



**HAL**  
open science

# Cartographie de la voie médiée par les récepteurs aux neurotrophines dans la région Aorte Gonade Mésonéphros chez l'embryon de souris

Pierre-Yves Canto

► **To cite this version:**

Pierre-Yves Canto. Cartographie de la voie médiée par les récepteurs aux neurotrophines dans la région Aorte Gonade Mésonéphros chez l'embryon de souris. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03545712

**HAL Id: hal-03545712**

**<https://ephe.hal.science/hal-03545712>**

Submitted on 27 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

**MÉMOIRE**

présenté par

**Pierre-Yves CANTO**

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études  
Sciences de la Vie et de la Terre

**Cartographie de la voie médiée par les récepteurs aux  
neurotrophines dans la région Aorte Gonade  
Mésonéphros chez l'embryon de souris.**

Jury composé de :

Dr Betty Gardie Maître de conférence EPHE, Nantes	Présidente
Dr Charles Durand Professeur des universités SU, Paris	Tuteur scientifique
Dr Dominique Bluteau Maître de conférence EPHE, Paris	Tutrice pédagogique
Dr Christophe Lancrin DR EMBL, Rome	Rapporteur
Dr Michelle Crozatier-Borde DR CNRS, Toulouse	Examinatrice

## Remerciements

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir participé à ma soutenance. En particulier, merci à mon rapporteur Christophe Lancrin pour ses remarques et suggestions constructives au sujet de mon manuscrit qui m'ont permis de l'améliorer. J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à Dominique Bluteau qui m'a accompagné durant tout mon parcours de diplôme EPHE, pour tous ses conseils et sa lecture finale de mon manuscrit. Je remercie Charles Durand pour son aide et pour ses conseils dans l'approche de rigueur scientifique du projet. Je le remercie également pour le temps qu'il a passé à corriger mon manuscrit. Je remercie Thierry Jaffredo pour son soutien lors de ma démarche de formation EPHE, pour les échanges scientifiques que nous avons eu concernant mon projet, pour sa lecture de mon manuscrit et pour ses précieuses remarques.

Un grand merci également à Sylvie Schneider-Maunoury directrice du Laboratoire de Biologie du Développement qui a accepté que je m'engage dans cette formation et qui m'a suivi pendant ces années.

Merci aux membres de l'équipe que j'ai côtoyés au quotidien pendant ces années de diplôme : Laurence, Rodolphe les ingénieurs de l'équipe.

Merci aux doctorants de l'équipe avec qui j'ai pu collaborer : Olivera et Olivier. Merci notamment à Olivier pour l'analyse bio-informatique des données « cellule unique ».

Merci aux autres membres de l'équipe arrivés plus récemment : Clémence et Laurent.

Merci aussi aux autres « ITA » du 6<sup>ème</sup> : Cédrine, Marie-Ange et Viviane pour leurs aides techniques et leurs bonnes humeurs. Merci aussi à Isabelle Anselme qui est elle-même diplômée de l'EPHE et avec qui j'ai pu discuter de mon projet.

Je remercie également tous les services communs avec lesquels j'ai collaboré :

-Le service d'illustration de l'IBPS avec Sophie Gournet qui m'a aidé pour mettre en forme certaines planches du manuscrit.

-Le service d'imagerie de l'IPBS avec France Lam, Suzanne Bolte et Jean-François Gilles qui m'ont aidé pour les imageries confocales et 3D.

- Stéphane Fouquet et Morgane Belle du service d'imagerie de l'Institut de la Vision pour les acquisitions sur le microscope à feuille de lumière.

-Le service de cytométrie en flux des Cordeliers avec Hélène Fohrer-Ting pour les tris cellulaires.

Pour finir, je tiens aussi à remercier les personnes qui me sont proches et qui m'ont toujours soutenu et encouragé : mes parents, mon frère et ma sœur.

## Table des matières

<b>A-Introduction</b>	<b>8</b>
<b>I-Généralités</b>	<b>8</b>
<b>II-L'hématopoïèse chez l'adulte</b>	<b>8</b>
II-1.Structure hiérarchique	9
II-2.Vision hiérarchique revisitée	10
II-3.Phénotype des CSH et tests biologiques	10
II-4.Le microenvironnement des CSH dans la moelle osseuse	11
<b>III-L'hématopoïèse chez l'embryon</b>	<b>12</b>
III-1.Hématopoïèse primitive	12
III-2.Hémangioblaste et modèle ES	13
III-3.Hématopoïèse définitive transitoire	14
III-4.Hématopoïèse définitive	14
III-5.Régulation intrinsèque des CSH	16
III-6.Régulation extrinsèque: le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM	18
III-7.Le système nerveux sympathique et l'hématopoïèse aortique	19
<b>B-Contexte de l'étude et objectifs du projet</b>	<b>20</b>
I-Microdissection laser et approche transcriptomique	20
II-Les récepteurs TRK	23
III-Objectifs du projet	26
<b>C-Matériels et Méthodes</b>	<b>26</b>
I-Immunofluorescence sur coupes histologiques	26
II-Immunomarquage sur embryon entier	27
III-Clarification des tissus	27
IV-Acquisition et visualisation des embryons 3D	27
V-Microdissection laser et qRT-PCR	27
VI-Hybridation <i>in situ</i>	28
VII-Cytométrie en flux et qRT-PCR	28
VIII-Analyses statistiques des données de qRT-PCR	29
IX-Protocole scRNA-Seq	29
X-Analyse bioinformatique des données NGS	31

<b>D-Résultats</b>	<b>31</b>
<b>I-Profiles d'expression spatio-temporel des récepteurs TRKB et TRKC sur coupes en immunofluorescence</b>	<b>31</b>
<b>II-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur tissus aortiques micro-disséqués par qRT-PCR</b>	<b>40</b>
<b>III-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur cellules d'AGM isolées par cytométrie en flux</b>	<b>41</b>
<b>IV-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur cellules d'AGM TRKB+/TRKC+ triées isolées par cytométrie en flux</b>	<b>43</b>
<b>V-Profiles d'expression des ligands <i>Bdnf</i> et <i>Ntf3 (NT-3)</i> par Hybridation <i>in situ</i></b>	<b>45</b>
<b>VI-Identité des cellules TRKB et TRKC par analyse RNAseq Single Cell</b>	<b>47</b>
VI-1. Contrôle qualité	47
VI-2. Carte cellulaire	49
<b>E-Discussion et perspectives</b>	<b>54</b>
<b>F-Références Bibliographiques</b>	<b>58</b>
<b>G-Annexes</b>	<b>62</b>

## Abréviations

AGM : Aorte Gonades Mésonephros  
ARN : Acide Ribonucléique  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor  
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4  
Dpc : Day post-coïtum  
CAFC : Cobblestone Area Forming Cell  
CE : Cellule endothéliale  
CH : Cellule hématopoïétique  
CITE-Seq : Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing  
CMF : Cytométrie en flux  
c-Kit : Récepteur au Stem Cell Factor SCF  
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique  
CSPH : Cellule Souche et Progéniteur Hématopoïétique  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DRG : Ganglion de la Racine Dorsale  
EB : Corps Embryoïde  
EHT : Transition Endothélio-Hématopoïétique  
EMPs : Erythro-myéloïde progéniteurs  
ES : Cellule Souche Embryonnaire  
Flk1 : Récepteur tyrosine kinase au VEGF  
GAPDH : D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
GATA3 : Facteur de transcription GATA Trans-acting T-cell-specific  
HIAC : Cluster Hématopoïétique Intra-Aortique  
HIS : Hybridation *In Situ*  
LIF : Leukemia Inhibitory Factor  
LTC-IC: Long Term Culture –Initiating Cell  
MO : Moelle osseuse  
NGF : Nerve growth factor  
NGS : Next Generation Séquençage  
NTRK : Neurotrophin Receptor Kinase  
NTF3 : Neurotrophin-3  
NTF4/5 : Neurotrophin-4 et 5  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
P-Sp : Splanchnopleure Para-aortique  
qRT-PCR : RT-PCR quantitative  
RT : Reverse Transcription  
scRNA-Seq : Single cell séquençage ARN  
SMA : Smooth Muscle Actin (actine des muscles lisses)  
SNS : Système Nerveux Sympathique

SG : Ganglion Sympathique

SV : Sac Vitellin

SVF : S rum de Veau Foetal

Th : Tyrosine Hydroxylase

Tuj1/TUBB3 : Tubulin beta 3

TRKA : Tropomyosine Receptor Kinase A

TRKB : Tropomyosine Receptor Kinase B

TRKC : Tropomyosine Receptor Kinase C

UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction

## Résumé

Les premières cellules souches hématopoïétiques (CSH) émergent dans la région Aorte-Gonades-Mésonéphros (AGM) chez l'embryon de vertébrés. Ce processus se déroule au cours d'une courte période développementale, entre les jours 10,5 et 12,5 chez l'embryon de souris. Plus précisément, les CSH naissent à partir de cellules endothéliales aortiques dites hémogéniques dans la région ventrale de l'aorte dorsale. Afin de mieux caractériser le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM, nous avons exploré la signature moléculaire des tissus entourant l'aorte dorsale en combinant des approches de microdissection laser, de puces à ADN et d'analyses bioinformatiques. Cette étude a montré que les gènes *Ntrk2* et *Ntrk3*, codant deux récepteurs aux neurotrophines (les protéines TRKB et TRKC), sont préférentiellement exprimés dans les cellules sous-jacentes à l'aorte dorsale. Mon projet a pour objectif principal de cartographier de façon approfondie la voie médiée par les neurotrophines dans l'AGM à l'aide d'approches de biologie moléculaire, d'imagerie et de transcriptomique à l'échelle cellule unique. Mes résultats suggèrent que 1) l'expression des récepteurs TRKB et TRKC est dynamique le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon de souris, 2) les populations TRKB<sup>+</sup> et TRKC<sup>+</sup> présentent des différences phénotypiques et moléculaires et 3) l'expression des gènes codant les neurotrophines (*Bdnf*, *Ntf3* et *Ntf5*) est hétérogène et associée à des cellules neurales (*Bdnf*), mésenchymateuses (*Bdnf*, *Ntf3* et *Ntf5*) et musculaires lisses (*Bdnf*). Mes résultats renforcent également l'existence d'une population de cellules neuro-mésenchymateuses dans la région sous-aortique. Des approches fonctionnelles sont maintenant envisagées pour étudier le rôle fonctionnel de la voie médiée par les neurotrophines dans l'hématopoïèse aortique.

Mots clés : Embryon, AGM, CSH, niche, *Ntrk2*, *Ntrk3*, TRKB, TRKC, neurotrophines, microdissection laser, transcriptomique, cellule unique.

## **A-Introduction**

### **I-Généralités**

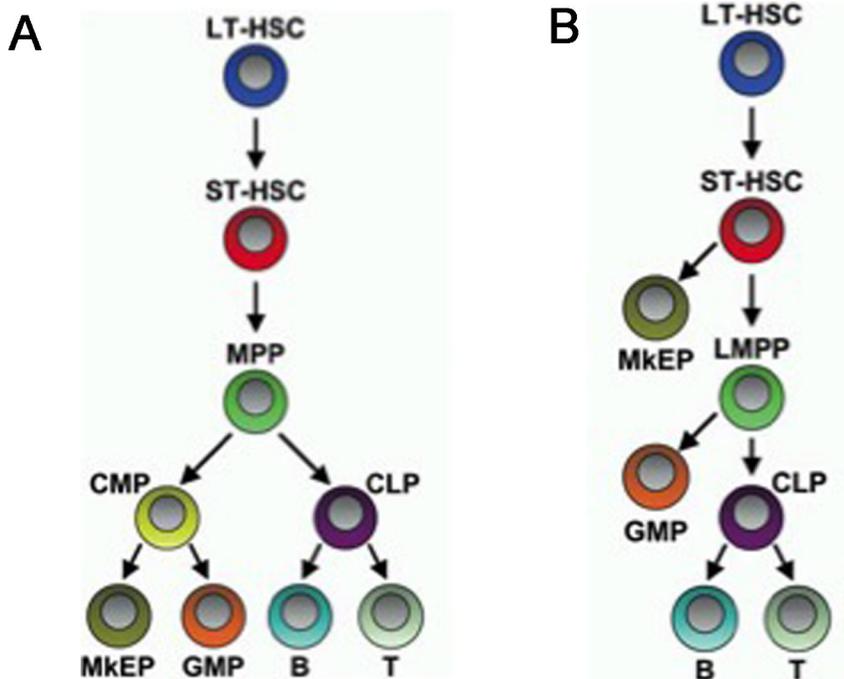
Le sang est un tissu liquide contenant 55% de plasma et 45% d'éléments figurés composé de plusieurs types cellulaires, tels que les érythrocytes, les leucocytes ou encore les plaquettes. Chaque type de cellules a une fonction bien déterminée. Par exemple, les plaquettes servent au colmatage des brèches vasculaires, les érythrocytes servent au transport de l'oxygène et les lymphocytes servent à la défense de l'organisme. Ces cellules, dont la durée de vie est limitée, ont besoin d'être renouvelées tout au long de la vie de l'individu. L'hématopoïèse est le processus physiologique qui assure la production continue des différentes lignées de cellules sanguines tout au long de la vie. Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse. Elle repose sur l'existence de rares cellules multipotentes et capables de s'auto-renouveler : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'existence des CSH a été démontrée par la capacité des cellules médullaires de rongeurs à reconstituer totalement l'hématopoïèse après greffe chez des sujets ayant subi une irradiation par une dose entraînant des lésions hématopoïétiques irréversibles (aplasie médullaire) (Lorentz et al. 1952). C'est en 1961 qu'une expérience fondatrice a été réalisée par Till & McCulloch et que le concept de cellules multipotentes a émergé. Ils ont en effet observé que l'irradiation suivie d'une reconstitution par injection d'un petit nombre de cellules de moelle osseuse provoque l'apparition de nodules constitués de colonies érythroïdes et myéloïdes clonogéniques dans la rate des souris. Les auteurs ont donc conclu à l'existence d'un progéniteur pluripotent commun à ces deux lignages : le CFU-S (Colony Forming Unit in the Spleen) (Till and McCulloch 1961).

### **II-L'hématopoïèse chez l'adulte**

Les CSH sont très rares dans l'organisme, elles représentent, chez l'adulte, 0,05% des cellules de la moelle osseuse. Leurs principales caractéristiques sont une capacité d'auto-renouvellement, qui permet de maintenir leur nombre constant, une capacité de différenciation, qui va aboutir à la production de tous les types cellulaires de l'hématopoïèse, et une capacité de quiescence, permettant une réserve en cas de nécessité de production cellulaire accrue. Afin de protéger leur patrimoine génétique, le nombre de division cellulaire des CSH est très faible.

## II-1. Structure hiérarchique

Le modèle classique de l'hématopoïèse est pyramidal et hiérarchisé : toutes les cellules sanguines dérivent d'un contingent de rares CSH. Ces CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents qui se multiplient et peuvent s'engager dans les voies de différenciation érythroïde, myéloïde et lymphoïde, puis en précurseurs de plus en plus différenciés, jusqu'à aboutir aux éléments matures du sang (Figure 1 A).



**Figure 1: Le système hématopoïétique chez l'adulte (d'après Adolfsson et al. 2005).**

Ce schéma montre la structure pyramidale du système hématopoïétique chez l'adulte (A) et l'un des modèles révisés (B). Les CSH puis différents types de progéniteurs, myéloïdes et lymphoïdes donnent naissance dans la moelle osseuse aux différents éléments matures du sang. LT-HSC, cellule souche hématopoïétique à long terme; ST-HSC, cellule souche hématopoïétique à court terme; MPP, progéniteur multipotent; LMPP, progéniteur lymphoïde multipotent; CLP, progéniteur lymphoïde commun; CMP, progéniteur myéloïde commun; GMP, progéniteur granulocyte/macrophage; MKEP, progéniteur megacaryocyte/érythroïde; B, cellule B; T, cellule T.

## II-2. Vision hiérarchique revisitée

Il est important de noter ici que la vision classique de la différenciation hématopoïétique a été récemment revisitée, notamment à l'aide de nouvelles approches de lignage cellulaire et d'analyses à l'échelle de la cellule unique. Chez la souris par exemple, une population de CSH  $c\text{-kit}^+ \text{Sca1}^{\text{Lin}} \text{Flt3}^+$  ayant un fort potentiel de différenciation myélo-lymphoïde mais pas érythro-mégacaryocytaire a été identifiée (Adolfsson et al. 2005) (Figure 1 B). De même, des expériences de traçage cellulaire ont révélé que la plupart des progéniteurs communs myéloïdes étaient restreints dans leur capacité de différenciation et produisaient soit des cellules myéloïdes soit des cellules érythroïdes (Périé et al. 2015). Chez l'homme, des cellules du lignage érythroïde et mégacaryocytaires peuvent directement dériver de CSH médullaires (Notta et al. 2016). Ces nouvelles données mettent donc en évidence le grand degré de plasticité du compartiment des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques.

## II-3. Phénotype des CSH et tests biologiques

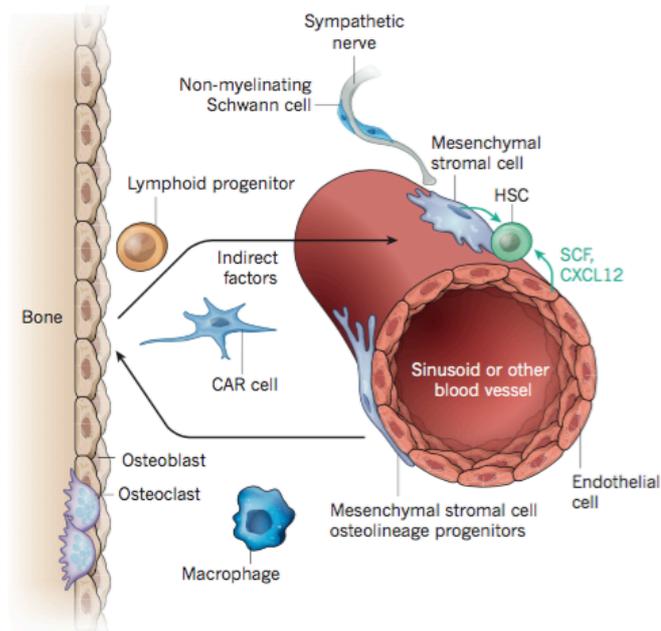
Il n'existe pas à ce jour de marqueurs spécifiques permettant d'isoler une population de CSH « pure ». En revanche, il est possible d'obtenir une population de cellule enrichie en CSH sur la base de l'expression d'une combinaison de marqueurs de surface. Les travaux de Irving Weissman et collaborateurs ont montré que les CSH chez la souris adulte expriment les antigènes  $c\text{-Kit}$  et  $\text{Sca1}$  et sont négatives pour les marqueurs de différenciation des lignages érythroïdes ( $\text{Ter119}$ ), myéloïdes ( $\text{Gr-1}$  et  $\text{Mac1}$ ) et lymphoïdes ( $\text{B220}$  et  $\text{CD3}$ ) (Spangrude et al. 1988). Des tests fonctionnels (voir ci-dessous) ont permis de montrer qu'environ une cellule  $c\text{-kit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^{\text{Lineage}}^-$  sur 4 possède des capacités de reconstitution à long-terme et multilignage (Osawa et al. 1996). Plus récemment, l'expression différentielle des marqueurs  $\text{CD150}$  et  $\text{CD48}$  a montré que 1 cellule  $c\text{-kit}^+ \text{Sca1}^+ \text{Lin}^- \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$  sur deux présentait un potentiel de CSH (Kiel et al. 2005). Ainsi, même l'utilisation d'un cocktail de plus de 8 anticorps monoclonaux spécifiques ne permet pas d'isoler une fraction pure de CSH. Ces dernières sont identifiées à posteriori sur la base de leurs propriétés fonctionnelles à l'aide de tests biologiques appropriés. Le test standard pour identifier et quantifier les CSH consiste à injecter des suspensions cellulaires dans des souris adultes irradiées avec des doses létales d'irradiation et à évaluer leur potentiel de reconstitution du système sanguin à long terme et dans les différents lignages hématopoïétiques.

Afin de compléter les informations obtenues par le test standard *in vivo*, il existe les tests clonogéniques *in vitro* qui permettent de mettre en évidence la présence de progéniteurs hématopoïétiques plus ou moins engagés. Les cellules sont mises en culture dans un milieu semi-solide (methylcellulose) en présence de cytokines recombinantes. Ce milieu permet aux progéniteurs hématopoïétiques de proliférer et de se différencier. Ces cellules acquièrent les caractéristiques morphologiques de leur lignée ce qui permet de caractériser les progéniteurs présents. Le test LTC-IC (Long Term Culture –Initiating Cell) permet de voir le potentiel de production hématopoïétique à long terme d'une population cellulaire. La technique consiste à cultiver à long terme des cellules hématopoïétiques sur un tapis de cellules stromales immortalisées. Ce type de culture permet d'observer à la fois la production de cellules

hématopoïétiques et de CAFC (Cobblestone Area Forming Cell) constituées de petites cellules rondes nichées dans le tapis de cellules supportrices. Plus l'apparition des CAFC est tardive, plus le progéniteur qui en est à l'origine est primitif. Cet ensemble de tests permet de déterminer le potentiel lymphoïde ou myéloïde d'une population cellulaire, de déterminer son enrichissement en CSH et à terme identifier de nouveau marqueur pour purifier plus précisément les différentes populations au sein des CSH.

#### II-4. Le microenvironnement des CSH dans la moelle osseuse

Il est maintenant bien établi que les CSH résident dans des microenvironnements particuliers (appelés niches) au sein de la moelle osseuse. Les CSH sont préférentiellement localisées à proximité des sinusoides et artérioles et divers types cellulaires ont été identifiés comme constituants importants de la niche des CSH dans la moelle osseuse. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les cellules stromales mésenchymateuses et leurs dérivés tels que les ostéoblastes, les adipocytes et les cellules périvasculaires. Les macrophages et mégacaryocytes, les lymphocytes T régulateurs et des cellules du système nerveux sympathiques ont également été décrites comme étant étroitement associées aux CSH (Figure 2) (Morrison and Scadden 2014, Crane et al. 2017, Durand et al. 2018).



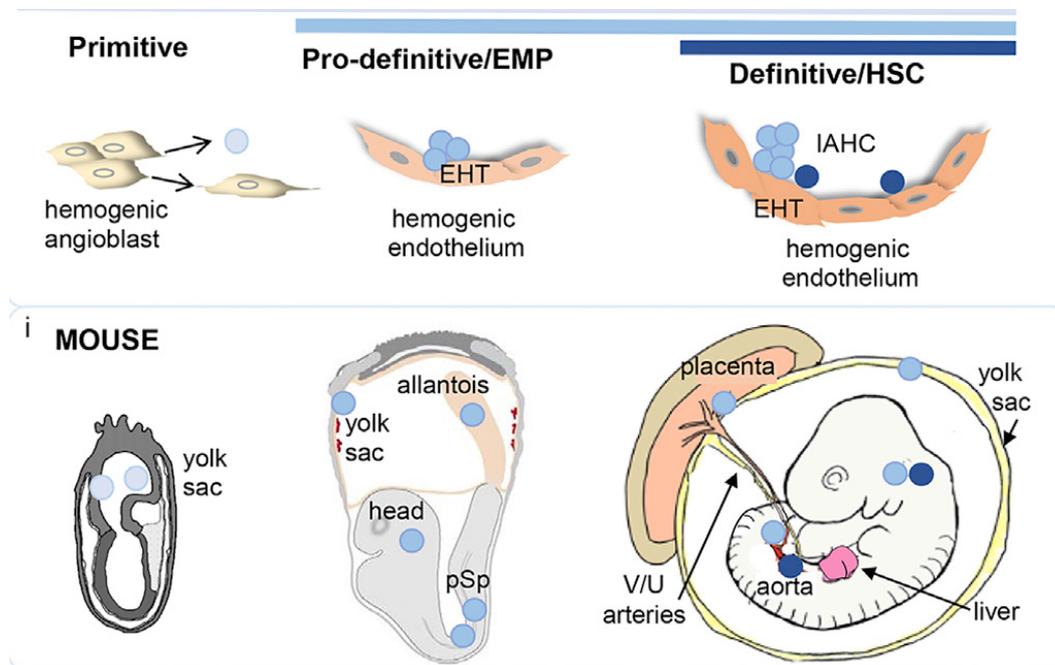
**Figure 2: La niche des CSH dans la moelle osseuse.** Les CSH sont préférentiellement associées aux sinusoides et artérioles et établissent des interactions étroites avec divers types de cellules d'origine mésenchymateuse, hématopoïétique et neurale (d'après Morrison and Scadden 2014).

Sur le plan moléculaire, les cellules de la niche médullaire contrôlent la survie, la prolifération, et la différenciation des CSH au travers de molécules impliquées dans des processus d'adhésion cellulaire, de signalisation cellules-cellules et de remodelage (synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire). Deux régulateurs extrinsèques des CSH médullaires font l'objet actuellement d'intenses investigations : une cytokine : stem cell factor et une chémokine : CXCL12 (Morrison and Scadden 2014, Durand et al. 2018).

### III-L'hématopoïèse chez l'embryon

#### III-1.Hématopoïèse primitive

Le sac vitellin (SV) de l'embryon de souris est un site d'hématopoïèse précoce : ce sont en effet essentiellement des progéniteurs primitifs unipotents qui sont générés à partir du jour 7,5 de gestation (E7,5) au niveau des îlots sanguins. En terme d'ontogénie, trois types cellulaires vont apparaître : des érythrocytes primitifs, des macrophages et des mégacaryocytes. Ces cellules se différencient dans îlots sanguins du sac SV et partent dans la circulation en tant que cellules matures. Cette vague d'hématopoïèse précoce du SV est nommée hématopoïèse primitive, par opposition à celle dite définitive qui produit les premières cellules souches hématopoïétiques multipotentes dans la région intra-aortique entre E10,5 et E12,5 chez la souris (Figure 3).



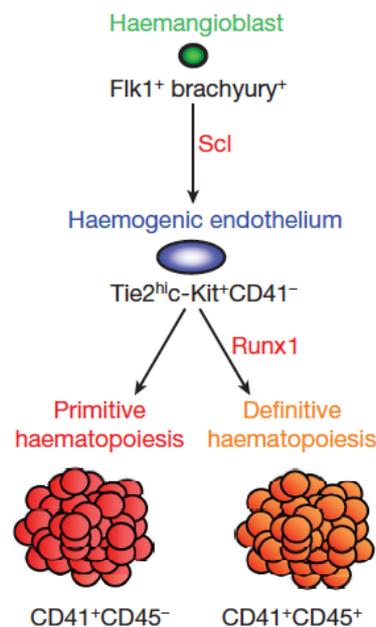
**Figure 3: Les trois vagues hématopoïétiques lors du développement de l'embryon de souris.**

Différentes classes de cellules hématopoïétiques, sont progressivement générées chez la souris à 3 stades de développement de l'embryon : E7,5, E9,0 et E10,5 (de gauche à droite). La classe primitive est dérivée de l'hémangioblaste, et les autres sont considérés comme dérivés de cellules vasculaires spécialisées appelées endothélium hémogénique. La colonisation du foie par des progéniteurs hématopoïétiques commence à la fin de l'E9. L'embryon à E10,5 contient des progéniteurs hématopoïétiques dans l'aorte dorsale (AGM), dans les artères vitellines (V) et ombilicales (U), et les premières CSH commencent à y circuler. EMP= érythromyéloïde progéniteur, EHT= transition endothélio-hématopoïétique, IAHC= cluster hématopoïétique intra-aortique (d'après Dzierzak & Bigas 2018).

### III-2.Hémangioblaste et modèle des cellules souches embryonnaires (ES)

L'hémangioblaste a été décrit pour la première fois en 1920. En effet, l'observation dans le sac vitellin d'îlots sanguins associant étroitement cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques posa la question du lien entre les deux types cellulaires (Sabin et al. 1920). Des expériences ont ensuite été réalisées *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires de souris dites cellules ES. Ces cellules dérivent de la masse cellulaire interne des embryons au stade blastocyste et sont pluripotentes. Cultivées en l'absence du facteur de croissance LIF, elles forment des corps embryoides (EBs) qui peuvent être dissociés et produire à la fois des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques. Un progéniteur nommé BL-CFC (Blast Colony Forming Cells) a été identifié dans les EBs précoces et suggéré correspondre à l'hémangioblaste. En effet, après culture en dilution limite, les BL-CFC donnent des colonies cellulaires clonogéniques pouvant générer, suivant les conditions de culture, des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques de type érythrocytes et macrophages. C'est ainsi que la question de l'existence d'un hémangioblaste a été posée (Keller et al. 1993). Il a ensuite été établi que cette cellule assimilée à l'hémangioblaste exprimait les marqueurs de surface FLK1, CD34 et le facteur de transcription SCL (Kennedy et al. 1997, Choi et al. 1998).

Une étude plus récente a montré que la formation des cellules hématopoïétiques à partir de l'hémangioblaste passait par la formation d'un endothélium hémogénique qu'on peut retrouver à la fois *in vitro* lors de la différenciation des BL-CFC et *in vivo* lors de la gastrulation chez la souris (Lancrin et al. 2009). Les auteurs ont montré que le facteur de transcription SCL est indispensable à l'établissement de cette population d'endothélium homogène alors que le facteur RUNX1 est critique pour la génération de cellules hématopoïétiques définitives à partir de l'endothélium homogène (Figure 4).



**Figure 4: Modèle de la différenciation de l'hémangioblaste du sac vitellin (d'après Lancrin et al. 2009).** L'hémangioblaste exprimant les marqueurs FLK1 et brachyury donne naissance à un endothélium hémogénique.

