependant que partiellement compris (Figure 3).

VEGF-C : lymphangiogenèse et régulation de l'immunité antitumorale

En plus de son rôle dans l'homéostasie, le système lymphatique joue un rôle régulateur pour le système immunitaire. Les vaisseaux lymphatiques constituent en effet une voie importante permettant aux cellules présentatrices de présenter les antigènes dans les ganglions lymphatiques aux lymphocytes T afin de les éduquer (Figure 2). Un dysfonctionnement du système lymphatique pourra donc se traduire par une altération de l'activité immunitaire. En produisant la chimiokine CCL21 (*C-C motif chemokine ligand 21*), les CEL attirent et activent les cellules immunitaires qui expriment son récepteur à leur surface, CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*), comme les macrophages, les lymphocytes T et B, qui rejoindront, au cours d'une inflammation, le site inflammatoire via le réseau lymphatique. Le réseau lymphatique et le VEGF-C qui participe à sa formation constituent donc une voie physiologique de circulation privilégiée des cellules immunitaires (Figure 3). L'importance du système lymphatique et du VEGF-C dans la réponse immunitaire est également observée en conditions pathologiques. Dans un modèle de mélanome, chez des souris immunisées avec de l'ovalbumine, le VEGF-C induit une tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Il stimule les CEL qui inhibent les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques [43], des cellules qui, avec l'INF γ (interféron gamma), réduisent la lymphangiogenèse [44]. Les CEL interviennent également sur la maturation des cellules dendritiques. Elles les empêchent de présenter correctement les antigènes tumoraux aux lymphocytes T. Elles expriment en effet de façon constitutive des antigènes du soi, associés au complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I), maintenant ainsi une tolérance immunitaire [45]. Cette présentation antigénique s'effectue en l'absence des facteurs de costimulation qui sont nécessaires à l'activation des lymphocytes CD8⁺, mais en présence de PDL1 (*programmed death-ligand 1*), ligand de PD-1, impliqué dans la régulation négative des lymphocytes, qui est exprimé par les CEL [46]. Des taux élevés de VEGF-C sont inversement corrélés au nombre de cellules dendritiques et à l'agressivité des tumeurs [47].

Une fois installée, la tumeur détournera donc des voies de signalisation physiologiques à son avantage. La fonction immunomodulatrice des CEL qui, en conditions normales, sont des cellules en contact permanent avec les cellules immunitaires contre lesquelles elles se protègent, est ainsi utilisée par la tumeur. VEGF-C et lymphangioge-

nèse tumorale représentent donc des cibles pour des traitements antitumoraux. Cependant, VEGF-C et CEL peuvent également, dans certains cas, avoir une action bénéfique pour le patient. Leur activité nécessite donc d'être régulée, mais ne doit pas être bloquée.

Le rôle émergent du VEGF-C et du système lymphatique

En oncologie, VEGF-C et système lymphatique sont préférentiellement associés à la dissémination métastatique. Un lien entre ce système et l'inflammation a également été mis en évidence : le VEGF-C est en effet à l'origine d'une tolérance des cellules dendritiques et des cellules NK (*natural killer*). Cette activité du système lymphatique sur la tolérance immunitaire apparaît cependant ambiguë : une fonction bénéfique de ce système a en effet été décrite récemment (le processus inflammatoire est favorable lors des premières étapes du développement tumoral). Dans des mélanomes expérimentaux réalisés chez la souris, le VEGF-C provoque l'infiltration au sein de la tumeur de cellules immunitaires (Figures 2, 3), potentialisant ainsi l'effet anti-tumoral des anticorps inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, notamment l'anti-PDL1 [48]. Dans les modèles de cancer du sein, des composés anti-lymphangiogéniques inhibent la translocation de cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques et diminuent le nombre de lymphocytes T CD8⁺ infiltrant les tumeurs [49]. En parallèle, le VEGF-C, exprimé par les cellules tumorales, est à l'origine d'une néo-lymphangiogenèse dans le microenvironnement tumoral, permettant aux lymphocytes T naïfs, exprimant CCR7, d'envahir la tumeur, attirés par CCL21 produite par les CEL. Dans les phases précoces du développement tumoral des cancers du rein à cellules claires, le VEGF-C joue un rôle anti-tumoral qui est associé à une activité immunitaire (Ndiaye P, en cours de publication). Dans les phases tardives du développement de ces tumeurs, le VEGF-C joue alors un rôle péjoratif en stimulant notamment la dissémination métastatique comme cela a été décrit pour d'autres tumeurs de grade élevé.