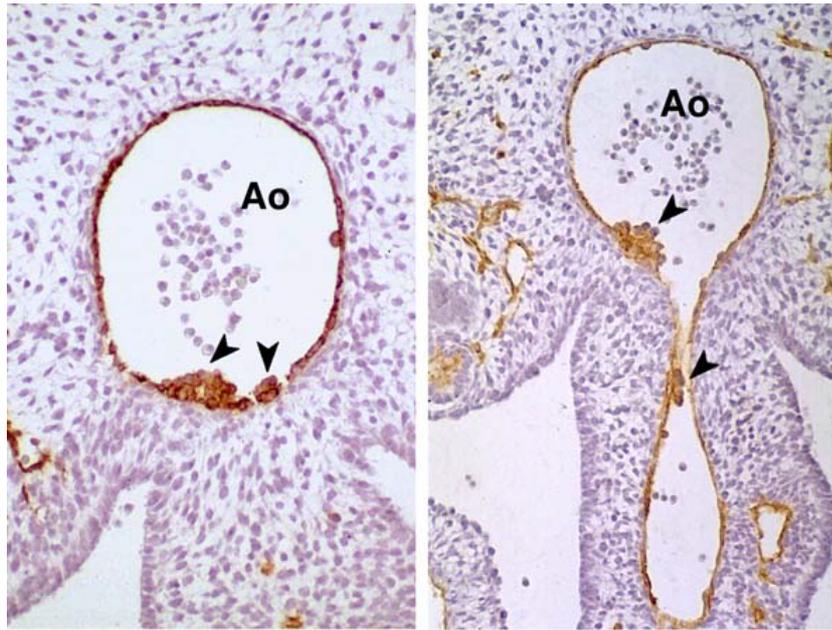
### **III-3.Hématopoïèse définitive transitoire**

Peu de temps après la formation des cellules hématopoïétiques primitives, la seconde vague, dite définitive transitoire, se produit dans différents sites de l'embryon de souris : sac vitellin, splanchnopleure paraortique (pSp) et allantoïde (Figure 3). Cette seconde vague produit notamment des progéniteurs érythro-myéloïdes (EMPs) dont la fonction et la contribution à l'hématopoïèse fœtale et adulte sont à présent bien documentées (Kierdof et al. 2015). Ce sont des progéniteurs multipotents qui se différencient dans le foie fœtal. Les EMPs contribuent notamment à la formation de macrophages résidents qui persistent dans différents tissus (cerveau, peau, poumon, foie) tout au long de la vie. C'est pourquoi cette vague est qualifiée d'hématopoïèse définitive transitoire.

### **III-4.Hématopoïèse définitive**

Les CSH sont localisées chez l'adulte dans la moelle osseuse (MO). Les CSH ne sont pas produites dans la MO mais naissent dans la région AGM (Aorte Gonades Mésonéphros), entre les jours 10,5 et 12,5 de gestation chez la souris. Il est maintenant bien établi que les CSH émergent à partir de cellules endothéliales (CE) hémogéniques au niveau du plancher de l'aorte dorsale lors d'une transition cellules endothéliales-cellules hématopoïétiques (EHT) (Jaffredo et al. 1998, de Bruijn et al. 2002, Oberlin et al. 2002) (Figure 5). En effet, les premières CSH, apparaissent de manière autonome et en petit nombre au niveau de l'aorte embryonnaire. L'aorte, comme tous les vaisseaux, est tapissée de cellules endothéliales. Les CSH sont générées à partir de cellules endothéliales (CE) spécialisées qualifiées d'hémogéniques qui se transforment en cellules hématopoïétiques (CH). Durant ces étapes, elles sont en contact étroit avec différents microenvironnements cellulaires jouant un rôle décisif sur leurs fonctions.

Les CSH migrent ensuite dans le foie fœtal où elles s'amplifient massivement puis, à la fin de la gestation, colonisent la MO où elles seront maintenues tout au long de la vie. Dans chacun de ces différents sites hématopoïétiques, les CSH sont en étroite association avec des cellules stromales qui constituent un microenvironnement (ou niche) essentiel à leur survie, prolifération et différenciation.



**Figure 5: Bourgeoisements intra-aortiques chez l'embryon humain.** Embryon humain au jour 32 de gestation présentant des bourgeoisements hématopoïétiques au niveau du plancher de l'aorte dorsale Ao= aorte dorsale (photos issues de Tavian et al. 1999).

La transition endothélio-hématopoïétique (EHT) a lieu dans différents sites dans l'embryon de souris (Figure 3). Néanmoins, l'hématopoïèse définitive a lieu lors de l'EHT dans l'AGM. La spécification des cellules endothéliales hémogéniques de l'endothélium vasculaire embryonnaire se produit pendant de brèves périodes de développement dans des tissus distincts, et est nécessaire pour l'émergence de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH).

L'EHT a lieu dans la paroi ventrale de l'aorte dorsale. A l'exception de la souris où des bourgeoisements dans la partie dorsale de l'aorte peuvent s'observer, il existe une polarité dorso-ventrale dans l'apparition des bourgeoisements intra-aortiques. L'aorte dorsale de l'embryon est formée par la fusion de deux aortes bilatérales qui fusionnent sur la ligne médiane pour donner un vaisseau unique et central situé sous la notochorde. Les bourgeoisements apparaissent au niveau de l'endothélium ventral de l'aorte fusionnée. Chez la souris ce phénomène intervient vers le jour 10,5, chez l'embryon humain vers le jour 30 (Figure 5).

### III-5.Régulation intrinsèque des CSH

Il a été démontré que des souris dont le gène *Runx1* a été invalidé (*Runx1*<sup>-/-</sup>) n'ont pas de clusters hématopoïétiques dans l'aorte (North et al. 1999). Donc, le facteur de transcription RUNX1 joue un rôle clé dans la transition entre cellule et cellule hématopoïétique. *Runx1* est exprimé dans les cellules endothéliales hémogéniques et son expression est conditionnée à l'installation du mésenchyme sous aortique. La formation de cellule hématopoïétique est étroitement contrôlée par le mésenchyme sous aortique, bien que le mésenchyme ne soit pas une source de cellule hématopoïétique (Richard et al. 2013). Les rôles complémentaires des cellules endothéliales hémogéniques et des compartiments mésenchymateux dans le déclenchement de l'hématopoïèse aortique a été démontré par Richard et al. 2013. Le mésenchyme sous aortique induit l'expression de *Runx1* dans les cellules endothéliales hémogéniques et collabore avec le récepteur NOTCH pour contrôler l'hématopoïèse aortique.

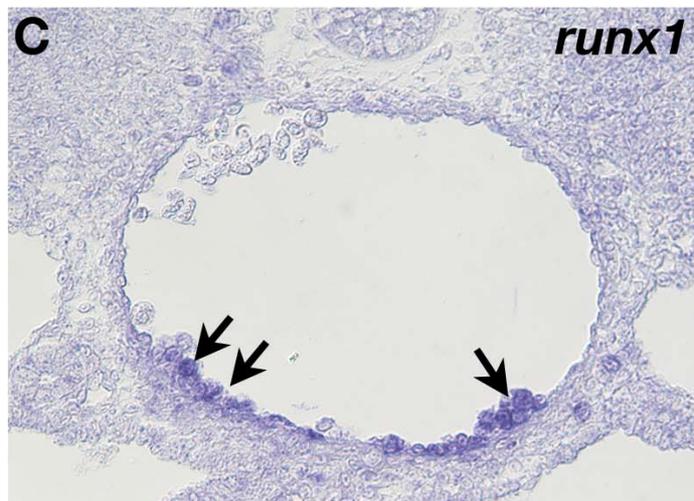
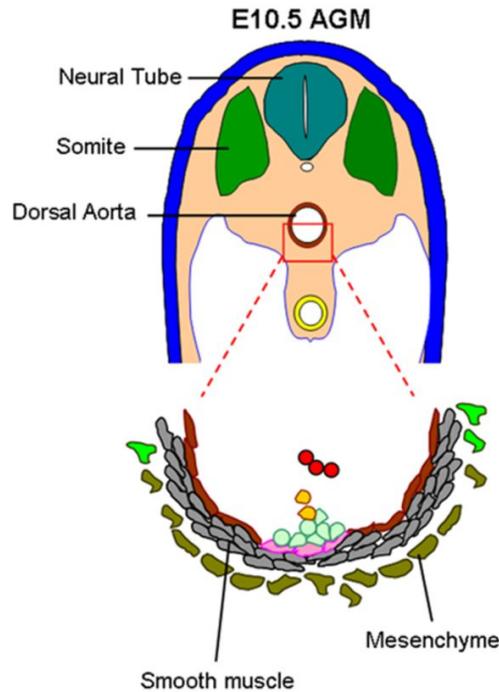


Figure 6: Expression du gène *Runx1* révélée par hybridation *in situ* sur coupe d'aorte d'embryon de poulet de 3 jours (Richard et al. 2013).



**Figure 7: Origine vasculaire de l'hématopoïèse définitive pendant l'embryogenèse.** L'hématopoïèse définitive commence en période prénatale à E10,5 chez la souris avec l'émergence de cellules souches hématopoïétiques (CSH) à partir de l'endothélium hémogénique dans le plancher ventral de l'aorte dorsale. Ce processus dépendant de *Runx1* implique des pré-CSH intermédiaires qui s'agrègent en tant que groupes hématopoïétiques intra-aortiques (HIAC). Peu de temps après leur émergence, les CSH entrent dans la circulation embryonnaire et ensemencent massivement le foie fœtal et finalement la moelle osseuse postnatale (Psaltis et al. 2015).

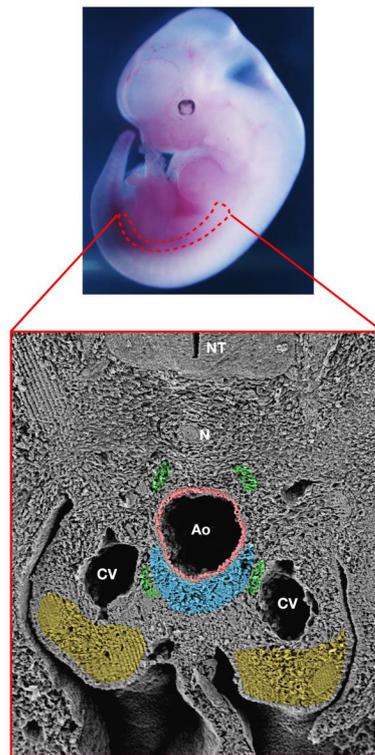
RUNX1 est donc un facteur cellulaire intrinsèque très important pour la formation des clusters de cellules hématopoïétiques intra-aortiques (HIAC) émanant de l'endothélium hémogénique (Figure 6 et 7).

Le facteur de transcription SCL (aussi appelé TAL1) est aussi un facteur essentiel à l'initiation de l'hématopoïèse. En effet, lorsque ce gène est invalidé chez la souris, l'embryon meurt à E9,5 et présente une absence totale d'hématopoïèse dans le sac vitellin (Shivdasani et al. 1995, Robb et al. 1996). La différenciation des cellules ES vers le lignage hématopoïétique est également complètement perturbée en l'absence de SCL (Porcher et al. 1996). De plus, toujours en utilisant le modèle ES, il a été démontré que SCL joue un rôle en amont de RUNX1 en activant le programme hématopoïétique dans les cellules endothéliales (Lancrin et al. 2009 et figure 4). Plus récemment, il a été découvert que SCL joue un rôle de balance entre différenciation cardiaque et hématopoïétique. SCL active l'endothélium hémogénique tout en réprimant la différenciation en cardiomyocyte de l'endothélium embryonnaire (Van Handel et al. 2012).

Un autre facteur de transcription important est Gata2. Les souris déficientes en Gata2 ont un nombre réduit de progéniteurs hématopoïétiques (Tsai et al. 1994). Il est aussi exprimé dans l'AGM au moment de l'émergence. En 2004, un double rôle de Gata2 dose dépendant a pu être montré chez la souris : il serait impliqué dans la production et l'expansion des CSH dans l'AGM ainsi que dans l'étape de prolifération des CSH dans la moelle osseuse adulte (Ling et al. 2004).

### III-6.Régulation extrinsèque : le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM

Si la niche des CSH dans la moelle osseuse fait l'objet d'intenses investigations et commence à être bien décryptée, la nature des cellules qui composent le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM et leurs identités moléculaires sont encore mal connues. Ces connaissances sont essentielles à la fois pour comprendre comment les CSH se forment chez l'embryon, et aussi pour produire de façon efficace des CSH transplantables à partir de cellules précurseurs *ex vivo*. La formation des CSH est finement régulée par des signaux extrinsèques émanant du microenvironnement aortique au travers d'un dialogue inter-compartiments (incluant notamment le mésenchyme sous-aortique, les somites et le système nerveux sympathique ; Figure 8). Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont montré le rôle clé de la région sous-aortique dans l'initiation et la production des CSH aortiques (Richard et al. 2013, Durand et al. 2007). Cependant, si plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme importantes dans la production aortique des CSH (telles que BMP, Hedgehog et Notch) (Bigas and Dzierzak 2018, Ottersbach 2019), une vision intégrée et approfondie de la signature moléculaire du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM fait toujours défaut.

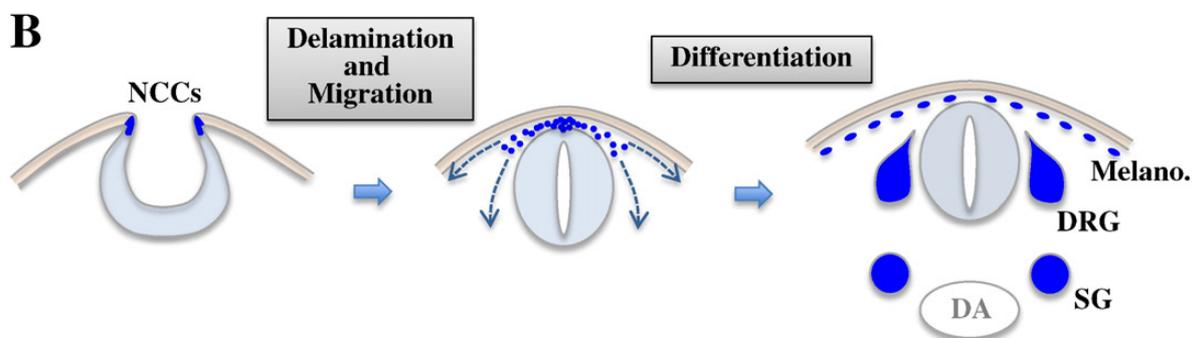


**Figure 8: Le microenvironnement hématopoïétique de l'AGM.** Panneau supérieur : Embryon de souris de E11.5. Le site AGM est indiqué par une ligne pointillée rouge. Panneau inférieur : microscopie électronique à balayage montrant les différents compartiments cellulaires du microenvironnement des CSPH de l'AGM : les cellules endothéliales (rouge), cellules musculaires lisses vasculaires et mésenchyme sous-aortique (bleu), système nerveux sympathique (vert), et crêtes urogénitales (jaune). Ao=aorte dorsale; CV=veine cardinale; NT=tube neural; N=notochorde (d'après Stik et al. 2017).

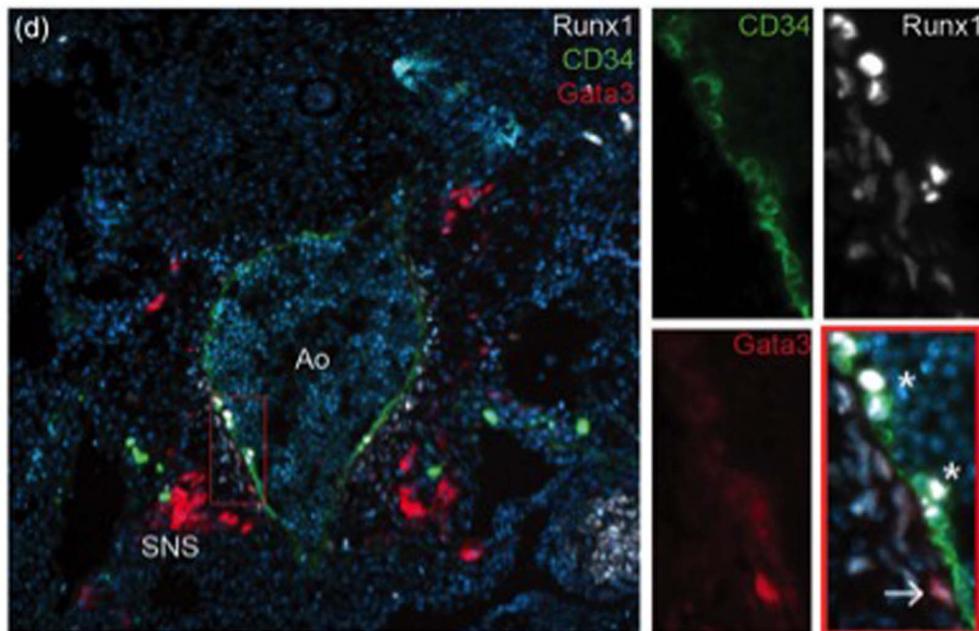
### III-7. Le système nerveux sympathique et l'hématopoïèse aortique

GATA3 est exprimé par les cellules du système nerveux sympathique (SNS) qui se développe autour de l'aorte à partir du jour 10.5 chez l'embryon de souris (Figure 9). GATA3 permet la maturation des cellules du système adrénosympathique qui ont la capacité de sécréter les catécholamines comme l'adrénaline ou la dopamine. D'après Fitch et al. le facteur de transcription GATA3 est nécessaire à la formation des CSH car il induit la synthèse des catécholamines qui stimuleraient les CSH naissantes (Fitch et al. 2012). De plus, il a été montré que des souris déficientes en Tyrosine Hydroxylase (Th), enzyme qui catalyse la synthèse des catécholamines, ont un déficit de production de CSH. GATA3 n'aurait donc pas un rôle direct mais influencerait le microenvironnement de l'AGM. En effet, le récepteur adrénergique (ADRB2) a été proposé pour relayer l'effet du SNS sur les CSH adultes car il a été démontré que le récepteur adrénergique b2 est exprimé à la surface des CSH dans l'AGM.

Plus récemment les mêmes auteurs ont observé la co-localisation de RUNX1 et GATA3 dans de rares cellules mésenchymateuses sous-aortiques (Figure 10), l'expression de RUNX1 réduite dans les embryons *Gata3*<sup>-/-</sup> et l'émergence des CSH modifiée (Fitch et al. 2019). En outre, en utilisant une lignée de cellules stromales dérivés d'AGM, ils ont aussi localisé la liaison de GATA3 au locus *Runx1* au niveau d'éléments promoteurs spécifiques qui montrent que *Runx1* est un gène cible direct de GATA3.



**Figure 9: Origine développementale du SNS.** Parmi les différents lignages de cellules de crêtes neurales (NCCs), les cellules des ganglions sympathiques (SG) migrent le long de la paroi ventrale de l'aorte dorsale (DA) tandis que les cellules des neurones sensoriels empruntent la voie des ganglions de la racine dorsale (DRG), les cellules migrant sous l'épiderme sont des précurseurs des mélanocytes (Mélano.) (Saito et al. 2015).

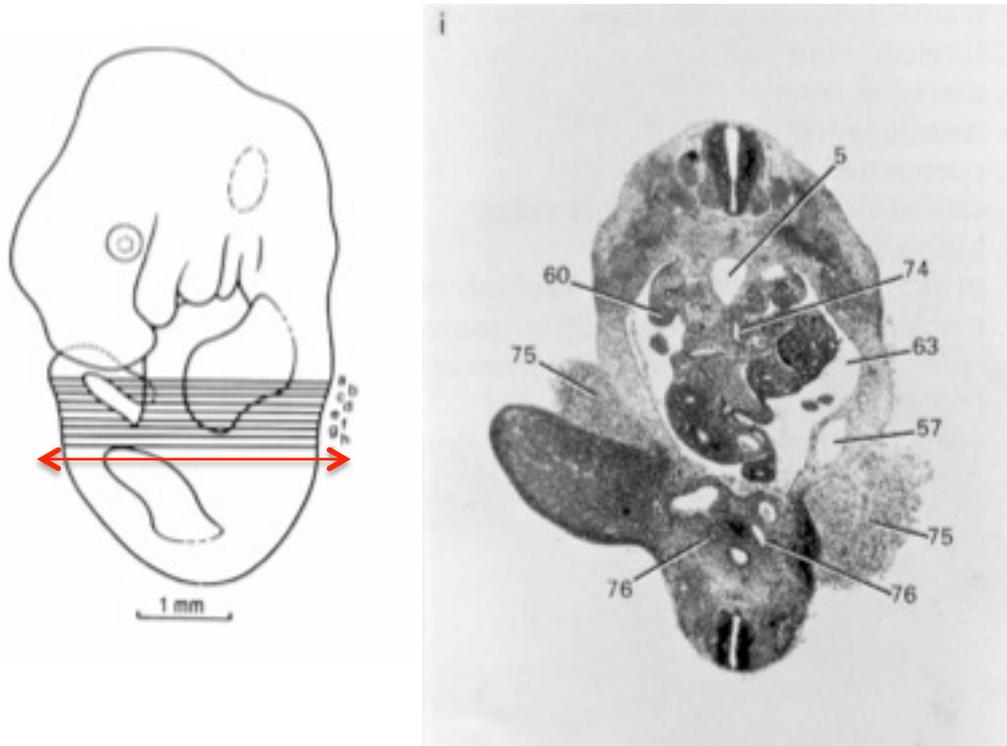


**Figure 10 : Immunofluorescence sur coupe d'embryon de souris de E11,5 montrant le marquage GATA3 dans l'endothélium hémogénique (Fitch et al. 2019).**

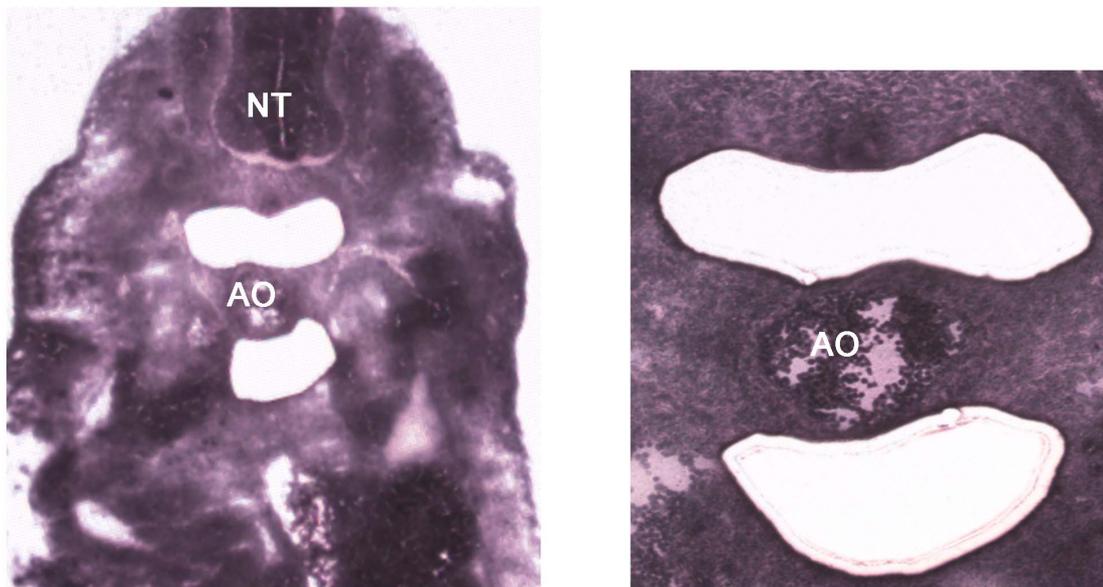
## **B-Contexte de l'étude et objectifs du projet**

### **I-Microdissection laser et approche transcriptomique**

Le groupe « Migration et différenciation des cellules souches hématopoïétiques » de l'UMR7622 Biologie du développement étudie depuis de longues années les processus moléculaires et cellulaires impliqués dans l'émergence des premières CSH et leur régulation par les cellules stromales constituant leur microenvironnement. Nous utilisons plusieurs modèles biologiques (oiseau, souris, humain et plus récemment poisson-zèbre) et combinons des approches d'embryologie expérimentale, d'hématologie et de biologie computationnelle. Mon projet de recherche s'intègre directement dans cette problématique et vise à explorer le paysage moléculaire du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM. Pour répondre à cette question biologique essentielle, je suis fortement impliqué dans un groupe de travail qui vise à explorer le dialogue moléculaire entre les CSH et leur niche au cours du développement. Pour étudier l'identité moléculaire des cellules du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM, notre stratégie a consisté à isoler par microdissection laser sur coupes d'embryons les régions sous- et sus-aortiques (Figure 11) et à comparer leurs profils d'expression géniques par puces à ADN.



**Figure 11: Coupe transversale d'embryon de souris à E11,5 dans la région médiane (entre les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs). 5=aorte dorsal, 74=artère mésentérique, 60=crête gonades, 63=cavité péritonéale, 75=sang non vasculaire, 57=veine ombilicale gauche, 76=canal métanéphrique (bourgeon urétral).**



**Figure 12: Stratégie de microdissection laser.** Des coupes d'embryons de souris à E11.5 colorées à l'hématoxyline éosine ont été déposées sur lames PEN et microdisséquées. NT= tube neural et AO= aorte. Les régions blanches représentent les tissus dorsal et ventral après microdissection.

Mon travail a, dans un premier temps, consisté à mettre au point les paramètres de la microdissection laser proprement dite (puissances des lasers, focus, ...) ainsi que les étapes se situant en amont (inclusion des embryons et les coupes histologiques) et en aval (collecte des échantillons microdisséqués, extraction des ARN totaux). Je travaille sur la station Arcturus XT<sup>®</sup>, microdissecteur combinant un laser UV pour découper le tissu et un laser IR pour récupérer le fragment sur une cap.

J'ai réalisé des coupes d'embryons de souris à E10,5, E11,5 et E12,5 correspondant respectivement à l'initiation, au pic puis au déclin du potentiel des CSH dans l'AGM (Medvinsky and Dzierzak 1996, Kumaravelu et al. 2002). La table ci-dessous représente les caractéristiques des échantillons dorsaux et ventraux collectés aux trois stades développementaux (Table 1).

Stage	Sample #	$\mu$ dissection	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	RNA (pg/ $\mu\text{l}$ )
E10.5	VT1	8	181917	100
E10.5	VT2	8	123901	336
E10.5	VT3	6	84431	120
E10.5	VT4	5	87885	45
E10.5	DT1	8	227741	182
E10.5	DT2	8	102109	91
E10.5	DT3	6	94265	93
E10.5	DT4	5	110030	23
E11.5	VT1	5	112256	256
E11.5	VT2	5	208447	581
E11.5	VT3	4	316542	294
E11.5	DT1	5	196256	420
E11.5	DT2	5	201851	334
E11.5	DT3	4	295497	581
E12.5	VT2	3	167725	310
E12.5	VT3	6	276511	29
E12.5	VT4	6	367767	125
E12.5	VT5	5	235330	59
E12.5	DT2	3	311436	822
E12.5	DT3	6	412076	324
E12.5	DT4	6	311614	126
E12.5	DT5	5	215926	239

**Table 1. Tableau récapitulatif des expériences de microdissection laser.** Sont indiqués les nombres d'échantillons ventraux (VT) et dorsaux (DT) à E10,5, E11,5 et E12,5, les surfaces microdisséquées et la quantité d'ARN totaux.

Dans la continuité de nos travaux sur l'extraction du cœur moléculaire de la fonction de soutien des CSH (Charbord et al. 2014, Desterke et al. 2020), nous avons ensuite combiné des approches à haut débit et des analyses bioinformatiques et biostatistiques pour comparer de façon approfondie la signature moléculaire des tissus aortiques dorsaux et ventraux. Nos résultats révèlent que les tissus aortiques présentent une identité moléculaire distincte et dynamique au cours du développement. Par ailleurs, nous avons caractérisé une population de cellules neuro-mésenchymateuse dans la région sous aortique à E11,5 et identifié fonctionnellement deux gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire (Décorine et Ténascine C) comme des régulateurs importants des CSH dans l'AGM (manuscrit prochainement soumis en annexe).

J'ai principalement consacré mon activité de recherche à l'étude de deux gènes associés au neuro-mésenchyme sous aortique qui codent des récepteurs aux neurotrophines (*Ntrk2* et *Ntrk3*).

## II-Les récepteurs TRK

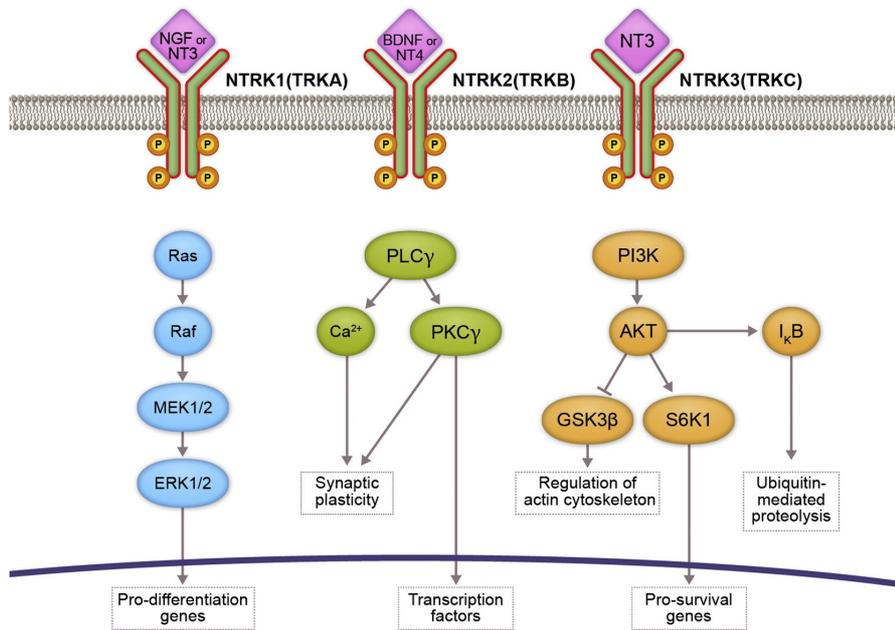
Ces récepteurs sont connus pour jouer un rôle dans le développement des neurones (Lamballe et al. 1994) mais leur implication dans le contrôle de l'hématopoïèse aortique n'est pas établie. Aux stades précoces du développement et tout au long de la différenciation du système sensoriel, les neurones des ganglions de la racine dorsale sont divisés en propriocepteurs qui transmettent les informations sur la position du corps, les mécanoccepteurs qui transmettent les informations du touché, de pression et des vibrations et, les nocicepteurs qui transmettent les informations thermiques et douloureuses. Les récepteurs TRKC, TRKB and TRKA sont exprimés par les neurones propriocepteurs, mécanoccepteurs et nocicepteurs et répondent au NT-3 (NTF3), à BDNF et NT-4 (NTF5) ainsi qu'au NGF respectivement.

Les souris invalidées pour TRKA et TRKB arrivent au terme du développement embryonnaire mais ne survivent que quelques semaines (Brodeur et al. 2009). Les déficits affectent le système nerveux central et périphérique (neurones sensitifs, nerf facial et neurones moteurs de la moelle épinière). Les souris *Ntf3*<sup>-/-</sup> et *Ntrk3*<sup>-/-</sup> sont viables mais souffrent d'une déficience proprioceptive causée par la perte de neurones propriocepteurs (Ernfors et al. 1994). Il en est de même pour les souris *Bdnf*<sup>-/-</sup>. La souris *Ntrk2*<sup>-/-</sup> présente le phénotype le plus grave.

La signalisation NT/TRK favorise non seulement la survie des neurones, mais est également nécessaire à la maturation phénotypique des neurones sensoriels (Moqrich et al. 2004). De plus, un lien a été établi entre la signalisation neurotrophique et l'expression du facteur de transcription Runx1 (Marmigere et al. 2006).