Conclusion

Le système lymphatique, connu depuis très longtemps, a retrouvé un regain d'intérêt ces 20 dernières années grâce à la découverte de marqueurs spécifiques qui permettent de différencier ses vaisseaux des vaisseaux sanguins. Dans les cancers, ce système a été préférentiellement associé à la dissémination métastatique. En parallèle, la lymphangiogenèse a été reliée à l'inflammation. La rencontre de l'oncologie et de l'immunologie a permis

Figure 3. Effets du VEGF-C sur les cellules du microenvironnement tumoral. Le récepteur du VEGF-C, VEGFR3, est exprimé par différentes cellules du microenvironnement tumoral. Grâce au développement de vaisseaux lymphatiques, il favorise l'infiltration des tumeurs primitives par les cellules immunitaires. En induisant une tolérance immunitaire et en stimulant la formation d'un réseau lymphatique secondaire, il promeut les processus métastatiques. NK : natural killer.

lymphatic system and of the vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) which is one of the main factors responsible for the development of lymphatic vessels in cancer. In this review, we will illustrate this ambivalent and emerging role of VEGF-C and the lymphatic system in cancer aggressiveness. ♦

de révéler le rôle du système lymphatique dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans des tumeurs de haut grade, le VEGF-C, l'un des principaux facteurs lymphangiogéniques, et son récepteur, le VEGFR3, sont à l'origine d'une tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Le VEGF-C potentialise néanmoins l'effet des immunothérapies anti-PDL1. Selon la progression de la tumeur, le réseau lymphatique est donc soit initialement pourvoyeur de cellules immunitaires anti-tumorales et contrôlant alors le développement de la tumeur, soit facilitateur d'une tolérance immunitaire, les cellules tumorales produisant également le VEGF-C, à l'origine de la création de nouveaux vaisseaux lymphatiques, stimulant ainsi la dissémination métastatique (Figure 2). Ces observations, qui apparaissent contradictoires, révèlent en fait notre compréhension limitée du rôle que joue le système lymphatique au cours du développement tumoral. Les traitements ciblant le VEGF-C, ou son récepteur (VEGFR3) et corécepteur (NRP2), nécessiteront donc d'être utilisés avec prudence. Ils ne devront surtout pas être prescrits lors des étapes précoces du développement tumoral : l'inhibition de l'immunité anti-tumorale qui en découlerait pourrait en effet accélérer la propagation métastatique. La définition de marqueurs pertinents permettant de prédire l'efficacité de ces traitements reste donc un enjeu thérapeutique majeur. ♦

SUMMARY

VEGF-C and lymphatic vessels: a double-edged sword in tumor development and metastasis

The lymphatic system is made up of vessels that drain interstitial fluids throughout the body. The circulation of the lymph (liquid in the lymphatic system) in the lymphatic vessels is unidirectional: tissues to the lymph nodes and then to the veins. Ganglia are mechanical filters but also immune barriers that can block the progression of certain pathogens as well as cancer cells. However, most studies on the lymphatic system and cancer highlight the role of the lymphatic network in metastatic dissemination as tumor cells use this network to reach other organs. However, recent studies describe a beneficial role of the

REMERCIEMENTS

Pour leur soutien : à l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC), à l'Institut national du cancer (contrat : VEGFIL et SunitRES), à la Fondation de France, au Framework Program 7 of the European Commission-Marie Curie Intra-European grant (Contrat : VELLYMPH), à la Fondation François Xavier Mora, à la Société IRIS Pharma et à La Ligue Nationale Contre le Cancer-Équipe Labellisée LIGUE 2019.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, et al. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 4324-7.
2. Shayan R, Inder R, Karnezis T, et al. Tumor location and nature of lymphatic vessels are key determinants of cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2013 ; 30 : 345-56.
3. Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1902 : 367-89.
4. Huntington G, McClure C. The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *Am J Anat* 1910 ; 10 : 178-310.
5. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002 ; 21 : 1505-13.
6. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999 ; 98 : 769-78.
7. Wilting J, Papoutsis M, Schneider M, Christ B. The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev Dyn* 2000 ; 217 : 271-8.
8. Ny A, Koch M, Schneider M, et al. A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med* 2005 ; 11 : 998-1004.
9. Yaniv K, Isogai S, Castranova D, et al. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 2006 ; 12 : 711-6.
10. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 2422-32.
11. Srinivasan RS, Oliver G. Prox1 dosage controls the number of lymphatic endothelial cell progenitors and the formation of the lymphovenous valves. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 2187-97.