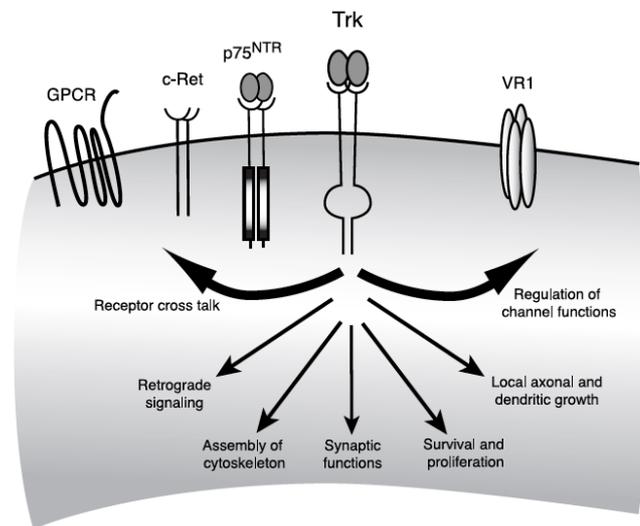
La voie de signalisation médiée par les neurotrophines implique trois récepteurs à activité tyrosine kinase (TRKA, TRKB et TRKC) et quatre ligands potentiels dans la voie canonique

(NT-3, NT-4, BDNF, NGF). Après fixation de leurs ligands, ces récepteurs activent différentes cascades de phosphorylation correspondant à trois voies différentes : Ras/Raf/MEK/ERK, PLC $\gamma$  et PI3K AKT (Figure 13).



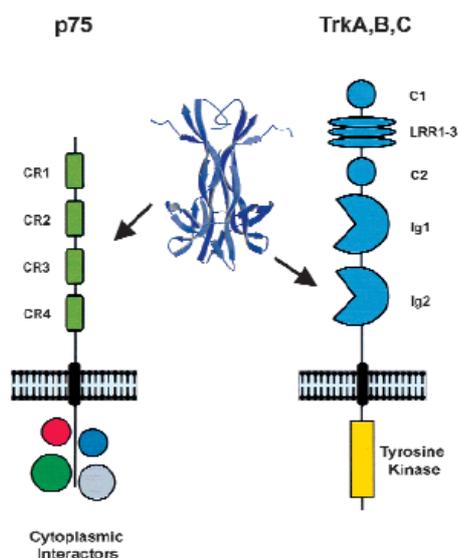
**Figure 13: Voie de signalisation des récepteurs aux facteurs neurotrophiques.** Schéma montrant les 3 récepteurs et leurs ligands dans la voie canonique. En intracellulaire cette réaction déclenche 3 cascades de phosphorylation possibles (d'après Khotskaya et al. 2017).

Les neurotrophines NGF, BDNF, NTF3 (NT-3) et NTF5 (NT-4/5) sont bien connues pour activer les récepteurs à tyrosine kinase TRKA, TRKB, TRKC et le récepteur de la protéine p75. Ce sont donc quatre ligands qui peuvent se lier spécifiquement à ces récepteurs. Le signal correspondant à cette interaction régule la survie des cellules, la croissance axonale et la prolifération cellulaire (Figure 14). L'activation du récepteur TRK est initiée par la phosphorylation du domaine intracellulaire, le domaine tyrosine kinase. Par la suite, la phosphorylation de la tyrosine active plusieurs petites protéines en aval, ce qui entraîne l'activation de l'expression des intermédiaires qui déclenchent la signalisation par le récepteur TRK. En outre, la protéine p75 peut moduler la réponse de la signalisation TRK, soit en influençant sa conformation, soit en activant des signaux distincts qui peuvent être synergiques ou antagonistes de ceux activés par les récepteurs TRK.



**Figure 14: Illustration des principales fonctions des récepteurs TRK.** Après avoir lié les neurotrophines, les récepteurs TRK participent à différentes fonctions dans la cellule telles que la régulation des canaux ioniques, l'assemblage du cytosquelette, la survie et la prolifération cellulaires (d'après Huang et Reichardt 2003).

Les récepteurs TRK présentent une organisation structurale similaire (Figure 15), différente de celle des autres récepteurs à tyrosine kinase. Ils se composent de trois motifs de 24 résidus riches en leucine, flanqués de deux groupes de cystéine. Il existe deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline C2, Ig1 et Ig2, qui sont suivis par une seule partie transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui contient une tyrosine kinase. Les domaines à tyrosine kinase sont similaires à 80% pour les trois types de récepteurs TRK, alors que les domaines extracellulaires sont divergents à 30% (Bibel et al. 2000).



**Figure 15: Organisation des récepteurs TRK (d'après Bibel et al. 2000).** Les trois récepteurs TRKA,B,C présentent un domaine tyrosine kinase intra-cytoplasmique similaire à 80%. C'est la partie extra-cellulaire qui est plus variable.

### III-Objectifs du projet

Cette étude a pour objectif de décrire l'identité moléculaire des cellules du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM. Plus précisément, mon travail consiste à cartographier de façon approfondie la voie de signalisation médiée par les récepteurs aux neurotrophines dans l'AGM. J'ai pour cela utilisé différentes approches expérimentales pour détecter les produits d'expression (ARNm et protéines) des gènes *Ntrk* et de leurs ligands. J'ai également exploré le profil d'expression des gènes *Ntrk2* et *Ntrk3* sur embryons entiers et initié des approches transcriptomiques à l'échelon de la cellule unique afin de mieux comprendre l'identité des cellules *Ntrk2*<sup>+</sup> et *Ntrk3*<sup>+</sup> ainsi que celles des cellules sécrétant leurs ligands.

### C-Matériels et méthodes

#### I-Immunofluorescence sur coupes histologiques

Il s'agit d'établir les profils d'expression de TRKB et TRKC sur coupes histologiques d'embryons au niveau de l'AGM en association avec des marqueurs vasculaires ou de cellules neurales. Je dispose pour cela d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes exprimés par ces différents types cellulaires (CD31, SMA, Th et Tuj1). Ces expériences sont effectuées sur des embryons aux stades E9,5, E10,5 et E11,5 ce qui permet d'avoir une expression dynamique de leurs expressions au cours du développement.

Les embryons de souris proviennent de souris C57BL/6, le jour 0,5 correspond à l'observation du bouchon vaginal. Les souris gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les embryons sont fixés en paraformaldéhyde (PAF) 4% dans du PBS1X pendant une nuit à 4°C, rincé en PBS1X puis placés en PBS1X/15% sucrose pendant au moins 24h avant d'être inclus dans une solution de PBS1X/gélatine 7,5 %/sucrose 15% refroidies puis congelés. Les blocs sont coupés en sections de 20 µm sur un cryostat (Leica CM3050S). Ces sections sont récupérées sur une lame (Thermo Sc Superfrost Plus). La gélatine est éliminée en incubant la lame 15 min en PBS1X à 37°C. La lame est ensuite traitée pour effectuer le marquage immunofluorescent, d'abord en incubant la lame en tampon de blocage PBS1X/5%SVF pendant 30 mn ensuite en incubant la lame en tampon PBS1X/5%SVF + anticorps pendant 1 h. Les anticorps primaires utilisés sont des immunoglobulines de chèvre anti-souris TRKB et/ou TRKC à 0,04 µg/mL (R&D Systems, AF1494 et AF1404), de lapin anti-souris CD31/PECAM à 0,2 µg/mL (Abcam, ab124432), de souris Anti-Souris Smooth Muscle Actin à 1 µg/mL (SMA, Sigma, A2547), de souris anti-souris Tyrosine hydroxylase 0,3 µg/mL (Th, Millipore, AB152) et de souris anti-souris Tuj1 à 1 µg/mL (Biolegend, réf : 801213). Les anticorps secondaires utilisés sont l'anti-chèvre Alexa 647 à 0,75 µg/mL (Jackson Immunoresearch., réf : 805-605-180), l'anti-lapin Cyanine 3 dilué à 0,75 µg/mL (Jackson Immunores., réf : 711-165-152), l'anti-souris Alexa 488 dilué 1 µg/mL (Thermo Sc, A21202). Les coupes sont ensuite visualisées soit sur un inversé microscope à épifluorescence (Leica DMI6000), un Confocal Sp5<sup>®</sup> (Leica) ou un ZeissApotome<sup>®</sup> (Zeiss). Les images sont ensuite traitées avec Metamorph, Zen et Image J.

## **II-Immunomarquage sur embryon entier**

Les embryons sont prélevés sur la corne utérine d'une souris gestantes puis fixés en PAF 4% dans du PBS toute la nuit à 4°C ou 3 heures à T° ambiante. Les échantillons sont d'abord incubés à température ambiante sur un agitateur rotatif dans une solution (PBSGT) de PBS 1X contenant 0,2% de gélatine (Prolabo), 0,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) et 0,01% de thimerosal (Sigma-Aldrich) pendant 3 heures. Ils sont ensuite transférés dans du PBSGT contenant les anticorps primaires TRKB ou TRKC à 0,02 µg/mL et CD31 à 0,2 µg/mL placés à 37°C, avec une rotation à 100 rpm, pendant 3 jours. Ce marquage est suivi de six lavages de 30 minutes dans du PBSGT à température ambiante. Ensuite, les échantillons sont incubés dans des anticorps secondaires Bovine anti-Goat alexa 647 et Donkey anti rabbit Cyanine à 0,75 µg/mL dans du PBSGT pendant une nuit. Après six lavages de 30 min dans du PBSGT à température ambiante, les échantillons sont conservés à 4°C dans du PBS1X jusqu'à la clarification.

## **III-Clarification des tissus**

J'ai utilisé la procédure de clarification 3DISCO (toutes les étapes d'incubation ont été réalisées à température ambiante dans une hotte, sur un rotateur de tubes à 14 rpm, à l'aide d'un tube à centrifuger de 15 ml (TPP, Dutscher) recouvert d'une feuille d'aluminium pour éviter tout contact avec la lumière (Belle et al. 2014). Les échantillons sont d'abord déshydratés dans une série graduelle (50%, 80%, et 100%) de tétrahydrofurane (THF, anhydre, Sigma-Aldrich) dilué dans H<sub>2</sub>O, pendant 1 heure. Cette étape est suivie d'une étape de délipidation de 20 min dans du dichlorométhane (DCM ; Sigma-Aldrich). Enfin, les échantillons sont nettoyés pendant une nuit dans de l'éther de dibenzyle (DBE ; Sigma-Aldrich). Les échantillons doivent être conservés dans un flacon en verre brun (Rotilabo, Roth) rempli de DBE, dans l'obscurité et à température ambiante.

## **IV-Acquisition et visualisation des embryons 3D**

Les images ont été acquises à l'aide d'un ultramicroscope (LaVision BioTec). L'imagerie 3D, la conversion des images et les films ont été générés à l'aide du logiciel Vision 4D 3.0 (Arivis). Ces acquisitions et analyses ont été réalisées sur la plateforme d'imagerie de l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) et sur la plateforme d'imagerie de l'Institut de la Vision.

## **V-Microdissection laser et qRT-PCR**

Pour confirmer l'expression différentielle des récepteurs TRK et leurs ligands dans les tissus sus- et subaortiques, je pratique des qRT-PCR sur cellules de tissus microdisséqués.

La microdissection laser s'effectue sur des sections déshydratées de 20 µm placées sur une lame Arcturus® Polyéthylène Naphthalate (PEN) et microdisséquées sur l'Arcturus XT® microdissection laser capture. Les tissus ventraux (situés sous l'aorte dorsale) et dorsaux (situés entre le toit de l'aorte dorsale et la notochorde) sont récupérés séparément à partir des mêmes embryons. Pour chaque condition nous récoltons entre 4 et 6 coupes de tissus au niveau de l'AGM, représentant une surface totale d'environ 200 000 µm<sup>2</sup>. L'ARN est extrait à l'aide du Picopure RNA isolation kit (Lifetech), un traitement à la DNase est réalisé puis une reverse transcription utilisant la Superscript III (Invitrogen) permet d'obtenir un ADNc sur lequel les PCR sont réalisées. L'intégrité et la quantité des échantillons d'ARN sont analysées au Bioanalyseur (Agilent). Les PCR quantitatives sont réalisées avec la chimie Taqman® (Lifetech) sur le thermocycleur CFX96 (BioRad), les sondes *Rps18* et *Gapdh* sont utilisées comme contrôle interne et valeurs de référence.

## VI-Hybridation *in situ*

J'ai complété cette analyse par des expériences d'hybridation *in situ*. Les sondes anti-sens provenant d'un plasmide sont synthétisées par transcription *in vitro*, la sonde sens servant de contrôle négatif. Ces sondes gracieusement obtenues du Dr P. Legendre (CNRS UMR8246) sont toutes les deux clonées dans des plasmides *pBluescript*. Les sondes anti-sens sont synthétisées via le promoteur T7. La sonde *Bdnf* mesure 443 pb et la sonde *Ntf3* mesure 729 pb. Les sondes sont couplées à la digoxigénine (Dig) ce qui permet de les détecter par l'intermédiaire d'un anticorps Anti-Dig (Roche, réf : 11093274910) couplé à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline est ensuite révélée par réaction enzymatique ce qui fait apparaître un précipité bleu sur les coupes.

## VII-Cytométrie en flux et qRT-PCR

Afin de préciser l'identité des cellules exprimant les récepteurs TRK et leurs ligands, j'ai isolé par cytométrie en flux, à partir d'AGMs au jour E11,5, des cellules endothéliales CD144<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>, des progéniteurs hématopoïétiques CD144<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> et les cellules doubles négatives CD144<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> non endothéliales et non-hématopoïétiques (incluant la fraction mésenchymateuse), et extrait leurs ARNm.

A partir de deux souris gestantes, j'ai sélectionné 15 embryons (autour de 42 paires de somites). Les AGM des embryons sont disséquées sous loupe binoculaire et récupérées dans une solution de PBS1X/SVF10% (Fang et al. 2016). Les cellules des 15 AGM sont ensuite dissociées dans une solution PBS1X/10%SVF/collagénase (45µg/mL). Après lavages, les cellules sont comptées puis marquées avec l'anti-CD45 APC à 0,04 µg/mL (Biolegend, réf :103115) et l'anti-CD144 PE à 0,04 µg/mL (Biolegend, réf :138009). Après lavage, les cellules sont resuspendues en PBS1X/10%SVF en présence de DAPI au 1/1000<sup>ème</sup> pour exclure les cellules mortes. Le marqueur CD45 est commun aux cellules hématopoïétiques, aussi appelé pan-hématopoïétique. Le marqueur CD144 correspond à la VE-Cadhérine, molécule d'adhésion de surface présente sur les cellules endothéliales vasculaires. Après tri,

le nombre de cellules récoltées est d'environ 10 000 pour les fractions CD144<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> et CD144<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>. Le nombre de cellules dans la fraction double négative est de 90 000. Les cellules sont récoltées directement en tampon de lyse. Le tri est effectué sur un FACSARIA<sup>®</sup> II (Becton Dickinson). L'extraction est faite à l'aide du kit RNAeasy Micro plus (Qiagen), un traitement à la DNase est réalisé puis une reverse transcription utilisant la Superscript III (Invitrogen) permet d'obtenir un ADNc sur lequel les PCR sont réalisées. L'intégrité et la quantité des échantillons d'ARN sont analysées au Bioanalyseur (Agilent). Les PCR quantitatives sont réalisées avec la chimie Taqman<sup>®</sup> (Lifetech) sur le thermocycleur CFX96 (BioRad), les sondes *Rps18* et *Gapdh* sont utilisées comme contrôle interne et valeurs de référence.

De la même manière, le tri de cellules d'AGM TRKB<sup>+</sup> et TRKC<sup>+</sup> s'effectue en suivant le protocole ci-dessus mais en utilisant soit l'anti-TRKB APC soit l'anti-TRKC PE (R&D Systems, AF1494 et AF1404).

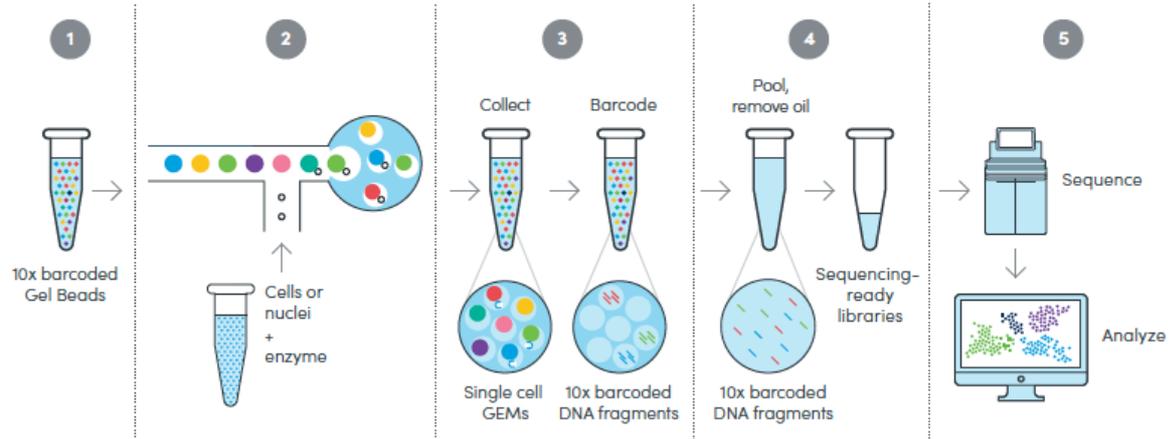
### **VIII-Analyses statistiques des données de qRT-PCR**

Les analyses sont réalisées par la méthode comparative du  $\Delta$ Ct (valeur de Ct gène d'intérêt - valeur de Ct gène de référence) sur tableur Excel. Les valeurs sont ensuite traitées avec le logiciel Prism (GraphPad) et le test non-paramétrique unilatéral de Mann-Whitney a été utilisé pour estimer la significativité statistique des résultats. Les résultats sont considérés significatifs si la valeur de p est inférieure à 0,05.

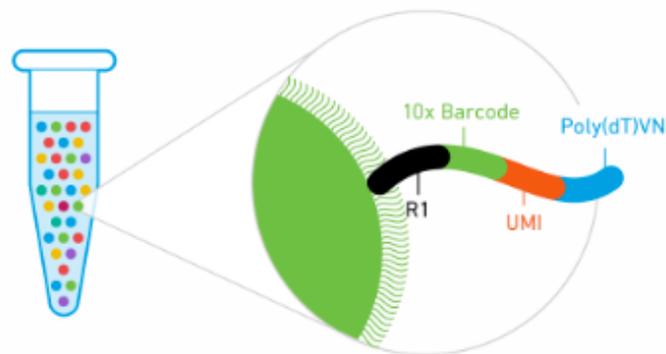
### **IX-Protocole scRNA-Seq**

La technologie scRNA-Seq est une méthode permettant de réaliser le séquençage de l'ARN au niveau d'une seule cellule.

A partir d'embryons au jour E11,5, 7 AGMs disséquées sont reprises dans 1mL d'une solution PBS1X/SVF10%/collagénase (45µg/mL). Les cellules sont dissociées pendant 30 mn à 37°C puis homogénéisées par pipetage. Les cellules sont ensuite filtrées sur une membrane 20 µm puis comptées sur une cellule de Malassez. Le comptage estime les cellules à 700 cellules/µl. 10 µl sont déposés en duplicats dans deux puits d'une puce d'un kit Chromium Single cell 3'Gene expression Version 3.0 de 10x Genomics<sup>®</sup>. Après remplissage approprié, la puce est ensuite insérée dans le Chromium 10X pour générer les gouttelettes contenant les cellules. Donc 7000 cellules sont injectées par puits et chaque cellule est ensuite recueillie dans une gouttelette lipidique (Figure 16). Chaque cellule est alors lysée individuellement et les ARN polyadénylés (polyA) sont capturés puis reverse transcrits en ADN complémentaire. Après purification des ADNc et amplification linéaire, le séquençage est alors effectué et les données sont analysées comme indiquées dans le paragraphe ci-dessous.



**Figure 16 A: Schéma récapitulatif de la technologie Chromium (10x Genomics).** 1-préparation du mix cellules-billes barcodées 2-encapsulation d'une cellule unique et d'une bille dans une gouttelette lipidique 3-lyse de la cellule dans la gouttelette synthèse des ADN complémentaires 4-amplification et lavage 5-alignement des séquences et analyse bioinformatique.



**Figure 16 B : Surface d'une bille 10x Genomics.** Chaque cellule est capturée par une bille unique. Chaque bille est recouverte de séquence 10x barcode spécifique de la bille, d'un UMI (Unique Molecular Identifier) et d'une séquence oligodT qui permet la capture des ARNpolyA.

## **X-Analyse bioinformatique des données NGS**

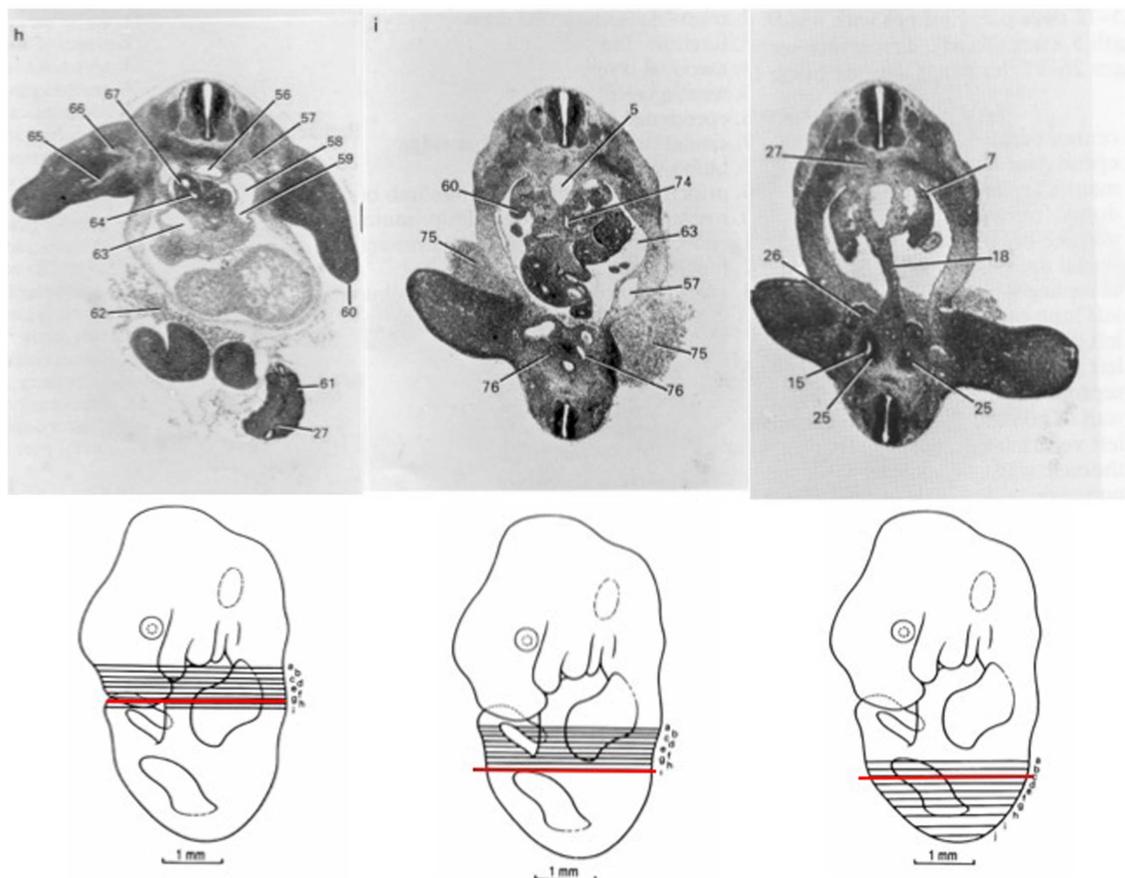
Les données de scRNAseq ont été alignées sur le génome de souris (version MM10) et filtrées à l'aide du logiciel CellRanger 1.4.3. Après inspection des graphes de contrôle qualité (QC), seules les cellules présentant un nombre de gènes exprimés entre 200 et 7000, ainsi qu'un taux d'ARNs mitochondriaux inférieur à 15 % ont été sélectionnées pour la suite de l'analyse (Figure 31).

Les données de scRNAseq ont ensuite été normalisées à l'aide de la fonction SCTransform du package Seurat en corrigeant pour les variations de cycle cellulaire. Les données ont ensuite été projetées sur une UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) basée sur les 42 premières dimensions de la PCA. Les cellules ont ensuite été clusterisées à l'aide de l'algorithme de Louvain avec une résolution de 0.7. Les gènes différentiellement exprimés entre clusters ont ensuite été calculés avec l'algorithme de Wilcoxon (Seurat) et l'algorithme tf-idf (SoupX). L'identité des clusters a été assignée en considérant les gènes différentiellement exprimés par clusters (classés par ordre décroissants d'après leur valeur p), les catégories biologiques (Gene Ontology) et KEGG analysés à l'aide de l'outil DAVID (<http://david.ncifcrf.gov>).

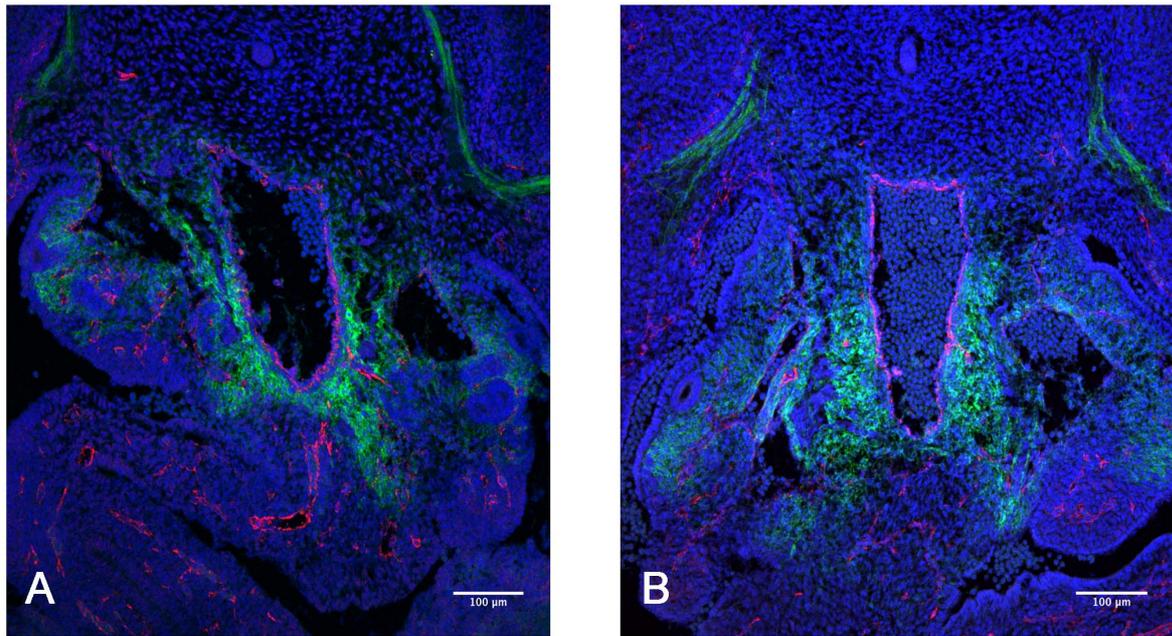
## **D-Résultats**

### **I-Profiles d'expression spatio-temporel des récepteurs TRKB et TRKC sur coupes en immunofluorescence**

J'ai dans un premier temps réalisé des expériences d'immunofluorescence sur coupes à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre TRKB et TRKC à E11,5. Afin d'évaluer le profil d'expression de ces protéines le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, j'ai effectué des coupes transversales à différents niveaux entre les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs (Figure 21). Sachant que le potentiel de reconstitution des CSH est enrichi dans la partie médiane de l'AGM chez l'embryon de souris et humain (Mascarenhas et al. 2009, Easterbrook et al. 2019), j'ai apporté une attention toute particulière à ce niveau de coupes (Figure 17 i).



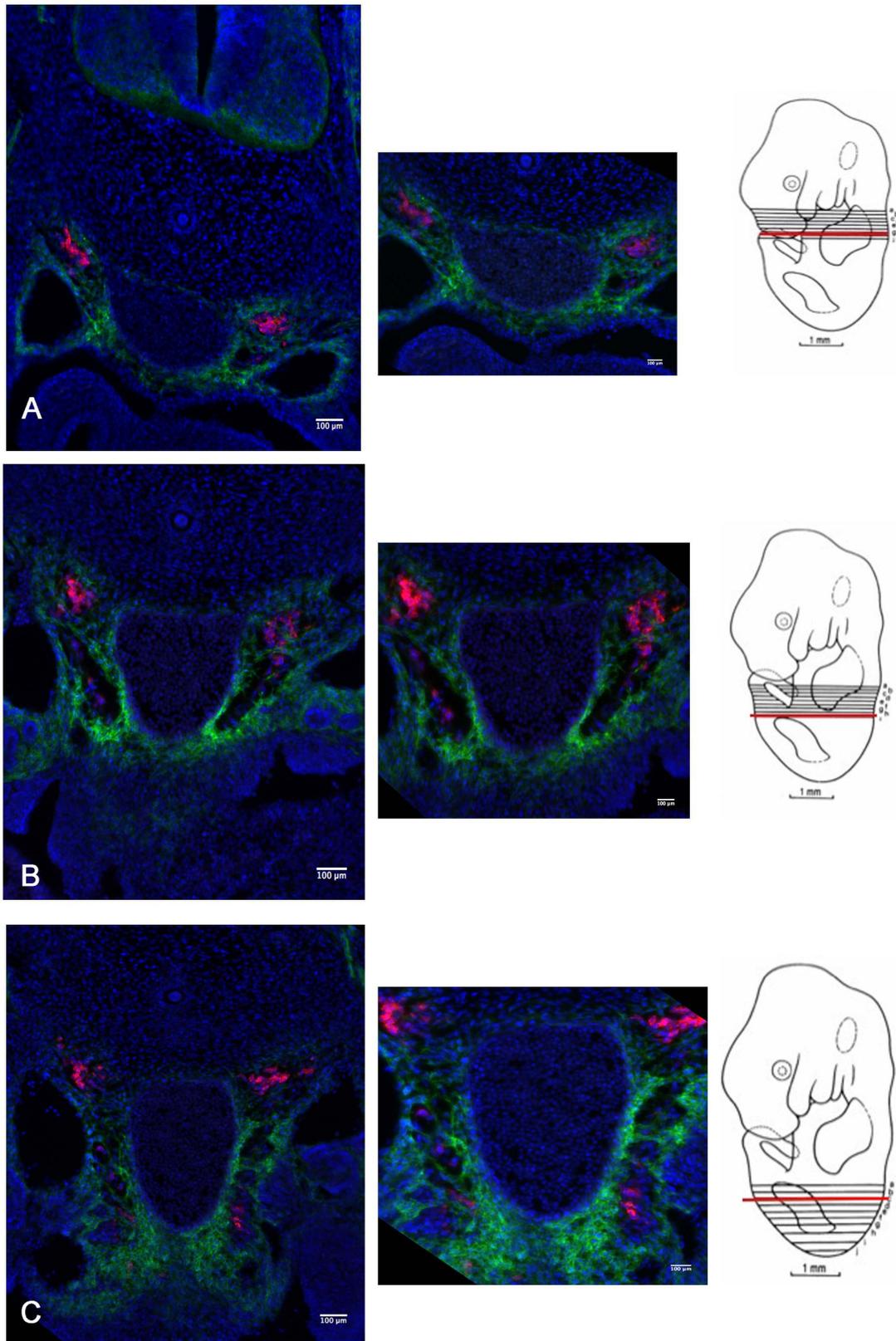
**Figure 17: Coupes transversales d'embryons de souris sur trois niveaux du plus antérieur au plus postérieur de gauche à droite (The atlas of mouse development M.H.Kaufmann).** La ligne rouge transversale représente le niveau de coupe de l'embryon par lequel l'embryon a été sectionné. 5/56=aorte dorsal, 7=canal mésonéphrique, 15/76=canal métanéphrique (bourgeon urétral), 18=mésentère dorsal de l'intestin postérieur, 25=blastème métanéphrique, 26=crêtes urogénitales, 27=portion moins condensée du sclérotome, 27i=notochorde, 74=artère mésentérique, 60=crête gonades, 63=cavité péritonéale, 62/75=sang non vasculaire, 57i=veine ombilicale gauche, 57h=tronc nerveux cervical passant dans le bourgeon du membre antérieur, 58= veine cardinale gauche, 59=corne gauche du sinus veineux, 60= crête ectodermique apicale, 61=somite, 63=corne droite du sinus veineux, 64=bronche principal droite, 65= nerf médian, 66=nerf radial, 67=bourgeon pulmonaire droit.



**Figure 18: Immunofluorescence sur coupes d'embryons de souris à E11,5 révélant TRKB (vert) et CD31 (rouge).** Les deux photos sont au grossissement 20X et la barre d'échelle est de 100 μm. A-Section dans la région médiane ; B-Section dans la région postérieure.

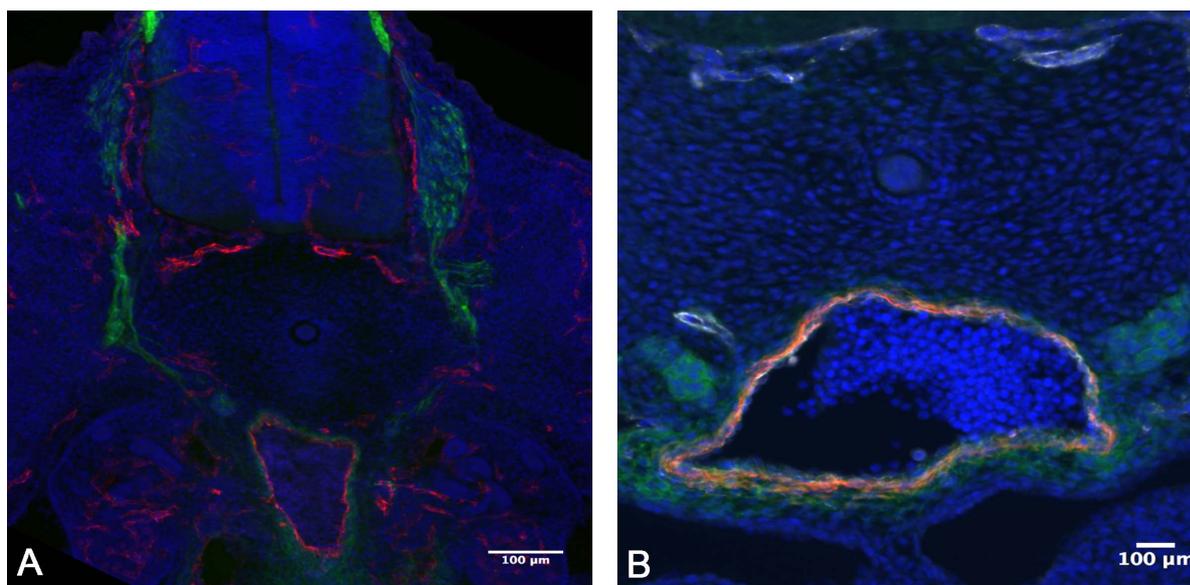
Le marquage TRKB est membranaire et il entoure l'aorte sans que les cellules endothéliales soient également marquées (Figure 18A). Le récepteur TRKB est exprimé vers les pronéphros, les gonades et les régions latérales à l'aorte de l'embryon (Figure 18B). Lorsque l'on observe des coupes plus postérieures le marquage n'est pas aussi profond qu'avec TRKC. Il reste plutôt ventro-latéral. Néanmoins l'intensité de fluorescence est supérieure par rapport à TRKC.

Afin d'examiner l'identité neurale des cellules TRKB positives, j'ai réalisé des co-marquages avec des anticorps anti-Tyrosine hydroxylase (Th, impliquées dans la synthèse des catéchomalines) et récepteur TRKB à E11,5, j'ai pu constater que les cellules Th n'expriment pas TRKB (Figure 19). Les ganglions sympathiques qui sont Th positifs (Figure 19, marquage rouge) ne sont pas marqués par TRKB.



**Figure 19: Immunofluorescence TRKB (vert) et Th (rouge) sur trois niveaux de coupes :**

Sur les dessins à droite de la figure, la ligne rouge transversale représente le niveau par lequel l'embryon a été sectionné. A-Le niveau de la coupe est antérieur, l'embryon a été sectionné au niveau des bourgeons de membres antérieurs; B-Le niveau de la coupe est médian, l'embryon a été sectionné entre les deux bourgeons de membres; C-Le niveau de la coupe est postérieur, l'embryon a été sectionné au niveau des bourgeons de membres postérieurs.

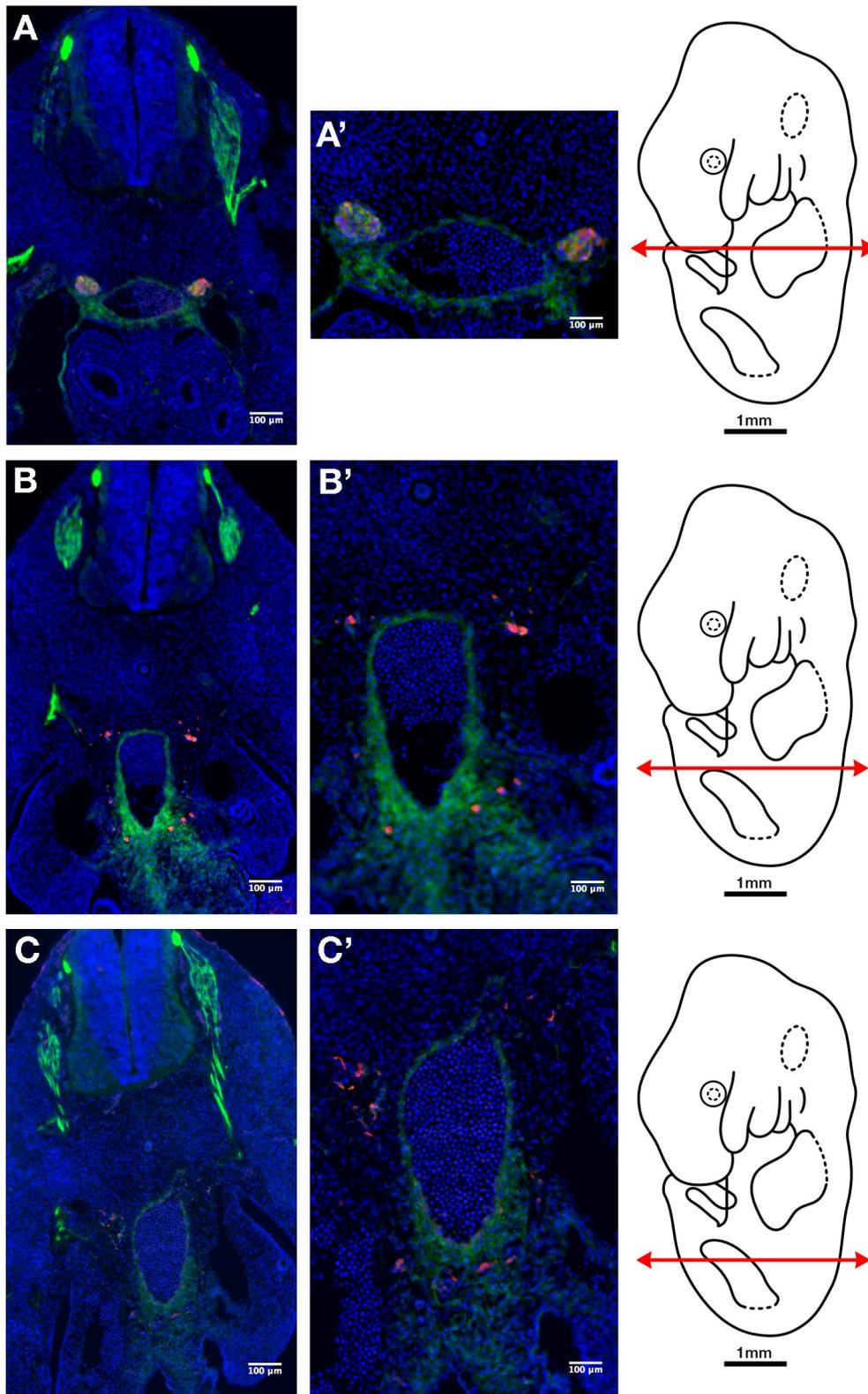


**Figure 20: Immunofluorescence sur coupes d'embryons de souris de E11,5.** A-TRKC (vert) et CD31 (rouge) sur coupe au niveau médian. Grossissement 10X. B-TRKC (vert), SMA (rouge) et CD31 (cyan) sur coupe au niveau des membres antérieurs. Grossissement 20X. Barre d'échelle = 100 µm.

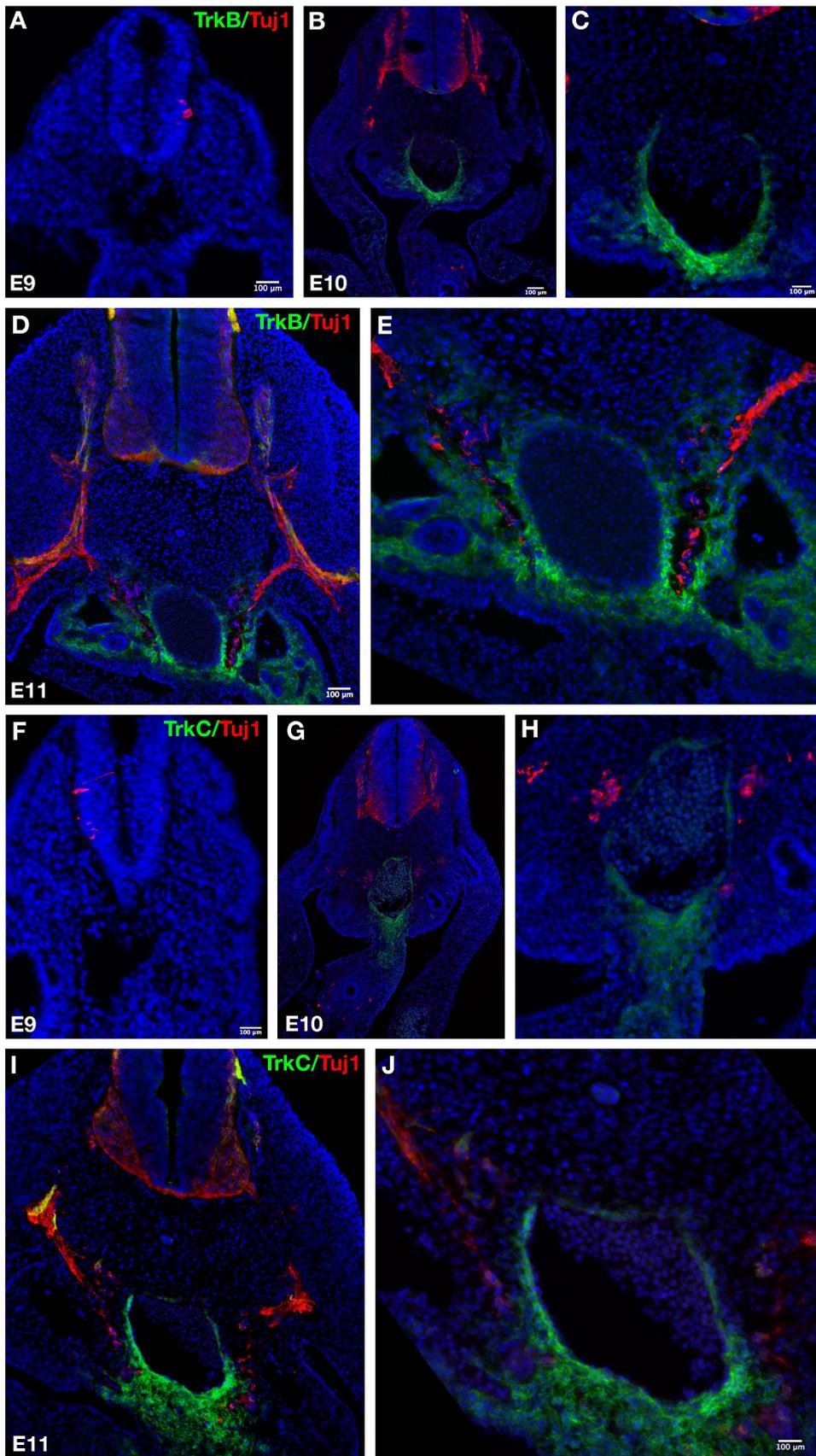
L'IF TRKC sur coupes d'embryons à E11,5 montre que le marquage est membranaire, qu'il ne co-localise pas avec le marquage CD31 (Figure 20A) mais qu'il co-localise avec le marquage Smooth Muscle Actin (SMA) (Figure 20B). TRKC est exprimé dans les cellules des ganglions de la racine dorsale (DRG) et aussi dans les cellules sous-aortiques (Figure 20). Les cellules exprimant le marquage SMA expriment également le récepteur TRKC aux stades E11,5 (Figure 20 B).

L'expression du récepteur est dynamique le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Elle s'élargit dans la région postérieure de l'embryon. Le marquage est plus profond dans la région médiane et postérieure. En effet, le récepteur TRKC est plus exprimé vers le mésenchyme profond lorsque l'on observe des coupes des régions plus postérieures. TRKC s'exprime autour de l'artère mésentérique et de la lumière de l'estomac.

Lors du marquage Tyrosine Hydroxylase (Th) et récepteur TRKC à E11,5, j'ai observé que les cellules Th expriment le TRKC (Figure 21). Les ganglions sympathiques qui sont très visibles en région antérieure sont Th positifs (marquage rouge Figure 21) et sont aussi marqués avec TRKC (Figure 21A).



**Figure 21: Immunofluorescence TRKC (vert) et Th (rouge) sur trois niveaux de coupes.** Sur les dessins à droite de la figure, la ligne rouge transversale représente le niveau par lequel l'embryon a été sectionné. A-Le niveau de la coupe est antérieur, l'embryon a été sectionné au niveau des bourgeons de membres antérieurs (10x); A'-Grossissement de la région aortique présentée en A (20x). B-Le niveau de la coupe est médian, l'embryon a été sectionné entre les deux bourgeons de membres (10x); B'-Grossissement de la région aortique présentée en B (20x). C-Le niveau de la coupe est postérieur, l'embryon a été sectionné au niveau des bourgeons de membres postérieurs (10x) ; C'-Grossissement de la région aortique présentée en C (20x).

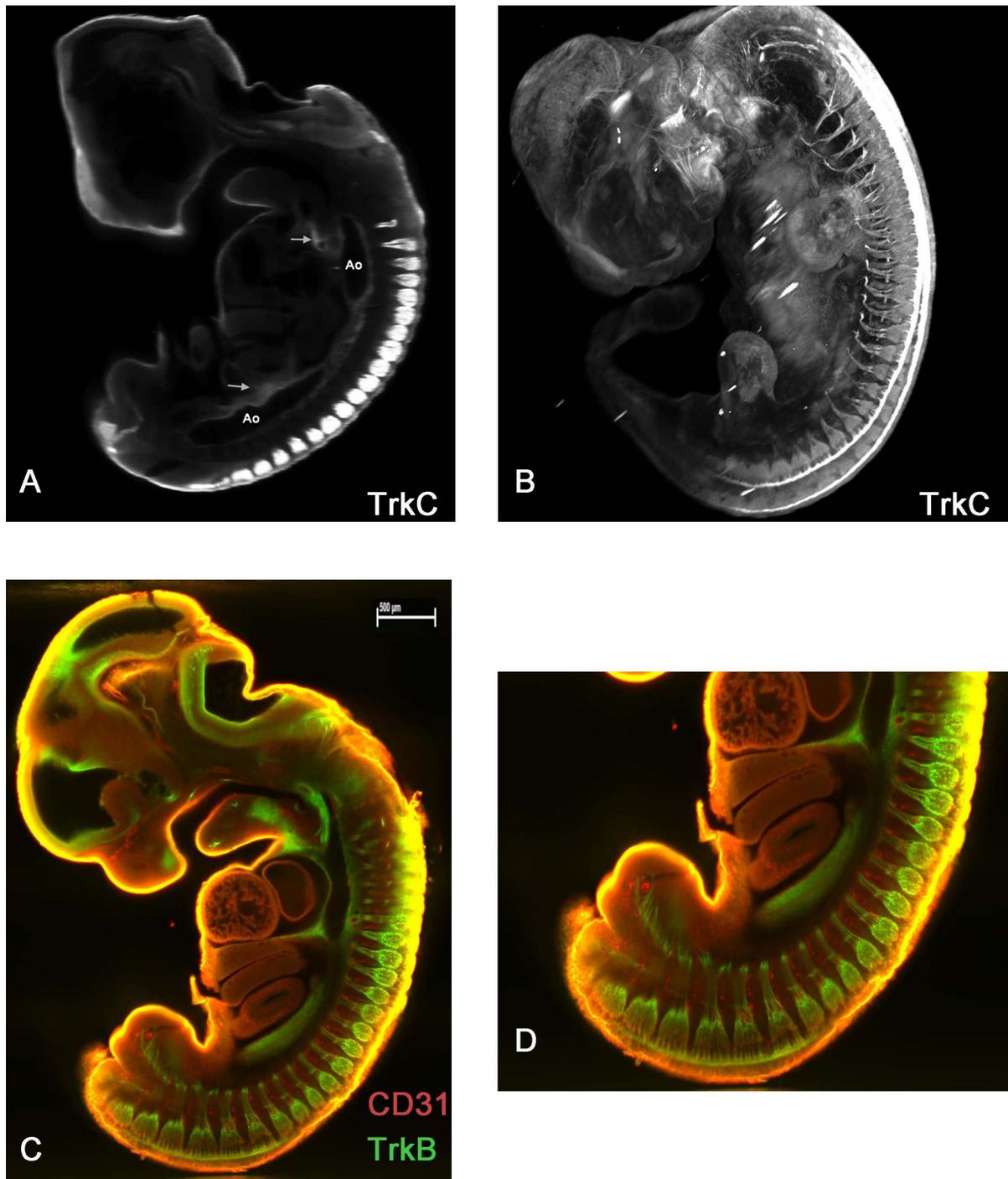


**Figure 22: Immunofluorescence sur coupes d'embryons de souris aux trois stades E9-E10-E11 dans la région médiane. A à E TRKB (vert) et Tuj1 (rouge). De F à J TRKC (vert) Tuj1 (rouge). Grossissement 10X et 20X. Barre d'échelle= 100 μm.**

Au stade E9,5, les coupes d'embryons de souris ne présentent pas de marquage TRKB/TRKC (Figure 22 A et F). L'expression apparaît à E10,5 dans le tube neural et sous l'aorte (Figure 22 B et G). Le marquage Tuj1 est plus précoce (dès E9,5) mais n'apparaît sous l'aorte qu'au stade E11,5 (Figure 22 E et J) c'est à dire après l'installation des récepteurs TRK sous l'aorte.

La reconstruction 3D d'embryons E11,5 montre clairement l'expression des récepteurs TRKB/C dans les ganglions des racines dorsales et les prolongements des fibres nerveuses (Figure 23 B et C). Le marquage sous l'aorte est aussi visible (Figure 23 A).

En conclusion, les observations histologiques montrent que les deux récepteurs sont présents dans la tunique musculaire lisse qui entoure l'aorte. Le marquage TRKB est plus intense et plus latéral que le marquage TRKC qui est plus profond. L'expression est dynamique le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, les récepteurs n'apparaissent qu'au stade E10,5 et ils marquent plus de cellules dans la région postérieure de l'embryon.



**Figure 23: Immunofluorescence *in toto* sur Embryons E11,5. Embryons visualisés sur un ultramicroscope à feuille de lumière. A-Coupe sagittale marquage TRKC Ao=aorte, les flèches représentent les marquages sous l'aorte. B-Photo d'embryon reconstruit en 3D. C et D-Coupe sagittale d'un embryon avec double marquage TRKB CD31.**

## II-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur tissus aortiques micro-disséqués par qRT-PCR

Afin d'obtenir une description complète de l'expression des 4 différents ligands chez l'embryon de souris au stade E11.5, j'ai réalisé des expériences de RT-PCR quantitative sur tissus microdisséqués ainsi que des hybridations *in situ* sur coupes. Deux expériences indépendantes de microdissection suivies de qRT-PCR m'ont permis de confirmer mes premiers résultats sur l'expression préférentielle des ARNm *Ntrk2* et *Ntrk3* dans les cellules situées sous l'aorte dorsale (Figure 24).

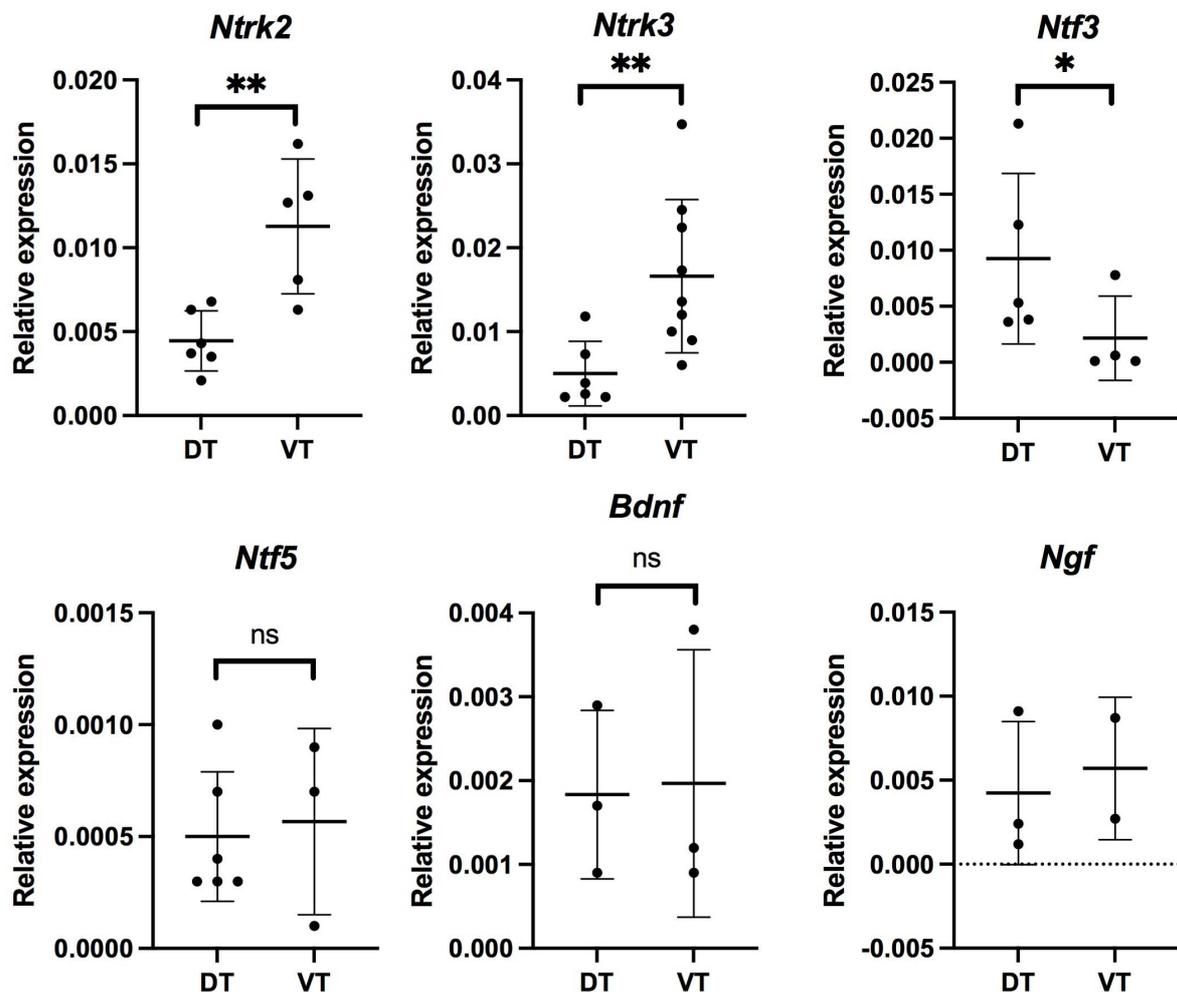
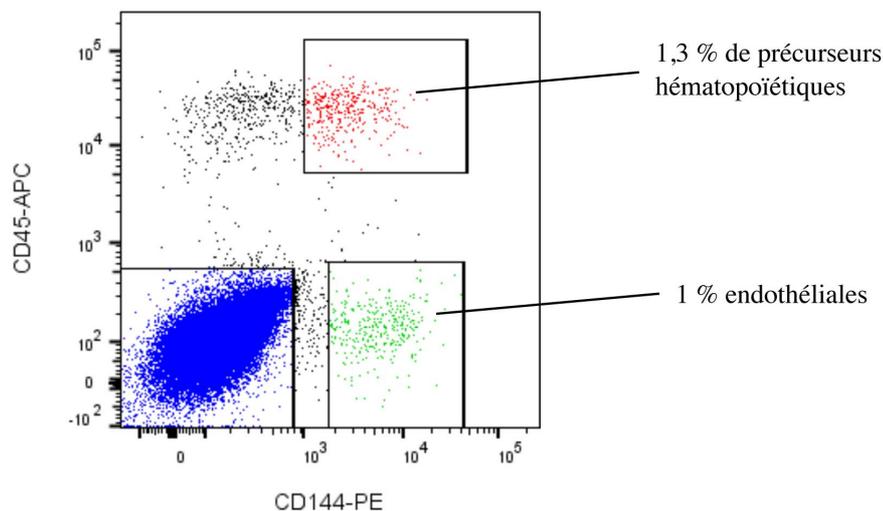


Figure 24: Analyse de l'expression des ARNm *Ntrk2*, *Ntrk3*, *Ntf3*, *Ntf5*, *Bdnf* et *Ngf* dans les tissus ventraux et dorsaux micro-disséqués à E11.5. Les points représentent les valeurs de  $2^{-\Delta Ct}$  des différents réplicats obtenus à partir de deux expériences de microdissection laser. Les moyennes et les écarts-types standards sont indiqués. Les étoiles représentent la significativité statistique du test de Mann-Withney unilatéral: \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , ns=non significatif.

L'expression des ligands est très faible et sans différentiel marqué (Figure 24) hormis *Ntf3* qui semble être plus exprimé dorsalement. Une expérience complémentaire est nécessaire pour affiner ces résultats et leurs significativités statistiques.

### III-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur cellules d'AGM isolées par cytométrie en flux

Pour compléter les résultats obtenus après microdissection, j'ai analysé l'expression des récepteurs TRKs et de leurs ligands dans des populations de cellules endothéliales CD144<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>, des progéniteurs hématopoïétiques CD144<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>, et de cellules double négatives (contenant la fraction mésenchymateuse) obtenues après un tri cellulaire en cytométrie en flux. Le marqueur CD45 est le pan-leucocyte (antigène commun à toutes les cellules leucocytaires) et le CD144 est la VE-Cadhérine qui est une molécule d'adhésion endothéliale (Figure 25). Par cette approche, je confirme que les gènes *Ntrk2* et *Ntrk3* sont majoritairement exprimés par les cellules mésenchymateuses et autres cellules, leurs expressions étant très faible dans les cellules endothéliales et hématopoïétiques. Par ailleurs, à l'exception de *Ntf3* dont l'expression est détectée dans les cellules mésenchymateuses, les gènes *Ntf5*, *Bdnf* et *Ngf* semblent peu ou pas exprimés dans l'AGM (Figure 26). Dans l'environnement aortique, le gène le plus exprimé est *Ntrk2*. *Ntrk3*, *Ntf3*, *Bdnf* et *Ngf* sont aussi présents. Dans les autres fractions triées (endothéliales et hématopoïétiques) les niveaux d'expression des ARNm sont à la limite de la détection.



**Figure 25: Tri cellulaire par cytométrie en flux, trois populations sont extraites.** Les AGM sont disséquées avant marquage et tri. La population cellulaire en bleu contient les cellules qui ne sont ni endothéliales ni hématopoïétiques. La population en rouge correspond à une population enrichie en progéniteurs hématopoïétiques. La population en vert correspond aux cellules endothéliales et la population noire (non-triée) correspond aux monocytes/macrophages.

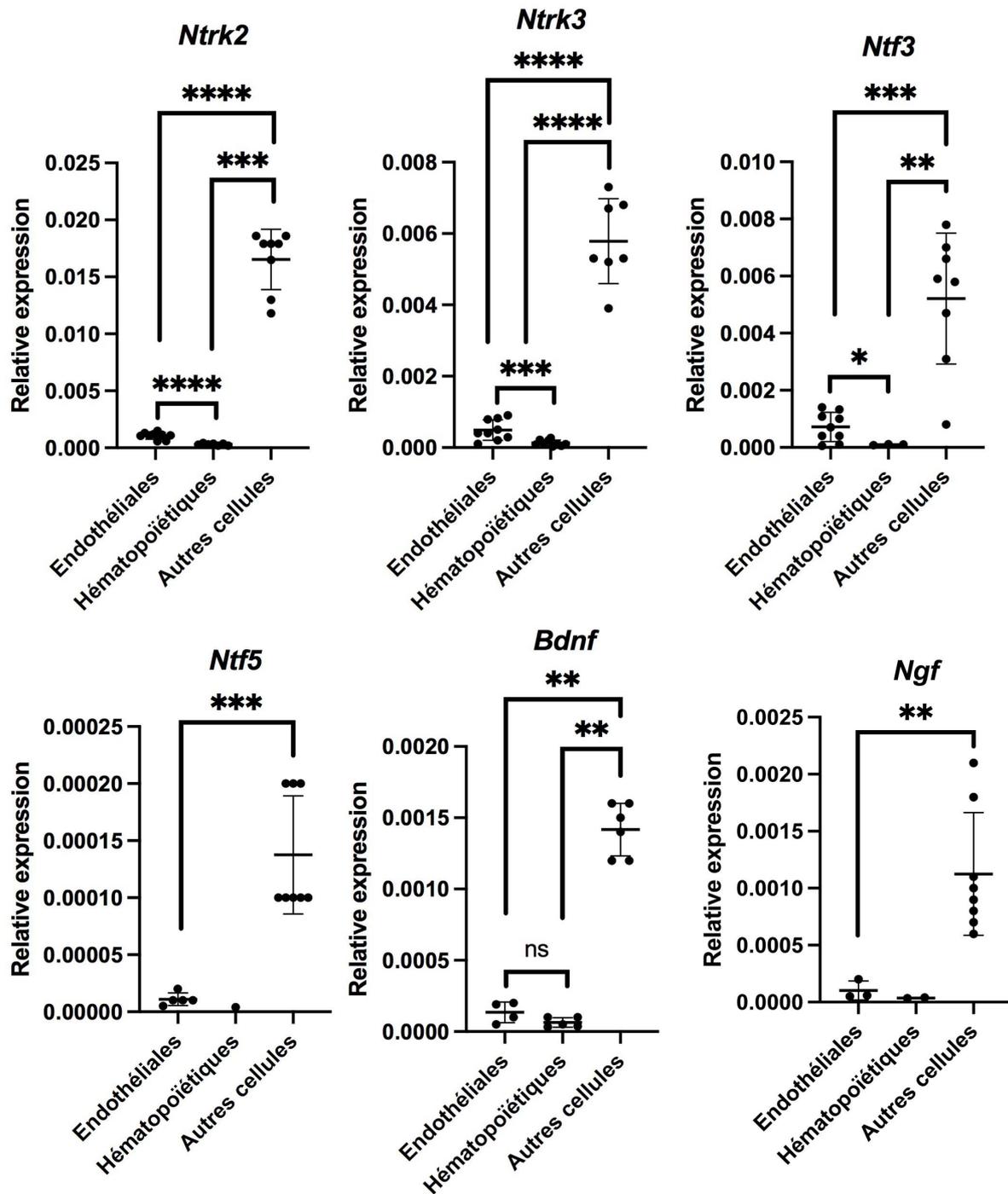
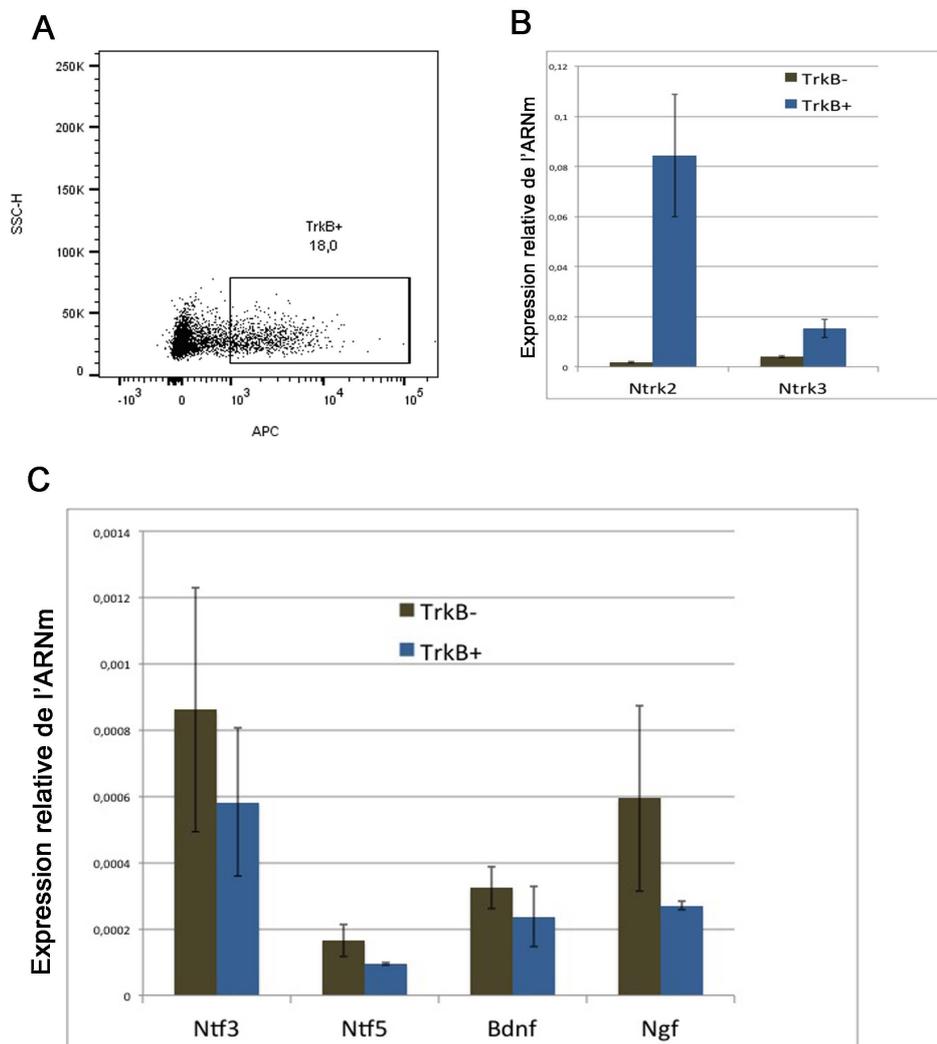


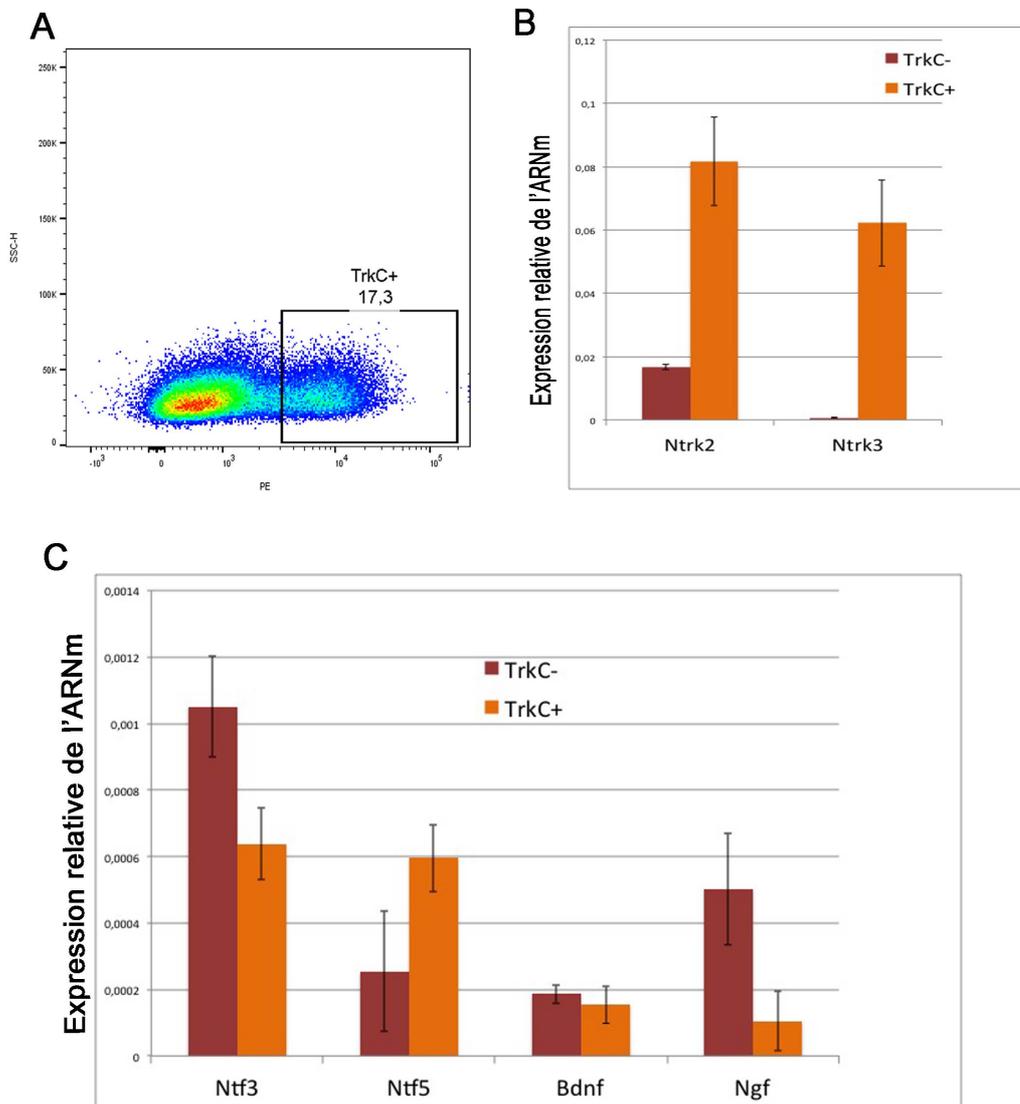
Figure 26: Analyse de l'expression des ARNm dans les populations cellulaires isolées par cytométrie en flux à E11,5. Les points représentent les valeurs de  $2^{-\Delta Ct}$  des différents réplicats obtenus à partir de deux expériences de tri cellulaire. Les moyennes et les écarts-types standards sont indiqués. Les étoiles représentent la significativité statistique du test de Mann-Whitney unilatéral: \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns=non significatif.

#### IV-Expression des récepteurs TRKB/TRKC et de leurs ligands sur cellules d'AGM TRKB<sup>+</sup>/TRKC<sup>+</sup> triées isolées par cytométrie en flux

Pour affiner la caractérisation des cellules TRKB et TRKC positives, j'ai développé un protocole permettant d'isoler ces cellules par cytométrie en flux. En couplant les anticorps anti-TRKB et TRKC à des fluorochromes (TRKB-APC et TRKC-PE), je peux isoler les cellules TRKB et TRKC positives. J'ai donc mis en place un outil qui me permet d'explorer en profondeur l'identité moléculaire des cellules TRKB et TRKC dont le rôle dans l'hématopoïèse aortique est inconnu aujourd'hui. J'ai plus précisément décidé d'isoler les fractions cellulaires TRKB<sup>+</sup> et TRKC<sup>+</sup> par cytométrie en flux et d'analyser leurs transcriptomes par qRT-PCR.



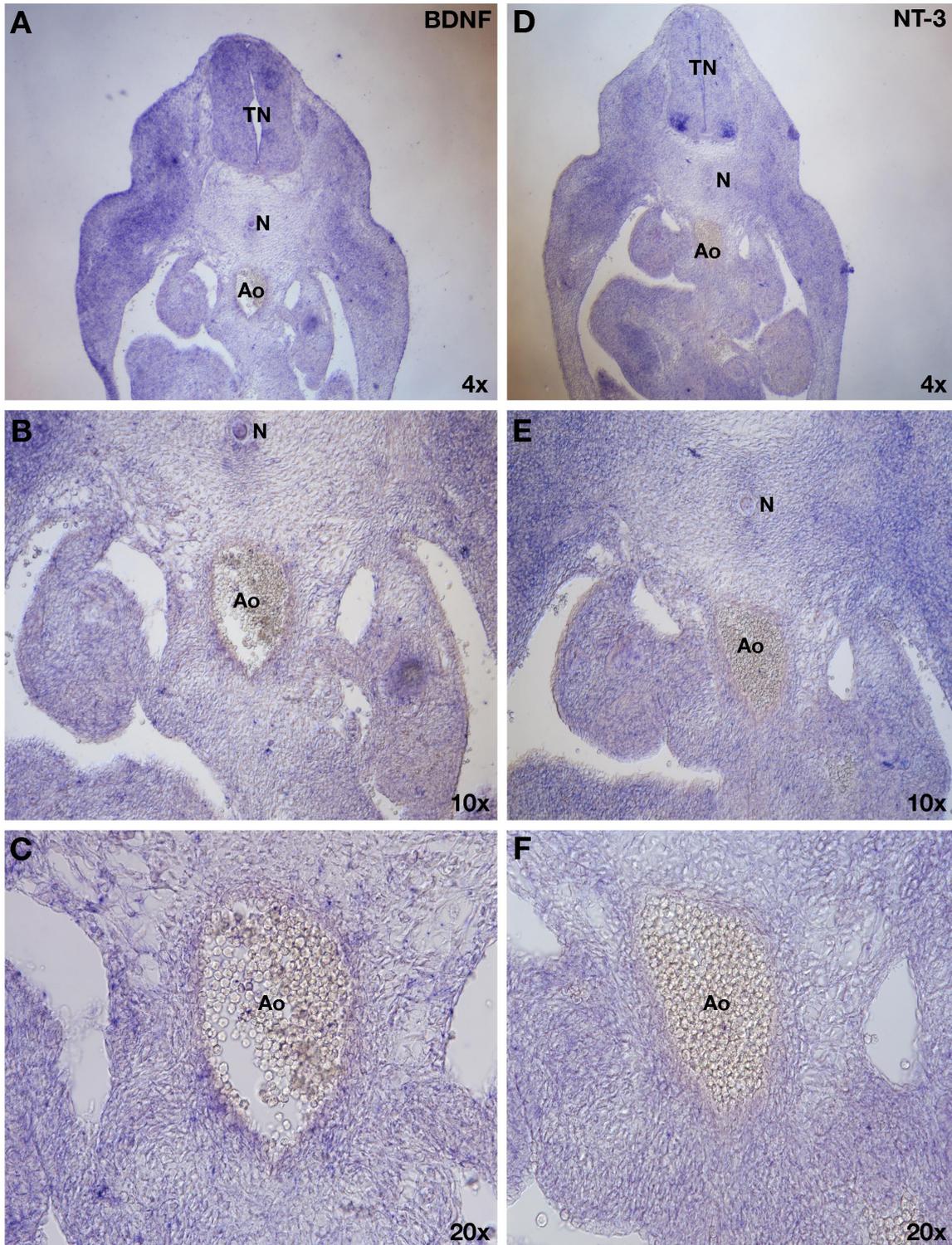
**Figure 27: Analyse de l'expression des ARNm de populations de cellules triées sur le marqueur de surface TRKB.** A-Profil de cytométrie en flux, tri de 18% de cellules TRKB<sup>+</sup> sur une population totale de cellules d'AGM. Le graphe représente l'intensité de fluorescence de chaque cellule (APC) en fonction de sa structure (SSC). B-Expression relative de l'ARNm des deux récepteurs C-Expression relative de l'ARNm des ligands. Expérience réalisée sur un tri, barres d'erreurs : écarts-types standards des réplicats techniques.



**Figure 28: Analyse de l'expression des ARNm de populations de cellules triées sur le marqueur de surface TRKC.** A-Profil de cytométrie en flux, tri de 17% de cellules TRKC<sup>+</sup> sur une population totale de cellules d'AGM. Le graphe représente l'intensité de fluorescence de chaque cellule (PE) en fonction de sa structure (SSC). B-Expression relative de l'ARNm des deux récepteurs. C-Expression relative de l'ARNm des ligands. Expérience réalisée sur un tri, barres d'erreurs : écarts-types standards des réplicats techniques.

Au niveau transcriptomique, le récepteur TRKB est plus exprimé que le TRKC y compris dans les cellules TRKC<sup>+</sup> (Figure 27 et 28). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment en qRT-PCR sur cellules microdisséquées et sur cellules triées. C'est aussi en accord avec les expériences d'immunofluorescence ; l'intensité de fluorescence et la superficie des zones marquées donne une semi quantification protéique. Étonnamment, je ne retrouve aucun ligand dans les fractions TRKB<sup>+</sup> et/ou TRKC<sup>+</sup> triées. Le seul ligand exprimé dans une fraction triée est *Ntf5* et il est plus exprimé dans la fraction TRKC<sup>+</sup> (Figure 28 C). C'est un peu inattendu car c'est le ligand de TRKB, TRKC n'étant lié que par NTF3 dans la voie canonique (Figure 13).

V-Profiles d'expression des ligands *Bdnf* et *Ntf3* (NT-3) par Hybridation *in situ*



**Figure 29: Hybridation *in situ* sur coupes d'embryons de souris à E11,5.** Le signal bleu-violet correspond à une concentration importante des ARNm *Bdnf* et *Ntf3* détecté par la sonde ARN anti-sens correspondante. 3 grossissements (4, 10 et 20x) des coupes à 20  $\mu$ m d'épaisseur. TN= tube neural, N= notochorde, Ao= aorte.

Pour les expériences d'hybridation *in situ*, je dispose des sondes *Ntf3* (NT-3) et *Bdnf* (BDNF). J'observe que *Ntf3* et *Bdnf* sont exprimés dans la région entourant l'épithélium stomacal, dans la partie basse du tube pour *Ntf3* et légèrement autour de la paroi ventrale de l'aorte pour les deux ligands (Figure 29). Plus précisément, *Bdnf* est exprimé dans le tube neural, dans la notochorde, dans le sclérotome, dans l'épithélium stomacal et il y a présence de patch dans la partie ventrale de l'aorte dans la tunique musculaire lisse. *Ntf3* est exprimé dans la partie ventrale du tube neural, dans le sclérotome, dans l'épithélium stomacal (Figure 29bis). L'expression autour de l'aorte est faible. Pour les deux sondes, il y a présence d'un bruit de fond qui monte rapidement lorsque la révélation est poursuivie trop longtemps.



**Figure 29bis: Hybridation *in situ* *Ntf3* sur coupe d'embryon de souris à E11,5.** TN= tube neural, N= notochorde, Ao= aorte, Sc= sclérotome, St= épithélium stomacal.

Gène	<i>Ntrk2</i>	<i>Ntrk3</i>	<i>Ntf3</i>	<i>Ntf5</i>	<i>Bdnf</i>	<i>Ngf</i>
VT	++	++	-	-	+/-	+/-
DT	-	-	++	-	+/-	+/-
End	-	-	-	-	-	-
Hem	-	-	-	-	-	-
Autres	++	++	+	-	+/-	+/-
TRKB+	+++	+	+/-	+/-	+/-	+/-
TRKC+	+++	++	+/-	++	+/-	+/-

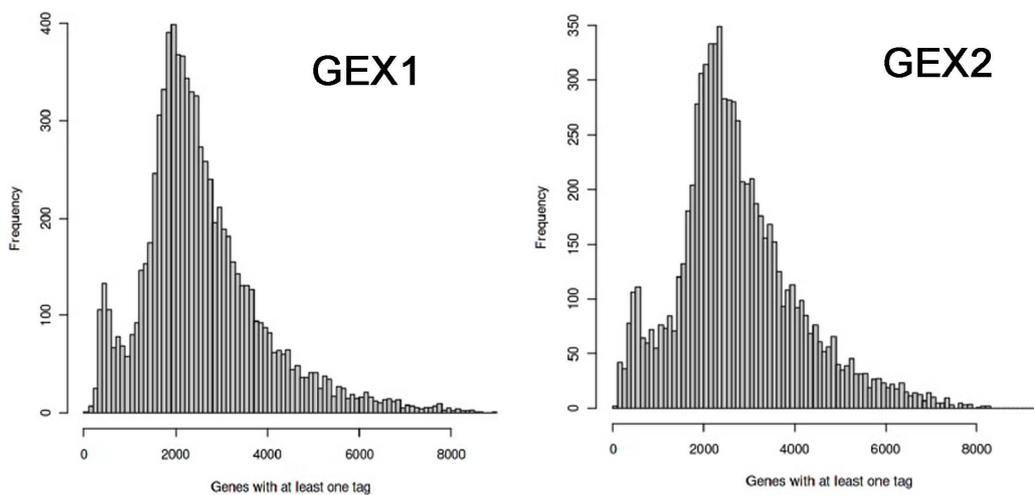
**Table 2 : Tableau récapitulatif de l'expression des récepteurs et des ligands détectés par qPCR dans diverses populations de cellules de l'AGM.** VT=ventral tissu, DT=dorsal tissu, End=cellules endothéliales, Hem=cellules hématopoïétiques, Autres=autres cellules de l'AGM, TRKB+=cellules de l'AGM triées sur TRKB, TRKC+=cellules de l'AGM triées sur TRKC.

## VI-Identité des cellules TRKB et TRKC par analyse ScRNAseq

### VI-1.Contrôle qualité

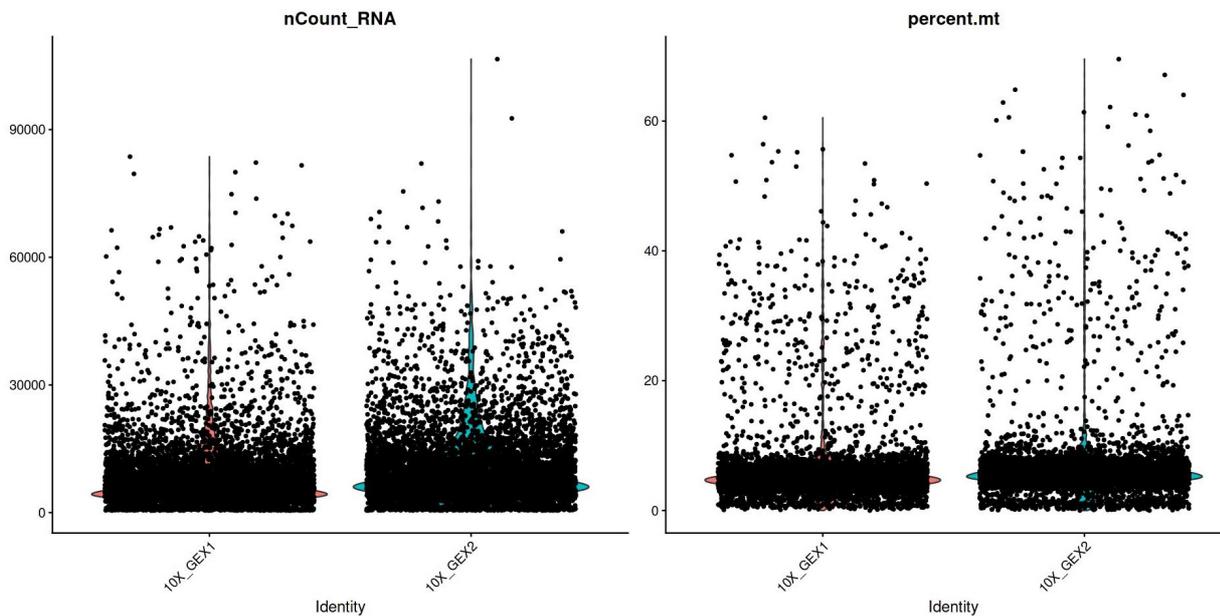
Le comptage sur cellule de Malassez indiquait 7000 cellules injectées pour l'expérience pour l'expérience de séquençage de l'ARN en cellule unique (scRNAseq) effectuée en duplicat respectivement nommé GEX1 et GEX2. Après analyse le nombre de cellules retenues est GEX1 : 8212 et GEX2 : 7650.

Un filtre est appliqué pour retirer les cellules en mauvais état présentant un nombre important d'ARN mitochondriaux. Le nombre de cellules retenues dans GEX1 après filtrage est 7796 et le nombre de cellules retenues dans GEX2 après filtrage est 7358.



**Figure 30 : Graphe contrôle qualité 1 : histogramme du nombre de gènes exprimés par cellules des deux échantillons GEX1 et GEX2.**

Le nombre de gènes par cellules est correct pour une expérience scRNAseq, la présence des deux pics est inhabituelle mais expliquée par le fait que les érythrocytes expriment moins de gènes que les autres types cellulaires et sont donc responsable du petit pic entre 100 et 200 en abscisse (Figure 30).

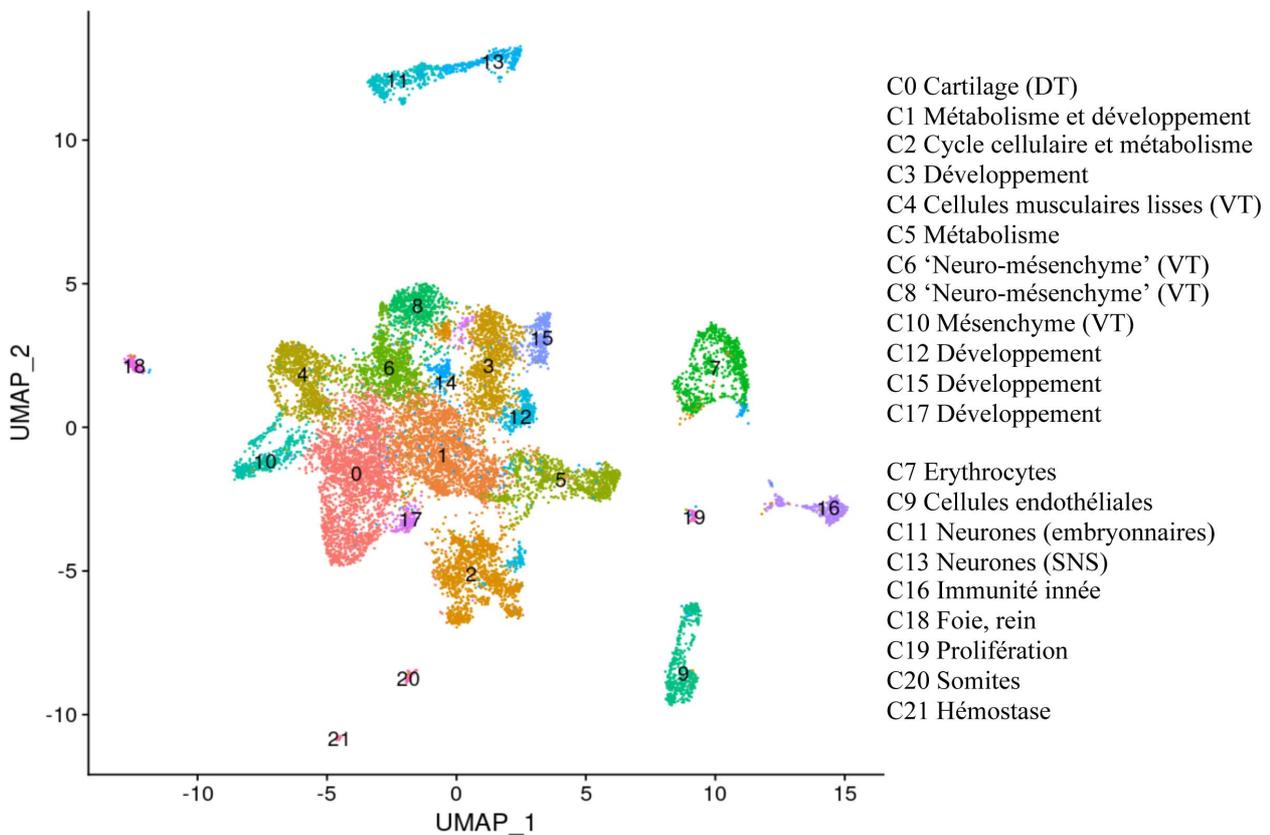


**Figure 31 : Graphe contrôle qualité 2 : Violin plot.** nCount\_RNA=nombre d'ARNs détectés par cellule (figure de gauche), percent\_mt=pourcentage d'ARN mitochondriaux/cellules (figure de droite).

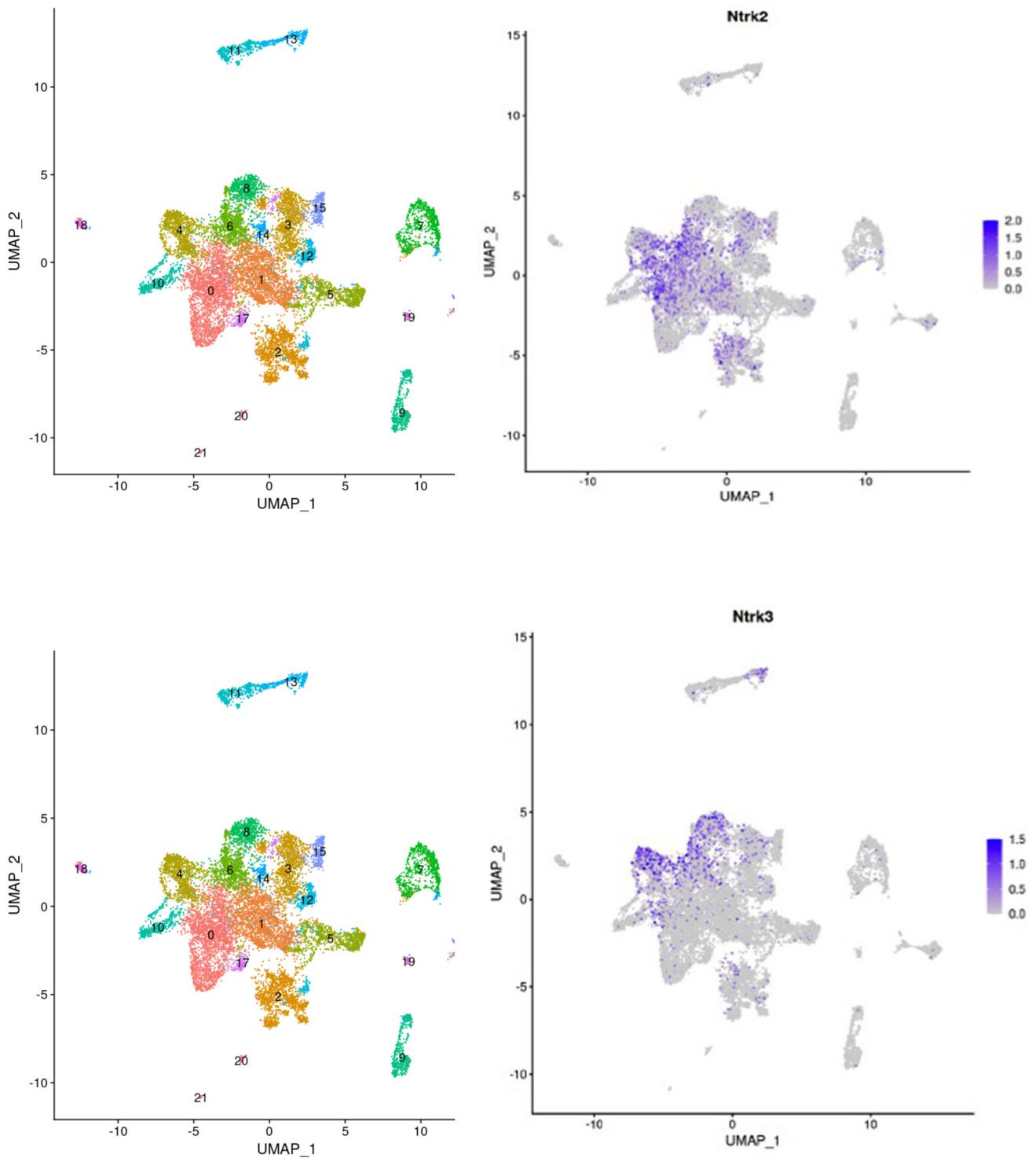
Ncount\_RNA : nombre d'ARNs détectés par cellule, les cellules exprimant plus de 7000 ARNs sont exclues de l'analyse. Le taux d'ARN mitochondriaux est bas pour la plupart des cellules. Pour l'analyse, on retire les cellules avec plus de 15 % d'ARN mitochondriaux car c'est le signe de cellules mortes ou en mauvais état (Figure 31). Seules les cellules présentant un nombre de gènes exprimés entre 200 et 7000, ainsi qu'un taux d'ARNs mitochondriaux inférieur à 15 % ont été sélectionnées pour la suite de l'analyse (nCount\_RNA= nombre d'ARNs détectés par cellule, percent\_mt=pourcentage d'ARN mitochondriaux/cellules).

## VI-2. Carte cellulaire

La carte cellulaire que j'ai obtenue à partir du scRNAseq de 7000 cellules d'AGM de souris, nous donne un paysage moléculaire de l'environnement aortique comprenant 21 clusters différents (Figure 32). On retrouve les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques de l'AGM dans des clusters distincts ainsi que les érythrocytes (C7) et les macrophages (C16 immunité innée). Les différentes populations cellulaires ont été identifiées par leur polarité ventrale versus dorsale (VT vs DT). La carte cellulaire présente 2 clusters dorsaux : Neurones (C13), Cartilage (DT) et 4 clusters ventraux VT : Neuro-mésenchyme (C6 et C8), Cellules musculaires lisses (C4) et Mésenchyme (C10).



**Figure 32 : Carte cellulaire des deux échantillons mélangés.** 21 clusters identifiés par leurs expressions génétiques différentielles, le cluster 14 n'a pas de gènes différentiellement exprimés et donc n'est pas identifié comme spécifique d'une population particulière.



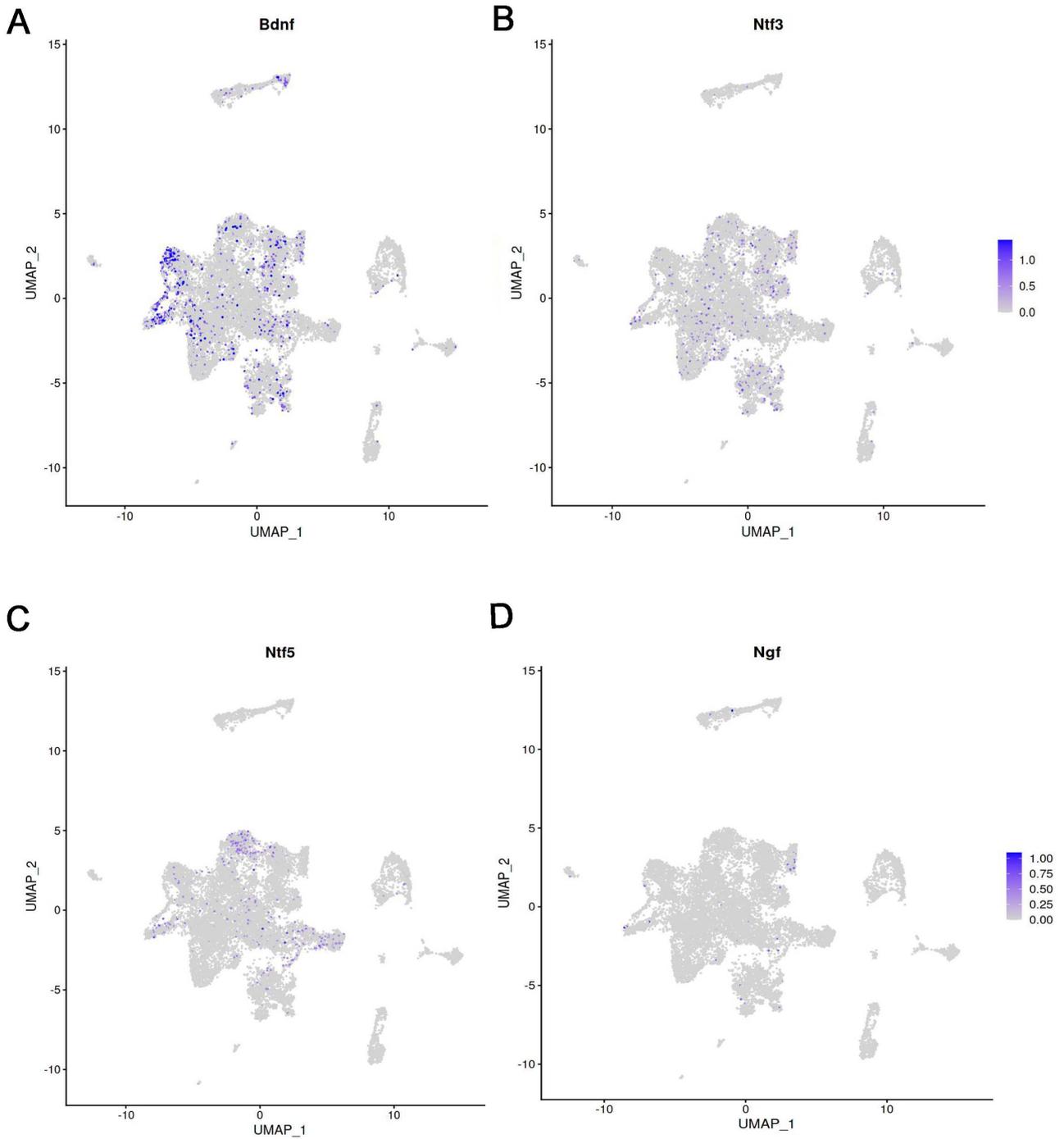
**Figure 33 : Expression du gène *Ntrk2* (en haut) et *Ntrk3* sur la carte cellulaire (en bas). 21 clusters identifiés comme : C0 Cartilage (DT) C1 Métabolisme et développement C2 Cycle cellulaire et métabolisme C3 Développement C4 Cellules musculaires lisses (VT) C5 Métabolisme C6 ‘Neuro-mésenchyme’ (VT) C8 ‘Neuro-mésenchyme’ (VT) C10 Mésenchyme (VT) C12 Développement C15 Développement C17 Développement C7 Erythrocytes C9 Cellules endothéliales C11 Neurones (embryonnaires) C13 Neurones (SNS) C16 Immunité innée C18 Foie, rein C19 Prolifération C20 Somites C21 Hémostasie.**

La projection des gènes *Ntrk2* et *Ntrk3* sur la carte cellulaire identifie les clusters de cellules sur lesquels sont présents ces gènes. La distribution des cellules *Ntrk2*<sup>+</sup> dans la carte cellulaire est assez large. On les retrouve principalement en ventral sur les clusters C6 VT Neuro-mésenchyme, C4 VT Cellules musculaires lisses et en dorsal sur le cluster C0 DT Cartilage (Figure 33). Les cellules *Ntrk3*<sup>+</sup> ont une expression plus restreinte que les cellules *Ntrk2*<sup>+</sup>. Elles sont de polarité ventrale car on les retrouve sur les clusters C6 et C8 VT Neuro-mésenchyme et C4 VT Cellules musculaires lisses. Néanmoins elles sont aussi de polarités dorsales car présentes sur le cluster C13 DT Neurones (Figure 33).

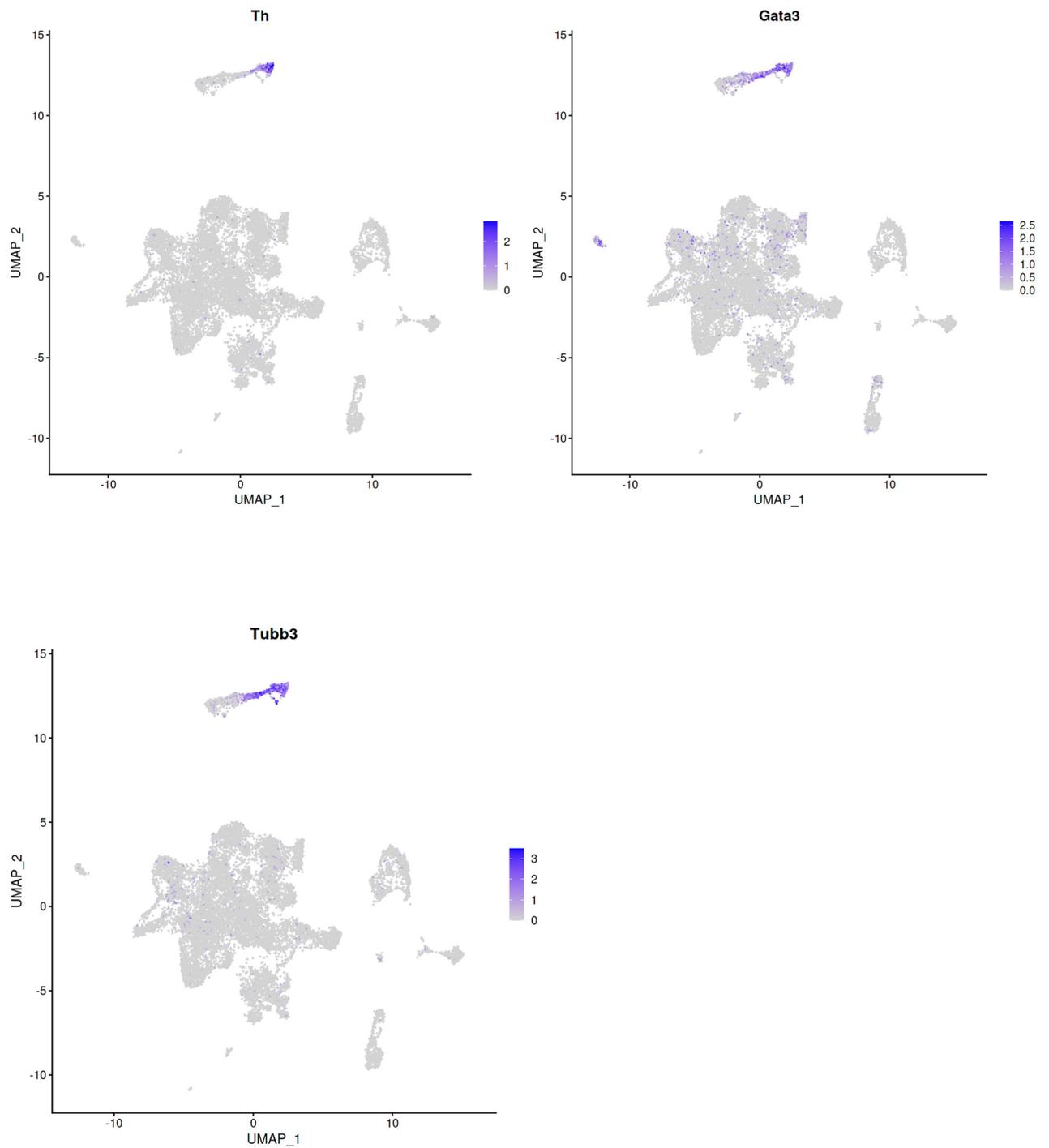
Ces différentes distributions sont cohérentes avec les immunofluorescences (Figure 21) et notamment le fait que *Ntrk3* est exprimé dans le cluster C13 DT Neurones qui correspond au cluster où est aussi exprimée la Tyrosine Hydroxylase (Th) (Figure 35).

Le ligand *Ntf5* est faiblement exprimé mais très localisé dans le cluster C8 VT-Neuro-mésenchyme et donc colocalise avec les cellules TRKC<sup>+</sup>. Ce résultat confirme la PCR quantitative sur cellules TRKC<sup>+</sup> (Figure 28).

Les niveaux d'expression des neurotrophines sont faibles notamment pour *Ngf* et *Ntf5*. *Bdnf* est le plus exprimé (Figure 34) et notablement en ventral et dans les cellules de la tunique musculaire (SMA).



**Figure 34 : Expression des quatre neurotrophines sur la carte cellulaire.** A-Expression du gène *Bdnf*, B-*Ntf3*, C-*Ntf5*, D-*Ngf*.



**Figure 35 : Expression du gène *Th* (en haut à gauche) *Gata3* (en haut à droite) *Tubb3* (en bas à gauche).**

## E-Discussion et perspectives

La caractérisation moléculaire de la niche des CSH fait l'objet actuellement d'intenses investigations tant chez l'adulte que chez l'embryon. Par exemple, une approche de transcriptomique spatiale chez l'embryon humain a été récemment publiée. Elle montre l'importance de l'endotheline dans le processus de formation des CSH dans l'aorte dorsale (Cross et al. 2020). De façon complémentaire une approche par séquençage antéro-postérieur et dorso-ventral de sections d'AGM d'embryons (tomographie séquençage) a été réalisée pour comparer le transcriptome des cellules de la niche aortique dans plusieurs modèles de vertébrés (poisson zèbre, poulet, souris et homme) (Yvernogeu et al. 2020). Cette étude met en évidence le rôle du couple ADM-RAMP2 et de la molécule SEVP1 dans la production des CSH chez l'embryon (Yvernogeu et al. 2020).

Afin d'extraire la signature moléculaire des cellules du microenvironnement hématopoïétique de l'AGM chez l'embryon de souris, nous avons développé une approche combinant des approches de microdissection laser et de transcriptomique. Les cellules sus et sous-jacentes à l'aorte dorsale ont été isolées par microdissection laser chez l'embryon de souris à E10,5, E11,5 et E12,5. En agglomérant des transcriptomes de lignées de cellules stromales (Oostendorp et al. 2002 ; Charbord et al. 2014) et de cellules primaires CD144<sup>pos</sup>CD45<sup>neg</sup> (endothéliales) (Yvernogeu et al. 2019), CD34<sup>low</sup>Kit<sup>low</sup>CD45<sup>pos</sup> (cellules hématopoïétiques différenciées) et CD34<sup>high</sup>Kit<sup>high</sup>CD45<sup>pos</sup> (précurseurs hématopoïétiques enrichis en CSH) (Souyri et al. non publié) issus de l'AGM, nous avons révélé l'existence dans les cellules sous-aortiques d'un réseau de gènes présentant des caractéristiques neurale et mésenchymateuse. En effet, des fonctions biologiques telles que 'Synapse', 'Ion channel', 'GABA receptor activity' et 'Neurotrophin signaling', 'Cell adhesion', 'Extracellular matrix', 'Focal adhesion' et 'Basement membrane' sont étroitement associées à ce module de gènes. Mon travail a consisté à cartographier de façon approfondie la voie de signalisation médiée par les neurotrophines dans l'AGM. En effet, les résultats des puces ADN m'ont permis de révéler que les gènes *Ntrk2* et *Ntrk3* codant respectivement les récepteurs TRKB et TRKC sont préférentiellement exprimés dans la région ventrale de l'AGM. J'ai, dans un premier temps, confirmé ces résultats par qRT-PCR et immunofluorescence. En accord avec des résultats récemment publiés (Angelim et al. 2018), j'ai ainsi montré que deux des trois récepteurs de la famille des TRKs sont exprimés dans la région ventrale de l'aorte dorsale. En revanche, le récepteur TRKA est totalement absent (Figure S1).

Une description fine de l'expression des récepteurs TRKB et TRKC dans l'embryon de souris à différents stades par immunofluorescence m'a ensuite permis de montrer que l'expression de TRKB et TRKC est détectée au niveau du tube neural et dans la région ventrale sous-jacente à l'aorte dorsale à partir de E10,5. De façon intéressante, l'expression des récepteurs aux neurotrophines est dynamique et s'élargit dans la région postérieure de l'embryon. Le marquage est plus profond dans la région médiane et postérieure que dans la région antérieure. Le récepteur TRKC est plus exprimé vers le mésenchyme profond (Figure 20 et 21) alors que le récepteur TRKB est exprimé vers les pronéphros, les gonades et les régions latérales à l'aorte de l'embryon (Figure 18 et 19). En approfondissant les marquages

en immunofluorescence avec TRKB et TRKC, j'ai observé que, si les deux récepteurs sont exprimés dans la région sous-aortique, leur profil d'expression présente néanmoins des différences. En particulier, les cellules TRKB<sup>+</sup> et TRKC<sup>+</sup> ne co-expriment pas les mêmes marqueurs, notamment le marqueur de cellules de crêtes neurales Tyrosine hydroxylase (Th). La Th, enzyme qui catalyse la synthèse des catécholamines, est un marqueur tardif de différenciation des cellules de crêtes neurales (NCCs) en migration. On peut constater que les ganglions sympathiques dans la région antérieure de l'AGM exprimant la Th sont TRKC positifs et TRKB négatifs (Figure 19 et 21). Ces cellules vont être engagées en cellules neuro-adrénergiques. Ensuite, afin d'établir une cartographie complète de la voie des neurotrophines dans l'AGM, j'ai décidé d'étendre l'étude de l'expression des protéines TRKB et TRKC au jour E9,5 de gestation afin de comprendre comment ces cellules se mettent en place au niveau du mésenchyme sous-aortique. J'ai pu démontrer que les cellules TRK positives prennent naissance sous l'aorte à E10 avant que les cellules neurales (Tuj1) ne migrent sous l'aorte (Figure 22). Ces résultats sont soutenus par l'analyse transcriptomique en cellules uniques. J'ai en effet pu constater que l'expression de *Ntrk2* est enrichie dans les clusters C0 'Cartilage', C1 'Metabolism, development', C2 'Cell cycle, metabolism', C3 'Development', C4 'Smooth muscle cell' et C6 'Neuro-mésenchyme', alors que l'expression de *Ntrk3* est fortement associée aux clusters C4, C6, C8 'Neuro-mésenchyme' et C13 'Neurons, Sympathetic nervous system'. Il est important de noter que l'expression des gènes *Th*, *Tubb3* (Tuj1) et *Gata3* est très enrichie dans les clusters neuraux C11 et C13. *Gata3* est aussi détecté de façon plus diffuse dans les clusters C3, C4 et C6 en accord avec les résultats de l'équipe de Katrin Ottersbach montrant que *Gata3* est exprimé dans les cellules du système nerveux périphérique mais aussi dans des cellules endothéliales et celles du mésenchyme sous-aortique (Fitch et al. 2012, Fitch et al. 2019). Ainsi, les données que j'ai pu recueillir plaident en faveur de l'existence d'un neuro-mésenchyme (exprimant notamment *Ntrk2* et *Ntrk3*) dans la région sous-aortique à E11,5.

J'ai ensuite étudié le profil d'expression des neurotrophines pouvant se lier aux récepteurs TRKB et TRKC par hybridation *in situ* et PCR quantitative (qPCR). Les ARNm *Bdnf* et *Ntf3* sont faiblement exprimés. L'expression de *Bdnf* semble plus diffuse même si on peut localiser des « spots » autour de l'aorte dans les cellules du muscle lisse (Figure 29 C). L'expression de *Ntf3* semble plus importante et est localisée dans la région ventrale du tube neural (Figure 29 D) et autour de l'épithélium stomacal (Figure 29 D). En qPCR, les niveaux d'expression sont très faibles pour *Ngf* et *Ntf5* (Figure 24 et 26). Les analyses de qPCR m'ont permis d'observer que les niveaux d'expression des gènes codant les neurotrophines sont différents dans les cellules TRKB<sup>+</sup> et TRKC<sup>+</sup>. En effet, en triant des cellules TRKB positives, je noté une faible expression des gènes codant les 4 neurotrophines. Par contre dans les cellules TRKC positives, j'observe une expression préférentielle du ligand *Ntf5* (Figure 28 C). NTF5 est un ligand de TRKB, TRKC n'étant lié que par NTF3 dans la voie canonique (Figure 13). De tout évidence, ces résultats doivent être confirmés avec une expérience complémentaire afin de vérifier leurs significativités statistiques.

Les analyses transcriptomiques à l'échelon cellules uniques ont apporté des informations complémentaires sur le profil d'expression des gènes codant les neurotrophines. Comme le montre la figure 34, *Ngf* est faiblement exprimé dans l'AGM et *Ntf3* est détecté de façon diffuse dans plusieurs clusters tels que C0, C1, C4, C6, C12 et C15. *Ntf5* est préférentiellement exprimé par les cellules des clusters C5, C8 et C10. *Bdnf* semble être exprimé à un niveau plus élevé, en particulier dans les clusters C4 (Smooth muscle cells VT) et C10 (Mesenchyme VT). Son expression est également détectée dans les clusters C0, C2, C3, C8 et plus faiblement dans les clusters C11 et C1, caractéristiques des cellules neurales. De façon intéressante, des travaux ont montré le rôle de la voie médiée par le récepteur TRKB et le BDNF dans la maturation des lymphocytes T et les interactions entre les cellules de myélomes multiples et les cellules stromales médullaires (Maroder et al. 1996 ; Pierce et al. 2005). TRKB et BDNF sont respectivement exprimés par les thymocytes immatures CD4-CD8- et les cellules stromales thymiques. L'interaction entre BDNF et TRKB renforce la survie des thymocytes en cours de maturation (Maroder et al. 1996). L'axe BDNF/TRKB est aussi actif dans le dialogue entre les cellules de myélomes multiples et les cellules stromales. Ainsi l'exposition des cellules cancéreuses au BDNF les protègent de l'apoptose et en favorisent leur survie (Pierce et al. 2005).

Un rôle de la voie médiée par les neurotrophines dans le contrôle de l'hématopoïèse aortique n'a, à notre connaissance, pas encore été exploré. Je souhaiterais aborder cette question par des expériences fonctionnelles. Je prévois de disséquer l'AGM à E11.5 et de réaliser des cultures d'explants en présence soit de molécules BDNF recombinantes soit d'anticorps bloquant. A l'issue de 3 jours de culture, des suspensions cellulaires d'AGM seront préparées et ensemencées en milieu semi-solide pour évaluer le nombre et la nature des progéniteurs hématopoïétiques. Parallèlement, des expériences *in vivo* de transplantation dans des souris adultes létalement irradiées pourront être envisagées afin de déterminer si la voie médiée par le BDNF influence le potentiel de reconstitution des CSH.

Je souhaite également tirer avantage du modèle poisson-zèbre, récemment mis en place dans mon équipe, pour tester *in vivo* de façon robuste et efficace le rôle de BDNF et/ou TRKB dans la formation des premières CSH. Des expériences de perte de fonction par injection de morpholinos au stade « 1 cellule » couplées à des expériences d'hybridation *in situ in toto* pour l'expression des gènes *runx1* et *cmyb* (rapportant l'émergence des CSH dans l'aorte dorsale) me permettront d'analyser le phénotype hématopoïétique des embryons contrôles et des morphants pour les gènes testés. Des expériences de preuve de concept sont actuellement réalisées par une étudiante en thèse pour localiser l'expression de *ntrk2* au cours du développement du poisson-zèbre. Plusieurs lignées de poisson-zèbre mutants sont décrites et disponibles dans la base de données zfin (Université de l'Oregon) (notamment des mutations ponctuelles introduisant des codons stop dans la séquence des ARNm *Ntrk2*) et pourraient être utilisées pour comparer le phénotype des embryons morphants et mutants.

J'ai également récemment mis en oeuvre la technologie CITE-seq au laboratoire pour affiner l'analyse moléculaire des cellules TRKB et TRKC dans l'AGM. Cette approche est basée sur l'utilisation d'anticorps barcodés anti-PE (TotalSeq™-A0911 Biolegend) dirigé contre l'anti-TRKB-PE et d'anticorps anti-Biotin (TotalSeq™-A0436 Biolegend) dirigé contre

l'anti-TRKB-Biotinylé. Mon objectif est de corréler le transcriptome des cellules de l'AGM avec les populations cellulaires reconnues par les anticorps, afin d'obtenir des informations très fines sur l'identité moléculaire des cellules TRKB et TRKC positives. Par exemple, j'envisage de corréler le nombre d'anticorps par cellules (nombre de récepteurs présents à la surface des cellules) à l'expression différentielle de certains gènes.

L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier l'expression de facteurs neurotrophiques dans un contexte d'hématopoïèse aortique ce qui n'était pas connu jusqu'à présent. Ces populations de cellules exprimant les récepteurs TRK s'installent sous l'aorte embryonnaire au stade E9,5. Ces résultats montrent que ces populations TRKB+ et TRKC+ présentent des différences phénotypiques et moléculaires. L'analyse cellules uniques montre que BDNF est la neurotrophine qui est la plus présente dans le mésenchyme ventral et c'est pourquoi des approches fonctionnelles ciblant ce ligand sont maintenant envisagées pour étudier son rôle fonctionnel dans l'hématopoïèse aortique.

## F-Références bibliographiques

- Abkowitz, J. L., Catlin, S. N., McCallie, M. T. & Gutterop, P. (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*. 100, 2665–2667.
- Angelim et al. (2018). Embryonic macrophages and microglia ablation alter the development of dorsal root ganglion sensory neurons in mouse embryos. *Glia*. 1-17.
- Belle et al. (2014). A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. *Cell Reports*. 9,1191-1201
- Bibel et Barde. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Gene et development*. 14:2919–2937.
- Brodeur et al. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 15 (10) pp. 3244-50.
- Charbord et al. (2014). A systems biology approach for defining the molecular framework of the hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 15(3), 376-391.
- Choi et al. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125, 725-732.
- Crosse et al. (2020). Multi-layered Spatial Transcriptomics Identify Secretory Factors Promoting Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell stem cell*. 27, 822–839.
- Cumano et Godin (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual Review of immunology*. 25 :745-785.
- De Bruijn et al. (2002). Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity*. 16, 673-683.
- Desterke et al. (2020). Inferring gene networks in bone marrow hematopoietic stem cell-supporting stromal niche populations. *iScience*. 23, 101222
- Durand C. et al. (2007). Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(52), 20838–20843.
- Dzierzak E. et Bigas, (2018). Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell Stem Cell*. 15, 1-16.
- Dzierzak E. et Speck N. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature immunology review*. 9 (2), 129-136.

- Easterbrook et al. (2019). Analysis of the Spatiotemporal Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Early Human Embryo. *Stem Cell Reports*. 12 (5) 1056-1068.
- Ernfors et al. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*. 77 (4) pp. 503-12.
- Fang et al. (2016). Isolement des cellules embryonnaires murines Hémogénic endothéliales. *Developmental Biology. Journal of Visualized Experiments (JoVE Journal)*. 112 e54150, 1-10.
- Fitch, S.R. et al. (2012). Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell*. 11(4), pp.554–566.
- Fitch et al. (2019). Gata3 targets Runx1 in the embryonic hématopoïétic stem cell niche. *IUBMB Life*. 72, 45-52.
- Huang et Reichardt (2003). TrK receptors: roles in neural signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72:609–642
- Jaffredo, T. et al. (2005). Tracing the hemangioblast during embryogenesis: Developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *International Journal of Developmental Biology*. 49(2-3 SPEC. ISS.), 269–277.
- Jaffredo T. et al. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*. 125, 4575-4583.
- Keller G. et al. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*. 13, 473-486.
- Kennedy et al. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*. 386 (6624) pp. 488-93.
- Khotskaya et al. (2017). Targeting TRK proteins family proteins in cancer. *Pharmacolo Ther*. 173, 58-66.
- Kierdorf et al. (2015). Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Seminars in immunology*. 27, 369-378.
- Kumaravelu et al. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*. 129 (21) 4891-4899.

- Lamballe F et al. (1994). Developmental expression of *trkC*, the Neurotrophin-3 Receptor, in the Mammalian Nervous System. *The Journal of Neuroscience*. 14 (1) 14-29.
- Lancrin et al. (2009). The hemangioblast generates hematopoietic cells through a hemogenic endothelium stage. *Nature*. 457, 892-896.
- Ling et al. (2004). GATA-2 Plays Two Functionally Distinct Roles during the Ontogeny of Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med*. 200 (7) 871–882.
- Lorenz, E., Congdon, C. & Uphoff, D. (1952). Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology*. 58, 863–877.
- Marmigere et al. (2006). The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nat. Neurosci.* (2) pp.180-7.
- Maroder et al. (1996). Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *Journal of Immunology*. 157 (7) pp. 2864-72.
- Mascarenhas et al. (2009). Identification of novel regulators of hematopoietic stem cell development through refinement of stem cell localization and expression profiling. *Blood*. 114 (21) 4645-53.
- Medvinsky et al. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 86 (6) 897-906.
- Ménard et al. (2018). The dependence receptor TrkC regulates the number of sensory neurons during DRG development. *Developmental Biology*. 442, 249–261.
- Moqrich et al. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nat Neurosci*. 7 (8) pp. 812-8.
- North et al. (1999). Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development*. 126 (11), 2563-75.
- Oberlin et al. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*. 129, 4147-4457.
- Oostendorp et al. (2002). Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*. 99 (4),1183-9.
- Ottersbach et al. (2019). Endothelial-to-haematopoietic transition: an update on the process of making blood. *Biochemical Society Transactions*. Review.
- Pierse et al. (2005). A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood*. 105 (11), 4429-36.

Porcher et al. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*. 86 (1) pp. 47-57.

Psaltis et al. (2015). Vascular Wall Progenitor Cells in Health and Disease. *Circulation research*. 116 (8) 1392-1412.

Richard C. et al. (2013). Endothelio-Mesenchymal Interaction Controls runx1 Expression and Modulates the notch Pathway to Initiate Aortic Hematopoiesis. *Developmental Cell*. 24(6), 600–611.

Robb et al. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO journal*. 15 (16) pp. 4123-9

Sabin F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm in the chick during the second day of incubation. *Contrib. Embryol.* 9, 213-262.

Saito et al. (2015). Sympatho-adrenal morphogenesis regulated by the dorsal aorta. *Mechanisms of development*. 138, 2-7.

Shepherd, B. E., Gutterop, P., Lansdorp, P. M. & Abkowitz, J. L. (2004). Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp. Hematol.* 32, 1040–1050.

Shivdasani et al. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*. 373 (6513) pp. 432-4.

Stik et al. (2017). Stromal Cell Niche Regulation During HSC Development. *Hematopoietic Stem Cell Niche*. 1, 1-16.

Tsai et al. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 371 (6494) pp. 221-6.

Van Handel et al. (2012). Scl Represses Cardiomyogenesis in Prospective Hemogenic Endothelium and Endocardium. *Cell*. 150. 590-605.

Yvernogeu et al. (2019). In vivo generation of haematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow-derived haemogenic endothelium. *Nature Cell Biology*. 21 (11), pp. 1334-1345.

Yvernogeu et al. (2020). Multispecies RNA tomography reveals regulators of hematopoietic stem cell birth in the embryonic aorta. *Blood*. 136 (7) pp. 831-844.

## G-Annexes

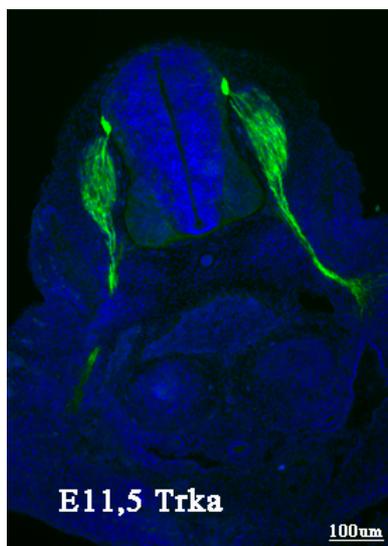


Figure S1 : IF sur coupe d'embryon de souris au stade E11,5 marquage TRKA (vert).

<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Rps18</i>	Mm02601777_g1
<i>Ntrk2</i>	Mm00435422_m1
<i>Ntrk3</i>	Mm00456222_m1
<i>Ntf3</i>	Mm01182924_m1
<i>Ntf5</i>	Mm01701591_m1
<i>Bdnf</i>	Mm04230575_m1
<i>Ngf</i>	Mm00443039_m1

Table S1 : Référence des sondes Taqman<sup>®</sup> utilisées en qPCR.

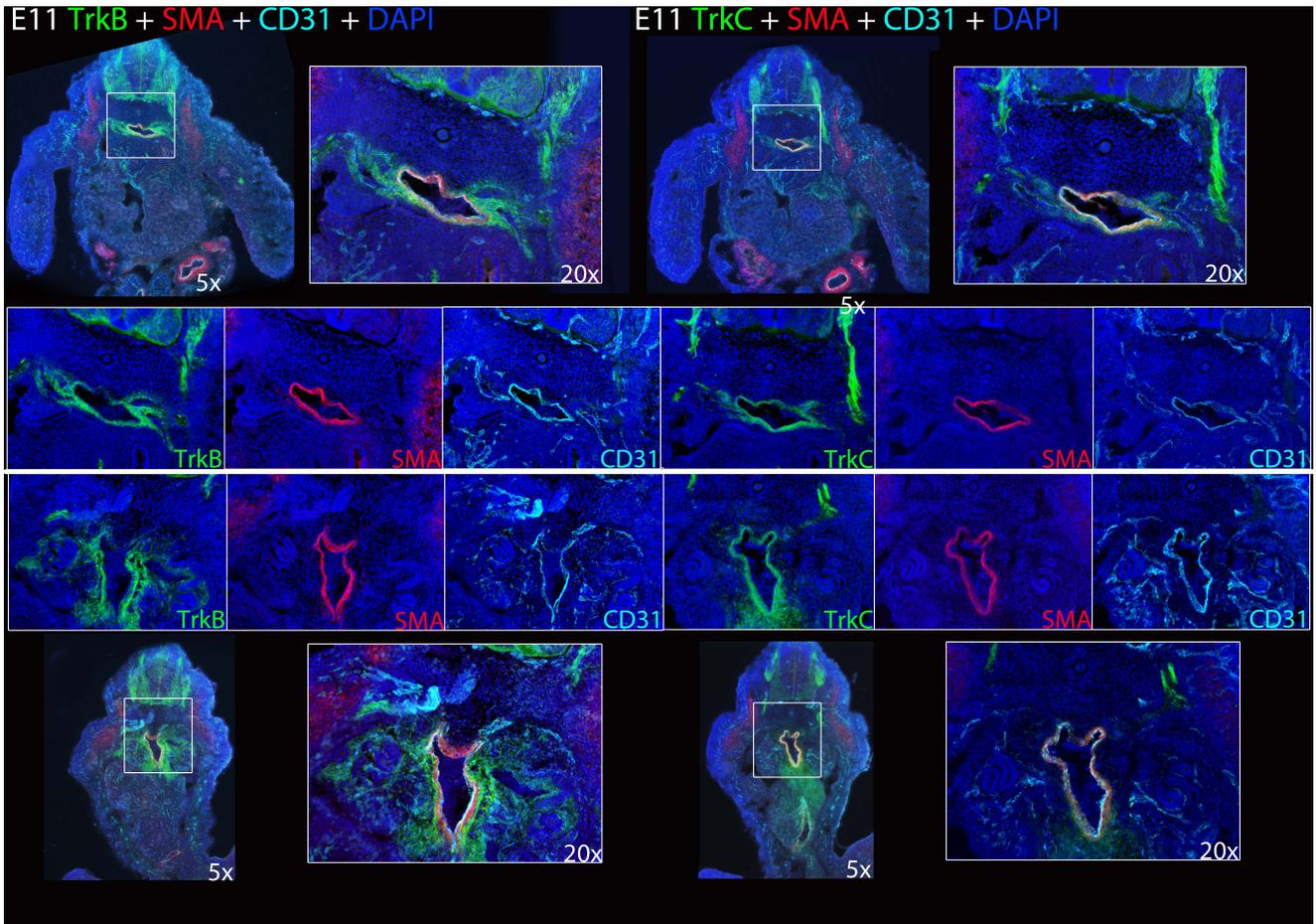


Figure S2 : Immunofluorescence TRKB versus TRKC en triple marquage avec SMA et CD31.

E11 TrkC + CD31 + SMA

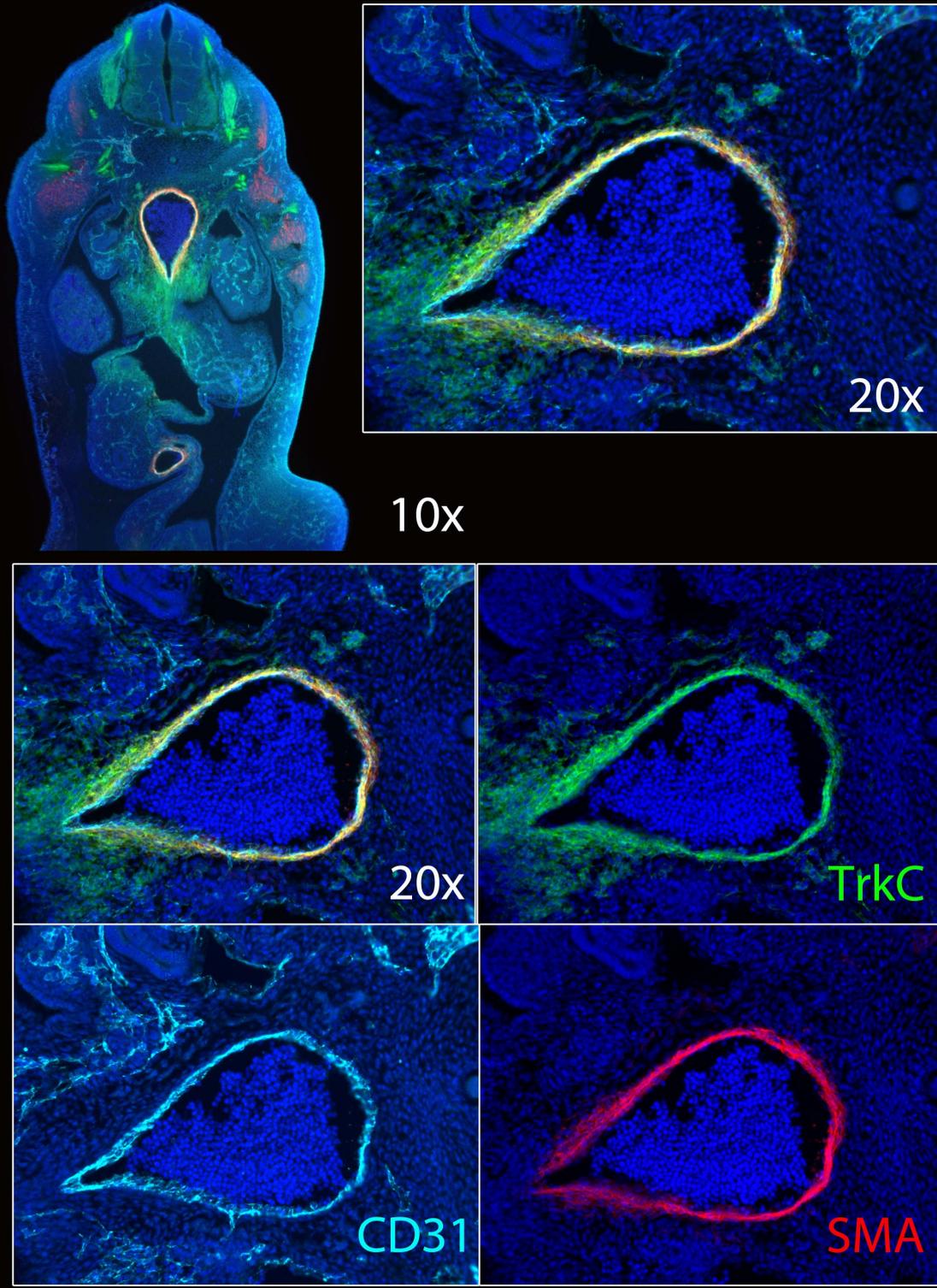


Figure S3 : Immunofluorescence TRKC en triple marquage avec SMA et CD31.

## **A neuro-mesenchymal cell population characterizes the subaortic hematopoietic stem cell niche**

Pierre Charbord<sup>1\*</sup>, Pierre-Yves Canto<sup>1</sup>, Olivera Miladinovic<sup>1\*\*</sup>, Claire Pouget<sup>2\*\*</sup>, Olivier Piau<sup>1,6</sup>, Nevenka Radic<sup>1</sup>, Priscilla Freschu<sup>1</sup>, Alexandre Megherbi<sup>1</sup>, Sebastien Jacques<sup>3</sup>, Estelle Hirsinger<sup>1</sup>, Michele Souyri<sup>4</sup>, Hervé Isambert<sup>5</sup>, David Traver<sup>2</sup>, Thierry Jaffredo<sup>1\*</sup> and Charles Durand<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, CNRS, Inserm U1156, Institut de Biologie Paris Seine, Laboratoire de Biologie du Développement/UMR7622, 9 Quai St-Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup> Department of Cell and Developmental Biology, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0380, USA.

<sup>3</sup> Plateforme de génomique, Université de Paris, Institut Cochin, Inserm, CNRS, F-75014 Paris, France.

<sup>4</sup> Université de Paris, Inserm UMR 1131, Institut de Recherche Saint Louis, Hôpital Saint Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France.

<sup>5</sup> Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR168, Paris, France.

<sup>6</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR-S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine-Team Proliferation and Differentiation of Stem Cells, Institut Universitaire de Cancérologie, F-75012 Paris, France.

\* Co-senior authors

\*\* Co-authors

Correspondence to Charles Durand: [charles.durand@sorbonne-universite.fr](mailto:charles.durand@sorbonne-universite.fr)  
<https://orcid.org/0000-0002-1970-0467>

Short running title: Molecular identity of the HSC subaortic niche

**Abstract**

The first hematopoietic stem cells (HSCs) emerge in the embryonic aorta of midgestation mouse embryo but the precise nature of the supportive microenvironment remains largely unexplored. To address this question, we designed a laser microdissection-based approach to precisely isolate the dorsal and ventral tissues of the aorta at three distinct developmental stages harboring HSCs. Bulk and single cell transcriptomics combined with computational analyses (including correlation- and information-based gene network analysis algorithms) revealed the extent of AGM tissue heterogeneity and specifically unraveled a neuro-mesenchymal cell population in the E11.5 subaortic tissue. Histological and functional studies in several species (zebrafish, mouse and human) validated our strategy, revealing that Decorin and Tenascin C, two extra-cellular matrix genes directly linked to neuronal molecules, are essential for HSC formation. These results demonstrate the dual molecular identity of the subaortic mesenchyme and underscore the HSC niche versatility according to hematopoietic sites.

145 words

## Introduction

Hematopoietic stem cells (HSCs) have the unique capacity to self-renew and to give rise to all mature blood cell types throughout life. In the adult, HSCs are located in the bone marrow (BM) and reside in a supportive microenvironment also called niche that regulates HSC functions (Crane et al., 2017; Durand et al., 2018; Morrison and Scadden, 2014).

Since HSCs are produced early during embryonic life, investigating the developmental origins of HSCs is a critical issue in the field of stem cell biology and regenerative medicine. The first adult-type HSCs, representative of the definitive wave of hematopoiesis and defined by their ability to reconstitute the entire hematopoietic system of adult irradiated recipients, are generated in the Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) region of midgestation mouse embryo (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Müller et al., 1994). Evidence from various vertebrate models revealed the existence of intra-aortic hematopoietic clusters (IAHCs) containing hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and closely attached to the ventral side of the dorsal aorta (Jaffredo et al., 1998; Taviani et al., 1996; Yokomizo and Dzierzak, 2010). Lineage tracing experiments, functional assays and vital live imaging have clearly demonstrated that IAHCs originated from hemogenic endothelial cells through a process of endothelial-to-hematopoietic transition (Bertrand et al., 2010; Boisset et al., 2010; Chen et al., 2009; de Bruijn et al., 2002; Jaffredo *et al.*, 1998; Kissa and Herbomel, 2010; Oberlin et al., 2002; Zovein et al., 2008). Interestingly, in the mouse, IAHCs are also found on the dorsal side of the dorsal aorta (Taoudi and Medvinsky, 2007). Although both the dorsal and ventral aortic domains harbor hematopoietic progenitor potential, HSC activity is preferentially detected in the ventral domain (Souilhol et al., 2016; Taoudi and Medvinsky, 2007). Moreover, preventing the migration of the subaortic mesenchyme from the splanchnopleural mesoderm in the avian embryo was shown to inhibit the production of IAHCs and Runx1 expression, a major transcription factor associated with definitive hematopoiesis (Richard et al., 2013). Collectively, these data indicate that the hematopoietic activity in the dorsal aorta is polarized along the dorso-ventral axis and that the ventral domain of the dorsal aorta (including mesenchymal cells located underneath the endothelium) constitutes a supportive microenvironment for the first emerging HSCs in the embryo. This region contains diverse cell types including

endothelial cells from small vessels, hematopoietic cells in particular macrophages, neuronal projections from the sympathetic nervous systems and neural crest cells (Espín-Palazón *et al.*, 2014; Fitch *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Mariani *et al.*, 2019; Sawamiphak *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2013; Travnickova *et al.*, 2015). Since all these cell types are contained within the subaortic mesenchyme, extracting the molecular identity of that mesenchyme remains a challenge.

The molecular control of AGM HSPCs involves extrinsic factors such as cytokines (Petit-Cocault *et al.*, 2007; Robin *et al.*, 2006; Souilhol *et al.*, 2016), signaling pathways (Durand *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014; Marshall *et al.*, 2000; Peeters *et al.*, 2009; Pouget *et al.*, 2014; Robert-Moreno *et al.*, 2005; Souilhol *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2009) and systemic factors such as shear stress, inflammatory pathway and parasympathetic nervous system (Adamo *et al.*, 2009; Espín-Palazón *et al.*, 2014; Fitch *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Mariani *et al.*, 2019; North *et al.*, 2009; Sawamiphak *et al.*, 2014). However, a comprehensive study disclosing how these genes and signaling pathways co-operate to shape the AGM hematopoietic microenvironment is still missing.

In two previous studies, we reported a systems biology approach for extracting the molecular core of the HSPC niche and specific BM niche cell gene modules (Charbord *et al.*, 2014; Desterke *et al.*, 2020). In line with these studies, we present here an original experimental and computational approach to explore the molecular complexity of the AGM HSPC niche. We compared the transcriptomes of the ventral (VT) and dorsal (DT) aortic tissues isolated by laser microdissection at embryonic day (E) E10.5, E11.5 and E12.5, corresponding to the initiation, increase and decrease of AGM HSC activity, respectively (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Kumaravelu *et al.*, 2002). Gene expression profiling revealed that VT and DT exhibit distinct and dynamic gene expression patterns with time, with a major contrast at E11.5. A multistep computational strategy was designed to exclude the genetic contribution of the endothelial and hematopoietic component. We identified one gene module harboring adhesive and neuronal signatures active in the E11.5 subaortic mesenchyme. Single cell RNAseq analysis revealed the extent of AGM tissue heterogeneity, specifically disclosing two ventral clusters corresponding to a neuro-mesenchymal population. Using the zebrafish model, we functionally validated Decorin and Tenascin C, encoding for two extracellular matrix

(ECM) proteins, as critical regulators of AGM HSPCs. Altogether, this study provides an unexpected insight onto the molecular identity of the AGM HSPC niche by outlining its difference with the BM prototypical niche, which underscores the versatility of the HSPC niches according to their developmental sites.

## **Results**

### **A laser microdissection and systems biology strategy**

We used a laser microdissection approach to isolate the ventral (VT) and dorsal (DT) tissues surrounding the dorsal aorta from E10.5, E11.5 and E12.5 mouse embryos (Figure 1A and Supplemental Video 1). Importantly, VT and DT samples were isolated from the same embryos, and were at least from 3 biological replicates per tissue and time point. Supplemental table 1 recapitulates for each stage the numbers of biological samples and corresponding microdissected tissues, their total surfaces and RNA concentrations (Supplemental Table 1). Pairwise comparison of the entire DT and VT transcriptomes at the three developmental stages was performed. To exclude the molecular contribution of endothelial and hematopoietic cells within VT and DT and to focus on the molecular identity of the AGM mesenchyme at E11.5, we then incorporated additional transcriptomes corresponding to AGM hematopoietic and endothelial cells, and AGM stromal lines. The strategy is schematized in Figure 1B and developed below.

### **The dorsal and ventral tissues surrounding the dorsal aorta exhibit dynamic and distinct molecular signatures**

ANOVA with a low stringency p-value ( $p < 0.06$ ) was used to extract the lists of differentially expressed genes (DEGs) between DT and VT. There were 2704, 1838 and 1873 DEGs at E10.5, E11.5 and E12.5, respectively. Database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID) was then used to determine statistically significant gene ontology (GO) categories and their modulation with time (Huang et al., 2007). VT were characterized by two different patterns of gene categories (Figure 2A, top panels). In one pattern (top left), the expression level of genes implicated in 'ECM', 'cell junction' and 'synapse', and to a lower extent, 'innate immunity' and 'Wnt signaling' peaked at E11.5. In the second pattern (top right) genes implicated in 'transcription', 'cell cycle',

'protein transport' and 'mRNA processing' were maximally expressed at E10.5; the levels of these genes declined to very low values at later time points. The pattern of expression level of DT genes was more complex (Figure 2A, bottom panels). The time course of genes involved in 'developmental protein', 'homeobox' and 'Shh pathway') showed a minimal expression at E11.5 before a large increase at E12.5, while for some of the genes ('transcription', 'cell cycle' and 'axon guidance') there was a steady increase from E10.5 to E12.5 (bottom left). In contrast, the level of some genes ('synapse', 'cytokine activity', 'cell junction') was maximal at E10.5 followed by a slow and more or less complete decrease at later time points (bottom right).

To confirm our analyses using a different statistical approach we used Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for identifying significant gene sets enriched in VT or DT (Subramanian et al., 2005). GSEA on the whole transcriptomes confirmed the GO categories enriched in DT and VT at E11.5. For example, the gene sets, 'Complement' (Figure 2B, top left panel), 'IL6 Jak3 signaling' (Figure 2B, top right panel) and 'Interferon  $\alpha$  response' (bottom left panel) 'were significantly enriched in VT as compared to DT, which is in agreement with recent studies demonstrating the critical role of the pro-inflammatory pathway in the formation and regulation of AGM HSCs (Espin-Palazon et al, 2014; Sawamiphak et al, 2014; Li et al, 2014; Mariani et al, 2019). Interestingly, the 'Epithelial-to-Mesenchymal Transition' gene set was also significantly enriched in VT (bottom right panel). It included numerous genes with high rank metric scores many of which coding for ECM proteins such as *Tnc* and *Dcn* (Figure 2C). Taken together, these results indicate that the dorsal and ventral tissues surrounding the dorsal aorta exhibit a distinct and dynamic molecular signature at midgestation.

### **Modules made of neuronal- and adhesion-related genes characterize the subaortic mesenchyme**

HSC numbers increase in the AGM between E11 and E12 and during 3-5 days of E11 AGM explant culture (Kumaravelu et al., 2002). Moreover, the time course study described above indicated that at E11.5 VT and DT exhibited the most contrasted gene profiles (see Figure 2A). Our study focused therefore on this time point.

In a first step we extended the transcriptomic study by combining the E11.5 expression set with two other sets in order to enrich the database and to unravel the genes that are specific to the mesenchyme. One set was obtained by integrating a dataset established from AGM stromal cell lines derived from the aorta mesenchyme (AM14-1C4 and AM30-3F4) or the urogenital ridges (UG26-1B6 and UG26-3B5) (Charbord *et al.*, 2014; Oostendorp *et al.*, 2002). Principal Component Analysis (PCA) using the entire transcriptome of 20777 genes and 18 samples (DT, VT and stromal lines) did not allow discriminating DT from VT (Figure S1A, top panel), but as expected, such discrimination was evidenced after selection of 3635 DEGs (gene set 1) resulting from ANOVA comparing DT vs. VT (Figure S1A, bottom panel). The second set was obtained by integrating a dataset established from E11.5 sorted AGM cell populations, CD144<sup>pos</sup>CD45<sup>neg</sup> endothelial cells (EC), CD34<sup>low</sup>Kit<sup>low</sup>CD45<sup>pos</sup> differentiated hematopoietic cells (HC), and CD34<sup>high</sup>Kit<sup>high</sup>CD45<sup>pos</sup> hematopoietic precursors enriched in HSCs (Souyri *et al.*, unpublished data). The different tissues and cell populations were not segregated by PCA using the entire transcriptome of 20536 genes and 15 samples (DT, VT, EC, HC, HSC) (Figure S1B, top panel); on the contrary, after selection of 3231 DEGs (gene set 2) resulting from ANOVA comparing DT vs. VT, not only was DT discriminated from VT according to the first principal component (PC1), but also was EC from HC according to the second PC (PC2) (Figure S1B, bottom panel). The intersection of the two gene sets provided a list of 2423 genes (gene set 3) (Figure S1C), which, we considered, most reliably accounted for the contrast between DT and VT tissues. Genes corresponding to this list were mapped in the second set of 15 samples, resulting in a gene set of 2401 genes listed in Supplemental Table 2. PCA still enabled discriminating DT from VT according to PC1 (34,2% of the variance) and EC from HC (19,1% of the variance) according to PC2 (Figure 3A).

To find out which genes were specific to any of the four discriminated tissues and cell populations (VT, DT, EC, HC) and to unravel their respective organization, Weighed Gene Correlation Network Analysis (WGCNA) combined to PCA was applied to our data (Langfelder and Horvath, 2008). The  $\beta$  power of 18 was selected such that the connectivity distribution fitted a scale-free model (Figure S1D). PC1 and PC2 were used to quantify the external traits (DT-to-VT and EC-to-HC contrasts), and the merged dynamic tree cut method was used to identify modules (Figure 3B). Eigenvector

correlation to PC1 indicated that two modules, designated blue and yellow, corresponded to VT and another two, brown and turquoise, to DT; likewise, correlation to PC2 trait enabled identifying one major cyan module for EC and two modules, magenta and salmon, for HC (Figure 3C). Gene analysis confirmed the endothelial and hematopoietic identities of the populations corresponding to the EC and HC modules, respectively. The protein kinases *Kdr*, *Flt1*, and *Flt4*, the cell adhesion molecule *Pecam1* and the migration cue *Plxnd1* were among the most connected genes in the EC module (Figure S1E and Supplemental Table 2). Genes implicated in the immune response (e.g., interferon receptors *Ifnar2* and *Ifngr2*, chemokine receptor *Cxcr3*) and the pan-hematopoietic marker *Cd45* (*Ptprc*) were highly connected genes in the HC modules (Supplemental Table 2). Taken together these results indicate that our *in-silico* strategy has allowed separating the contribution of genes expressed by endothelial and hematopoietic cells from those expressed by other VT cells.

The blue VT module included 295 genes (Supplemental Table 2) with significant collections of genes implicated in either neuronal-related processes ('synapse', 'ion channel', 'GABA receptor activity', 'neuroactive ligand receptor', 'neurotrophin signaling') or adhesion-related ones ('cell adhesion', 'homophilic cell adhesion', 'focal adhesion', 'ECM', 'basement membrane', 'collagen', 'Pi3K-Akt signaling') (Figure 3D). A significant proportion of the genes belonging to this module were reported expressed in brain tissues (Figure 3E). This module included in its central core the ECM components, *Dcn*, *Tnc* and *Col25a1*, the neurotrophin receptor *Ntrk3*, the GABA receptor *Gabra3*, the glutamate receptor *Grid1*, and several soluble mediators implicated in the control of survival, growth or function of neural cells (*Ntf4*, *Fgf14*, *Cntn4*) (Figures 3F). *Col1a1*, *Ncam1*, *Tcn* and *Ntrk3* were among the first neighbors of *Dcn* (Figure 3G). GSEA using an expression set comparing adult BM mouse stromal cells derived from the neural crest to mesenchymal stromal/stem cells (GSE30415) (Wislet-Gendebien et al., 2012) and as reference set the genes of the blue module did not indicate enrichment in either cell phenotypes (Figure 3H). Comparison of the blue module gene set with the set characteristic of mouse HSC-supportive stromal cells (Desterke *et al.*, 2020) did not reveal significant overlap (Figure S1F). The yellow VT module with 288 genes (Supplemental Table 2) included in its central core adhesion-related genes such as the ECM components *Fras1* and *Lama2*, and neuronal-related genes such as *Ntrk2*.

In sum the VT modules were made of a unique mix of neuronal and adhesion-related genes in a combination not found in BM supportive stromal cells or in BM cells derived from the neural crest.

### **Modules characteristic of non-hematopoietic and non-endothelial cells in the aorta roof widely differ from those of the aorta floor**

As stated above two modules, designated brown and turquoise, corresponded to DT. The brown module included 151 genes (Supplemental Table 2) with significant categories of genes implicated in neurogenesis and/or the cell cycle (Figure 4A). Accordingly, a significant proportion of the genes belonging to this module were reported expressed in brain tissues (Figure 3E). This module included in its central core many transcription factors essential for neuronal development and differentiation by activating neuronal targets or repressing non-neuronal genes: *Uncx*, *Npas3*, *Emx2*, *Sox2*, *Pou3f3*, *Pou3f2*, *Myt1*, *Gsx2* (Figures 4B). GSEA using the expression set comparing adult BM mouse stromal derived from the neural crest to mesenchymal stromal/stem cells cited above (Wislet-Gendebien *et al.*, 2012) and as reference set the genes of the brown module indicated a highly significant enrichment in the adult mouse neural crest-derived stromal cell phenotype (Figure 4C, left panel). Likewise, another GSEA using an expression set comparing neonatal mouse BM Nestin<sup>pos</sup>/Pdgfra<sup>pos</sup> mesenchymal stromal cells to Nestin<sup>pos</sup>/Pdgfra<sup>neg</sup> cells containing Schwann cell precursors (GSE61695) (Isern *et al.*, 2014) revealed enrichment in the Schwann precursor phenotype (Figure 4C, right panel).

The turquoise module included 297 genes (Supplemental Table 2) with significant collections of genes implicated in cartilage condensation or synapse formation (Figure 4A). Accordingly, a significant proportion of the genes belonging to this module were reported expressed in brain tissues (Figure 3E). This module included in its central core the transcription factors *Pax1*, *Pax9* and *Gli1* required for skull skeleton, vertebral column and cranio-facial development, the cartilage proteoglycan *Acan* and the ECM cartilage components *Col9a1* and *Hapln1* (Figure 4D).

In sum, one of the DT modules contained neural crest-specific genes as found in the sympathetic ganglia, while the other was more heterogeneous with cartilage-specific

genes as found in the notochord and sclerotome and transcription factors required for the development of the upper body skeleton.

### **Single cell level analyses identify a neuro-mesenchymal cell population in the subaortic tissue**

To assess the extent of cell heterogeneity in the E11.5 AGM region the whole region was dissected and submitted to scRNAseq using a droplet-based method (10X Genomics). After Quality Control (Fig S2A) we retained 15154 cells out of 15862 cells with 2698 genes detected on average. After normalization and dimension reduction, we defined 21 clusters with Louvain clustering that were visualized using Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) method (Figure 5A). The functional enrichment analysis of the differentially expressed genes was carried out using DAVID. Out of the 21 clusters obtained, eight clearly individualized clusters corresponded to well-defined cell types (Supplemental Table 3). For example, C9 including 526 cells corresponded to EC according to GO categories (e.g., 'cell-cell adherens junction', 'sprouting angiogenesis'), KEGG pathways (e.g., 'leukocyte transendothelial migration'), and first-ranked genes (*Kdr*, *Cdh5*, *Emcn*, *Flt1*). Another clearly individualized cluster (C19 including 54 cells) corresponded to proliferating cells (GO categories e.g., 'cell cycle', 'DNA replication', 'protein biosynthesis'). The remaining Louvain clusters were part of a large central aggregate. C0 and C4 included genes characteristic of cartilage and smooth muscle, respectively. C6 and C8 included genes implicated in cell adhesion and neuronal processes, and C10 included genes involved in ECM organization. The remaining clusters included genes implicated in metabolic pathways (C1, C5), cell cycle and metabolism (C2), and developing tissues (C3, C12, C15, C17). In sum, the cluster analysis confirmed the heterogeneity of the AGM region containing hematopoietic cells in intra-aortic clusters or disseminated within tissues, endothelial cells bordering aorta and small vessel lumens, smooth muscle cells forming a thin layer around, and particularly underneath, the aorta, cartilage in notochord and sclerotome, neurons in sympathetic ganglia and adrenal anlage, and mesenchyme in peri-aortic roof, wall and floor tissue. In addition, it contained proliferative cells, cells with active metabolism (oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism) and cells implicated in diverse developmental process (urogenital ridge, somites)

To find out whether the WGCNA gene sets corresponded to distinct cell populations we studied the distribution of genes of the modules among the different clusters. Most genes of the cyan EC module were highly expressed in the C9 EC cluster, while genes of the magenta and salmon HC modules were exclusively expressed in the innate immunity cluster C16 (Figure S2B). Neural crest-specific genes of the brown module were exclusively expressed in the sympathetic nervous system C13 (Figure 5B). Importantly, genes of the blue VT module were predominantly expressed in the C6 and C8 clusters consequently qualified as consisting in ‘neuro-mesenchyme’ (Figure 5B), while the expression of the VT yellow module genes was less restricted, with maxima in C4, C8 and C10 (Figure S2B). Finally, the distribution range of genes of the DT turquoise module was also wide with maxima not only in C0 and C2, but also in C13 including neurons and C7 including red cells (Figure S2B). These data allowed assigning the polarity of certain of the clusters to VT (C4, C6, C8, C10) or DT (C0, C2). Analysis gene per gene (Figure 5C and Figure S2C) showed that some were expressed in only one cluster (e.g., *Nr1h5* in C8, *Th* and *Tubb3* in C13), while the expression of others encompassed several clusters (e.g., *Tnc* in C8 and C10, *Ntrk3* in C4, C6 and C8, *Dcn* in C1, C2, C6, C8 and C10, *Gata3* in C11, C13 and C18 and in some sparse cells in C3, C4, C6 and C15, and *Col1a1* in all clusters of the large central aggregate except C5, C12 and C15). Analysis of fibroblast-specific single cell atlases (Buechler et al., 2021) in steady and perturbed states confirmed the widespread expression of *Col1a1* and *Dcn* in stem cell-like and ‘differentiated’ populations (Figure S2D), contrasting with limited expression in differentiated subtypes for *Tnc* and scarce expression or lack of expression for *Gata3*, *Nr1h5* and *Ntrk3*.

Correlation-based analyses such as WGCNA do not identify direct gene-to-gene interactions or potential causal links. Consequently, to get more insight on the organization of genes characterizing the neuro-mesenchyme we applied the multivariate information-based inductive causation (miic) algorithm (Sella et al., 2018; Verny et al., 2017) to analyze the genes of the blue module. To yield significant results the miic algorithm requires a large number of observations as compared to that of variables. We restricted therefore the analysis to the central core of the module including 98 genes and we considered all cells belonging to the large central aggregate defined by the Louvain

clustering (C0-C6, C8, C10, C12, C14, C15, C17). After filtering out low confidence links (strength of the XY edge > 10) 89 nodes defining direct high-confidence paths were retained (Figure 5D). The resulting pruned network (as compared to that provided by WGCNA) included 4 major hubs with degree  $\geq 17$ : the netrin receptor *Unc5c*, the neural cell adhesion molecule *Ncam1*, the transcription factor *Zmiz1* and the collagen chain *Col1a1*. *Dcn* was linked to *Col1a1* and to *Ncam1*, while *Tnc* was linked to *Ncam1* and *Ntrk3*. Moreover, the miic algorithm uncovered a number of 'v-structures' (e.g., *Nr1h5* --> *Tnc* <- - *Ncam1*) suggesting cause-and-effect interactions, and the presence of one latent regulator upstream of *Mmp16* and *Nr1h5*. Search for protein-protein interaction (PPIs) using STRING indicated a physical link for the following gene-to-gene interactions: high confidence link *Dcn-Col1a1*, and low-confidence links *Ncam1-Mapk3*, *Ncam1-Ntrk3* and *Ncam1-Amph*. It further indicated correlated expression across a large number of experiments of *Dcn* to *Col1a1* and *Col1a1* to *Col8a1*. Finally, NCAM1 was reported co-expressed to UNC5A, a human ortholog of *Unc5c*. These data suggested that some of the links found using miic might correspond to bona fide PPIs.

Taken together the data provide an overall view of the landscape of the AGM region. They confirm the presence of expected populations (EC, neurons, immune, cartilage). More importantly, they stress the complexity of the mesenchyme that includes a neuro-mesenchymal population expressing genes organized in a network in which cell adhesion genes were directly linked to neuronal ones.

### **Decorin, Tenascin C and the protein tyrosine kinase neurotrophin receptor Ntrk3 are strongly enriched in the subaortic neuro-mesenchyme at E11.5**

To validate our strategy, we selected three genes expressed in the neuro-mesenchymal population: Decorin and Tenascin C, two extra-cellular matrix genes directly linked to neuronal molecules, and the tyrosine kinase *Ntrk3*. Decorin is a proteoglycan that binds to collagens and fibronectin and contributes to matrix assembly (Zhang et al., 2018). Tenascin C is an ECM protein involved in the development of connective tissues and nervous system (Midwood et al., 2016). The tyrosine kinase *Ntrk3* encodes a transmembrane receptor binding neurotrophin ligands and plays a role in the nervous system (Bartkowska et al., 2010).

We performed immunofluorescence experiments using specific antibodies on E11.5 mouse transverse sections. Decorin was detected around the notochord and in subaortic tissue but not in aortic endothelial, vascular smooth muscle cells, or macrophages as shown by the absence of overlapping staining between Decorin and CD31,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) or Allograft inflammatory factor 1 (Iba1) (Figures 6A and H). Interestingly, Decorin was expressed in a dynamic manner along the antero-posterior axis with strong expression in cells and associated ECM in large areas of the middle part of the AGM known to be enriched for HSC activity in mouse and human embryos (Easterbrook et al., 2019; Mascarenhas et al., 2009) (Figures 6I-6L). Tenascin C was detected in a dynamic manner and found also highly expressed in cells and associated ECM in large areas of the subaortic tissue (Figure 6B and Supplemental Video 2). Similar distribution of Decorin and Tenascin C were observed in human embryos at 30 days of gestation (Figures 6C and D). *Ntrk3* was present not only as expected in the dorsal root ganglion cells and neurofilaments, but also in extensive areas in cells and associated ECM around and underneath the dorsal aorta (Figure 6E, Supplemental Figure S3A, and Supplemental Video 3). Immunostaining for Tyrosine hydroxylase (Th), an enzyme involved in catecholamine biosynthesis, revealed discrete positive cells in the dorsal and ventral domains of the aorta, corresponding to sympathetic nerve cells (Figure 6F). Immunostaining for Tuj1, a neuron-specific class III beta-tubulin expressed in neurons of the peripheral and central nervous system, revealed a dense array of Tuj1<sup>+</sup> cells and neurofilaments on the lateral sides, and a looser cell distribution underneath the aorta (Figures 6G-H and Figure S3A). Importantly, the distributions of Decorin, Tenascin and *Ntrk3* staining were quite similar in large areas of the subaortic tissue, and clearly distinct from that of Th<sup>+</sup> cells and Tuj1<sup>+</sup> cells and neurofilaments (Figures 6F, G and H, Supplemental Figure S3A). These observations are in agreement with the presence of a Tenascin<sup>+</sup>, Decorin<sup>+</sup>, and *Ntrk3*<sup>+</sup> subaortic neuro-mesenchymal population. .

To confirm the localization of *Dcn*, *Tnc* and *Ntrk3* by another approach we used the tomoseq data recently generated by Yvernogeu et al (Yvernogeu et al., 2020) . These investigators have generated high resolution dorsal to ventral expression maps from cryosections collected in the middle portion of E11.5 mouse and day-35 human embryos, and in the anterior portion of E3 chicken embryos. They have defined a dorsal (R2) vs. a

ventral (R1) region of the aorta according to tomo-seq traces of markers with known distribution: *Bmp4* (R1) and *Gata2* (R1) vs. *Shh* (R2) for E11.5 mouse sections, BMP4 (R1) and *GATA2* (R1) vs. *WWP2* (R2) for day-35 human sections, and *MPL* (R1) vs. *SHH* (R2) for chicken sections. Closer examination of the pattern of *Bmp4* and *Gata2* in mouse E11.5 sections enabled us to discriminate within R1 two regions: R1a with high expression of *Gata2* and low expression of *Bmp4* and R1b with low expression of *Gata2* and high expression of *Bmp4* (Figure S3B, top panel). *Tnc* was highly expressed in R1b only, while *Dcn* showed a peak of expression in R2 and an increased expression in R1b (Figure 6M). The expression of *Ntrk3* was very high in R2, but also showed a steady increase from R1a to R1b (Figure 6P). These results are in agreement with our immunostaining data. Similar analyses in human and chicken sections of genes expressed in the VT blue and yellow modules indicated that 13 genes showed at least one expression peak in the R1b region (Figure 6R and Supplemental Table 4). Among those were *TNC* and *DCN* (Figures 6N and O). *NTRK3* was not detected at significant level (more than one read per cell on average) in the chicken sections, contrarily to the human ones where it showed several peaks in the R1b region (Figure 6Q). In sum, the expression of *Tenascin C*, *Decorin* and the neurotrophin receptor *Ntrk3* appears to some extent evolutionary conserved.

Finally, we analyzed using tomo-seq HC (Figure S3B, middle panel) and DT genes (Figure S3B, bottom panel). Most HC genes (e.g., *Cd164*) showed a wide distribution throughout the different regions, while a few (e.g., *Ifitm1*) implicated in inflammatory reaction displayed a distinctive peak in R1b. DT genes belonging to the brown module (e.g. *Sox2*) showed a more dorsal distribution than genes belonging to the turquoise module (e.g. *Pax1* or *Col9a1*), confirming the para-aortic ganglia and the peri-notochord cellular localization of genes of brown and turquoise modules, respectively.

### **Decorin and Tenascin C are essential for HSC formation**

We then selected Decorin and Tenascin C for functional validation in zebrafish embryos. We first examined the expression of *decorin* (*dcn*) and *tenascin c* (*tnc*) by whole-mount in situ hybridization (WISH). In agreement with previous reports, *dcn* expression was detected in the developing head, the lateral mesoderm, and at lower level in the somites at 36 hours (hr) post-fertilization embryos (Zoeller et al, 2009) (Figure 7A). *Tnc* was

highly expressed in the trunk of developing embryos, notably in the somites and around the dorsal aorta (Lin et al, 2013) (Figure 7A).

We then performed knockdown experiments using antisense morpholinos (MOs). Embryos were injected at the one-cell-stage with MOs against zebrafish homologs of these genes and the formation of HSCs in the dorsal aorta was monitored by WISH for the expression of the HSC markers *runx1* and *cmyb*. Both *dcn* and *tnc* morphants exhibited strong hematopoietic defects at time of HSC emergence in the dorsal aorta, as shown by reduced expression of *runx1* and *cmyb* in morphants as compared to respective controls (Figures 7B and C). The reduced expression of *runx1* (as well as *gata2b*) was also confirmed in *tnc* and *dcn* morphants as compared to uninjected embryos by qRT-PCR (Figure 7B, right). Moreover, confocal microscopy using *kdlr:mCherry;gata2b:gfp* transgenic animals showed a strong reduction in the number of definitive hematopoietic stem and progenitor cells in the dorsal aorta in both morphants (Figure 7D). These effects occurred in absence of any vascular defects as shown by confocal imaging using *flt1:dtomato;flt4:yfp* transgenic lines reporting vessel development (Figure 7E). We confirmed the phenotype of *dcn* morphants with a start MO and revealed a highly significant two-fold decrease in the numbers of *cmyb*<sup>+</sup> cells in the dorsal aorta of *dcn* morphants as compared to uninjected embryos (Figures S4A and B). Moreover, *dcn* morphants exhibited a strong decrease in *cmyb* expression in the caudal hematopoietic tissue (equivalent of mammalian fetal liver) as compared to respective controls (Figure 7F). Finally, we analyzed by qRT-PCR the expression of two genes *ncam1* and *colla1* directly linked to *dcn* in the miic gene network (Figure 5D), in uninjected and *dcn* morphants. The expression of *ncam1a*, *ncam1b*, *colla1a* and *colla1b* were slightly but significantly decreased in *dcn* morphants as compared to uninjected controls (Figure S4C). Collectively, these data identify Decorin and Tenascin C as critical regulators of HSC formation.

## Discussion

In this work we have uncovered the cell populations of dorsal (DT) and ventral (VT) tissues surrounding the dorsal aorta at the critical times of HSC formation in the mouse

embryo. We focused on E11.5 as the time of HSC number increase in the AGM, and showing peak activity of a number of VT genes. By combining DT and VT transcriptomes with that of sorted hematopoietic and endothelial populations from the age-matched AGM, we could exclude the specific contributions of the endothelial and hematopoietic tissues and focus on the other, yet less understood cell components, including the aortic mesenchyme. One major finding of our study was the identification of one VT 'blue' module in which neuronal genes were associated to genes implicated in cell adhesion. Single cell RNAseq analysis revealed the extent of AGM tissue heterogeneity, specifically unraveling two ventral clusters corresponding to the neuro-mesenchymal population. We posited that the HSC-supportive niche activity of the subaortic tissue was related to the gene organization in this population, and examined therefore the tissue distribution and functional relevance of Tenascin C and Decorin, two ECM components whose transcripts were directly linked to neuronal genes. These investigations validated our hypothesis, confirming the subaortic preferential distribution of Tenascin C and Decorin and demonstrating that their knockdown resulted in significant reduction of HSCs in the zebrafish embryo.

The functional association between the hematopoietic and neuronal systems has already been documented in the embryonic context. For example, it has been reported that Gata3 controls the numbers of AGM HSCs through the production of catecholamines, showing a strong influence of the sympathetic nervous system on AGM HSCs (Fitch *et al.*, 2012). In a previous study, we have shown that the neuronal growth factor (NGF) increases HSC activity when added at high doses to AGM explant cultures (Durand *et al.*, 2007). More recently, a transcriptomic analysis in the human embryo at time of HSC development has highlighted a neuronal molecular signature associated with the ventro-lateral domain of the dorsal aorta (Crosse *et al.*, 2020). Remarkably, in our present work we identified a neuro-mesenchymal cell population in which genes implicated in synapse formation, membrane channel activity, or neurotrophin signaling were linked to genes implicated in cell-to-cell or cell-to-ECM adhesion.

To evaluate the roles of Tenascin C and Decorin, we performed loss-of-function experiments in zebrafish embryos, which revealed that both proteins are necessary for HSC formation. Remarkably, in BM HSC-supportive stromal cells *Dcn* is not up- but down-

regulated (Desterke et al, 2020), which is in agreement with its reported role as HSC negative regulator in adult mice (Ichii et al., 2012). Taken together, these data underscore the context-dependency of some of the mediators, activators in the embryonic niche but inhibitors in the adult one. Tenascin C and Decorin could exert their effects on AGM HSCs as structural and/or signaling molecules by interacting with other ECM proteins (e.g., fibronectin, collagen and periostin) and/or binding to cell surface receptors and soluble factors. For example, it has been reported that Tenascin C interacts with Wnt3a, Transforming growth factor  $\beta$  and Vascular endothelial growth factor (Midwood *et al.*, 2016). As a consequence, Tenascin C and Decorin may play a critical role on cell-to-cell communication by regulating the half-life, local concentration and availability of critical growth factors, cytokines and morphogens that may modify the properties of the overlaying endothelial cell layer and /or act beyond this layer on HSC within IAHCs.

In conclusion, at E11.5 we have identified a unique neuro-mesenchymal cell population within the subaortic tissue. Our data demonstrate the role of specific ECM components as part of the HSC-supportive niche and emphasize the major difference between the AGM HSC niche at E11.5 and the prototypical adult BM niche, thus underscoring the versatility of the HSC niches according to the developmental sites.

5828 words  
38668 characters

## **Materials and methods**

### **Mouse embryos**

Embryos were obtained from C57BL/6 mice. The day of vaginal plugging represents day 0.5 (E0.5). Pregnant females were killed by cervical dislocation at appropriate time of gestation. Uteri were taken and placed in 10% Fetal Bovine Serum/1% Penicillin - Streptomycin (Gibco)/phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen). The embryonic stage was confirmed through morphological analysis. Mice were bred at Janvier (Le Genest) and maintained in the animal facility of the Laboratory of Developmental Biology (Sorbonne Université, UMR7622, CNRS) according to institutional guidelines.

### **Human embryos**

Human embryonic tissues were obtained following voluntary, spontaneous or therapeutic abortions. Informed consent for the use of the embryo in research was obtained from the patient, and tissue collection and use were performed according to the guide- lines and with the approval of the French National Ethics Committee.

### **Laser microdissection**

We used the Arcturus Laser Capture Microdissection System to isolate from mouse embryos the ventral and dorsal aortic tissues surrounding the dorsal aorta. Briefly, unfixed embryos were embedded in OCT medium in presence of isopentane cooled at -65°C. Twenty  $\mu\text{m}$  cryostat sections were then prepared and stained before laser microdissection. The dorsal tissue localized in between the notochord and the roof of the aorta and the ventral tissue underneath the aorta were isolated from the same embryos. Three to eight microdissected tissues, corresponding to a total surface in between 84431 and 412076  $\mu\text{m}^2$ , were collected on appropriate caps and then proceeded for RNA extraction using Acturus Picopure RNA isolation kit. RNAs were eluted in a final volume of 13  $\mu\text{l}$  and their concentrations and integrity quantified on a bioanalyzer (Agilent). For each developmental stage, 3 to 4 RNA samples corresponding to DT and VT were prepared from independent embryos.

### **Microarray screening and data analysis**

Between 200 and 1000 pg of total RNA was reverse transcribed following the Ovation Pico V2 system (Nugen) and the resulting double strand cDNA was used for amplification based on SPIA technology. After purification according to Nugen protocol, sens target DNA was fragmented and biotin labelled using Encore Biotin Module kit (Nugen). After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA was then hybridized to GeneChip® MouseGene 2.0 ST (Affymetrix). Normalization and functional analyses (PCA, ANOVA and Venn diagrams) of the datasets were performed using Partek Genomics Suite software. GO categories were analyzed using DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) (Huang *et al.*, 2007).

*ANOVA*: DT vs. VT comparisons were made using 2-way ANOVA with a low stringency p-value ( $p < 0.06$ ) with 'Polarity' and 'Embryo' as grouping variables for E11.5 and E12.5 samples, or three-way ANOVA with 'Polarity', 'Embryo' and 'Series' (corresponding to two independent transcriptomic datasets) for E10.5 samples. After incorporation of additional transcriptomes (AGM stromal cell lines or AGM sorted cell populations) DT vs. VT comparisons were made using 2-way ANOVA with Cell identity and Series (the different batches) as grouping variables.

*GSEA*: GSEA was used to identify gene sets statistically enriched in the microdissected tissues with the curated, hallmark, computational and motif databases (Subramanian *et al.*, 2005).

*WGCNA*: To reconstruct gene network and identify specific modules for the different cell populations, we utilized WGCNA (Langfelder and Horvath, 2008). Adjacencies were given according to signed Pearson's correlation. Modules were constructed with average linkage hierarchical clustering. Cytoscape (<https://cytoscape.org>) was used to visualize the connectivity plot of the most connected genes. Force-oriented layout was used for data representation.

*Tomo-seq analysis*: We analyzed data generated by Yvernogeu et al using slice 2 from cryosections collected in the middle portion of E11.5 mouse and day-35 human embryos, and in the anterior portion of E3 chicken embryos.

### **Single Cell screening and data analysis**

E11.5 AGM region was dissected and submitted to scRNAseq using 10X Genomics (2 biological replicates). Only cells expressing between 200 and 7000 genes with a percentage of mitochondrial RNA under 15% were kept. Also, genes expressed in less than 3 cells also were not considered for the analysis. Since no batch effect was observed between the replicates, the datasets were merged without correction. ScTransform normalization (Hafemeister and Satija, 2019) was performed with the Seurat package v3 (Stuart et al., 2019) with regression of the cell cycle. To regress the cell cycle genes, the default human cell cycle gene list given by Seurat was converted into mouse genes using the biomaRt package (Durinck et al., 2009) and was used following the default recommendation for cell cycle regression with scTransform as described in the Seurat vignette. Clustering was performed with the Louvain algorithm with a resolution of 0,7 on the first 50 PCA components and the cells were projected on an UMAP embedding based on the first 42 PCA components. Then, we identified differentially expressed genes by looking at the overexpressed genes with a fold-change superior to 0,25 in each cluster compared to the whole dataset using the Wilcoxon's sum rank test. Only genes expressed in more than 25% of the cluster cells and with a q-value under 0,05 were kept. These genes were then ranked by p-value and used to determine each cluster identity. The expression of the WGCNA gene sets was performed using the Seurat AddModuleScore function with the gene list of each module. The cell identity of each cluster was assessed by considering the genes top-ranked by p-values, and by comparing the genes of a cluster to all others using Wilcoxon's sum rank test (p-value < 0,05). Multivariate information-based inductive causation (miic) algorithm (Sella *et al.*, 2018; Verny *et al.*, 2017) was used to analyze the genes of the blue module taking into account considered all cells belonging to the large central aggregate defined by the Louvain clustering (C0-6, C8, C10, C12, C14, C15, C17). The input matrix consisted of the raw counts for each gene of the blue module (12516 observations and 89 variables).

### **Immunodetection**

Embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (Sigma) at 4°C, transferred in a solution containing PBS/sucrose 15% for 48 hours, impregnated in PBS/15% sucrose/7.5% gelatin for 2 hours at 37°C, embedded at room temperature, frozen in

isopentane at -65°C using liquid nitrogen and stored at -80°C until used for cryosectioning. Frozen sections (20 µm) of E11.5 embryos were cut on a cryostat (Leica). Antibodies used for staining the sections were: mouse anti-mouse/human Tnc (1/50, Thermofisher), goat anti-mouse Decorin (1/200, R&D Systems), mouse monoclonal anti-human Dcn (1/200, R&D Systems), goat anti-mouse Ntrk2 (1/200, R&D Systems) and anti-mouse Ntrk3 (1/200, R&D Systems), rabbit anti-mouse CD31(1/200, Abcam), mouse monoclonal anti-mouse  $\alpha$ -smooth muscle actin (1/500, Sigma), rabbit polyclonal anti-mouse Iba1 (1/1000, Wako), mouse anti-mouse Tuj1 antibody (1/1000, BioLegend) and goat anti-human CD105 (1/100, R&D Systems). These primary antibodies were visualized with bovine anti-goat IgG-Alexa647 (1/400, Jackson), goat anti-mouse IgG2a-Alexa488 (Invitrogen, 1/200), donkey anti-mouse IgG-Alexa488 (1/400, Jackson) and donkey anti-rabbit Cy3 (1/400, Jackson). Fluorescent imaging was performed using fluorescence Leica microscope and confocal Leica TCS SP5 at the imaging facility, IBPS, Sorbonne Université.

### **Whole-mount immunostaining, tissue clearing and 3D imaging**

Embryos were incubated at RT for 3 hrs in a solution (PBSGT) containing PBS 1X 0.2% gelatin, 0.5% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 0.01% thimerosal (Sigma-Aldrich). Embryos were then incubated with the first antibodies as described above in PBSGT at RT for 2-3 days. After 6 washes, samples were incubated with secondary antibodies in PBSGT overnight, washed and processed for 3DISCO tissue clearing as described by Belle et al (Belle et al., 2014). Images were acquired using an ultramicroscope (LaVision BioTec). 3D imaging, stack images conversion and movies were generated using Vision 4D 3.0 software (Arivis).

### **Zebrafish studies**

Zebrafish were maintained according to University of California, San Diego, International Animal Care and Use Committee guidelines and according to the aquatic animal guidelines of Sorbonne Université. Embryos were collected, staged, fixed, and processed for in situ hybridization as previously described (Thisse et al., 1993). Wild-type or transgenic

zygotes were injected with a morpholino solution and incubated at 28.5 C until they reached the stage of interest. After in situ hybridization, some embryos were fixed in PBS 0.1M for 30 minutes for sectioning. Embryos were embedded in a medium of agarose, agar and sucrose and the blocks were left overnight at 4°C in 30% sucrose. Blocks are freezed in liquid nitrogen and cut (16 µm) on a cryostat (Leica) and after stored at -20°C. For RNA extraction, the head, yolk and yolk extension were removed using insulin serynge and needle on ice under binocular loupe (Leica). Between 10 to 15 uninjected and morphant embryos were collected and RNA was extracted using Qiagen RNA extraction kit and proceed with qRT-PCR. Quantitative RT-PCR was performed with Taqman (Applied Biosystems) probes (Supplemental Table-5). Amplification was processed on a BioRad CFX96. 10-15 uninjected embryos and *dcn* morphants were collected from 3 independent injection experiments and used for RNA extraction. *Ef1α* was used as internal controls, and the relative abundance for each sample was computed by the comparative method ( $\Delta\text{Ct}$ )

Quantification for whole mount in situ hybridization on 4dpf embryos was done by measuring pixel intensity of the caudal hematopoietic tissue as described (Dobrzycki et al., 2020). Briefly, embryos were imaged using Fiji software. Images were inverted and then image type was changed to 8-bit. Using polygonal tool, we drew around the region of interest manually and measured the mean of pixel intensity after background correction.

## **Statistics**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Unpaired T or Mann and Whitney tests were used to evaluate statistical significance. Data were considered statistically significant for  $p < 0.05$ .

## **Accession numbers**

The NCBI GEO accession numbers for the microarrays presented in this study are GSE159592.

### **Author contributions**

PC, TJ and CD designed research, analyzed the data and wrote the manuscript. PYC, OM and CP performed experiments and analyzed the data. DT designed research on zebrafish, analyzed the data and wrote the manuscript. NR, PF, AM, SJ and EH performed experiments and analyzed the data. OP and HI analyzed data. MS provided transcriptomic datasets. TJ provided financial support.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants of the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20100318258), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) and Sorbonne Université. We thank Pascal Legendre for critical reading of the manuscript, and Monara Angelim and Pascal Legendre (CNRS UMR8246) for providing us with the anti-Tuj1 and -Iba1 antibodies. We thank Shen-Ping Hwang (Institute of Bioscience and Biotechnology, Taiwan) and Srinath Ramkumar and Didier Stainier (Max Planck Institute for heart and lung research, Germany) for providing us with the *tnc* and *dcn* riboprobes, respectively. We thank the imaging (Institut de la Vision and Institut de Biologie Paris-Seine) facilities for their expertises and advices. We thank Sophie Gournet (CNRS UMR7622) for drawing assistance.

## Figure legends

### **Figure 1. A laser microdissection and systems biology strategy.**

(A) Representative sections of E10.5, E11.5 and E12.5 mouse embryos used in the study for laser microdissection. The white areas below and above the dorsal aorta at E11.5 show the dorsal and ventral microdissected tissues.

(B) Flow chart outlining the combination of laser microdissection and computational analysis of the dorsal (DT) and ventral (VT) aortic tissues.

### **Figure 2. The dorsal and ventral tissues surrounding the dorsal aorta exhibit dynamic and distinct molecular signatures.**

(A) GO analysis of DT and VT tissues at E10.5, E11.5 and E12.5.

(B) GSEA showing 4 gene sets significantly enriched in VT at E11.5. NES: normalized enrichment score, FDR: false discovery rate.

(C) Rank metric score of the 23 first genes from the 'Epithelial\_Mesenchymal\_Transition' gene set enriched in VT at E11.5.

### **Figure 3. Modules made of neuronal- and adhesion-related genes characterize the subaortic mesenchyme (see also Figures S2).**

(A) PCA highlighting the different clusters using 2423 genes and 15 biological samples. The score plot of PC1 vs. PC2 is shown.

(B) Module detection using WGCNA. The merged dynamic hybrid branch cutting method was used to define the modules, each named by a color. Modules correspond to squares along the diagonal of the topological overlap matrix plot shown below the clustering tree. DT and VT modules are highlighted.

(C) Module eigenvectors corresponding to the DT to VT (PC1 trait) and to the EC to HC contrasts (PC2 trait).

(D) Significant GO categories corresponding to genes in VT blue module.

(E) Reported expression in brain tissues of genes expressed in the VT and MD modules.

(F) Connectivity plots of genes belonging to the VT blue module. Upper panel: Cytoscape connectivity plot of the 119 most connected genes (out of a total of 295 genes). Lower panel: eigengene-based connectivity bar plot of the Top-30 genes.

(G) Diagram of the Dcn first neighbors. The length of the link between Dcn and another gene is proportional to the gene proximity. Links in black correspond to direct paths as indicated by miic.

(H) GSEA plot using as reference the VT blue module gene set, and as expression set the GSE30415 dataset comparing adult mouse cells derived from the neural crest (NCSC) to mesenchymal stromal cells (MSC). There is no preferential shift to the right or to the left, indicating no enrichment in NCSC or in MSC.

**Figure 4. Modules characteristic of non-hematopoietic and non-endothelial cells in the aorta roof widely differ from those of the aorta floor.**

(A) Significant GO categories corresponding to genes in DT modules.

(B) Connectivity plots of genes belonging to the DT brown module. Upper panel: Cytoscape connectivity plot of the 113 most connected genes (out of a total of 151 genes). Lower panel: eigengene-based connectivity bar plot of the Top-30 genes.

(C) GSEA plot using as reference the DT brown module gene set, and as expression set: Top panel: the GSE30415 dataset comparing adult mouse cells derived from the neural crest (NCSC) to mesenchymal stromal cells (MSC). Bottom panel: the GSE61695 dataset comparing neonatal mouse bone marrow cells containing Schwann precursors (Schwann) to mesenchymal stromal cells (MSC).

(D) Connectivity plots of genes belonging to the DT turquoise module. Left panel: Cytoscape connectivity plot of the 167 most connected genes (out of a total of 293 genes). Right panel: eigengene-based connectivity bar plot of the Top-30 genes.

**Figure 5. Single cell level analyses identify a neuro-mesenchymal cell population in the subaortic tissue**

(A) UMAP embedding of the Louvain clusters corresponding to E11.5 AGM single cell analysis.

(B) Distribution of genes of the brown and blue WGCNA modules among the different clusters. The score of each cell for each module is represented both on the UMAP embedding and on Violin plots.

(C) Expression pattern of *Nr1h5*, *Ntrk3*, *Tnc* and *Dcn* at E11.5.

(D) Miic plot of the central core genes of the blue module.

**Figure 6. Tenascin C, Decorin and the tyrosine protein kinase neurotrophin receptor Ntrk3 are strongly expressed in the subaortic neuro-mesenchyme at E11.5.**

(A) Immunodetection for Decorin, CD31 and  $\alpha$ SMA on E11.5 mouse sections.

(B) Immunodetection for Tenascin C and CD31 on E11.5 mouse sections.

(C-D) Immunodetection for Decorin, Tenascin C, and CD105 on 30 days human embryo sections.

(E) Immunodetection for Ntrk3 and CD31 on E11.5 mouse embryo sections.

(F) Immunodetection for Ntrk3 and Th on E11.5 mouse embryo sections.

(G) Immunodetection for Ntrk3, Iba1 and Tuj1 on E11.5 mouse sections.

(H) Immunodetection for Decorin, Iba1 and Tuj1 on E11.5 mouse sections.

(I-L) Immunodetection for Decorin and CD31 on several transverse sections along the antero-posterior axis of E11.5 mouse embryo.

(M-Q) Analysis of tomoseq traces. The different sections are given on the x-axis and the corresponding number of reads on the y-axis. R1 and R2 regions are as defined by Yvernogeu et al. R1a and R1b regions are defined according to the expression of known markers (see text). Results are for mouse (L, O), human (M, P) and chicken (N).

(R) Venn diagram showing the number VT genes with peak expression in R1b for mouse, human, and chicken data.

Scale bar for Figures 5A, B, E, F, G, H, I, J and K is 100  $\mu$ m. Scale bar for Figures 5C and D is 50  $\mu$ m. Nc: notochord, Ao: dorsal aorta.

**Figure 7. Decorin and Tenascin C are essential for HSC formation.**

(A) WISH for *dcn* and *tnc* in 36 hr postfertilization embryos. Scale bar is 25  $\mu$ m.

(B) Left panel: WISH for *runx1* in 26 hr postfertilization morphants embryos and their respective uninjected controls. Numbers of embryos with or without (out of total) *runx1* staining are indicated in the bottom left corner. Right : qRT-PCR analysis for *runx1* and *gata2b* expression in morphants and uninjected embryos. \* indicates p value<0.05.

(C) WISH for *cmyb* in 40 hr postfertilization morphants embryos and their respective uninjected controls. Numbers of embryos with or without (out of total) *cmyb* staining are

indicated in the bottom left corner.

(D) Fluorescent microscopy of *kdlr:mCherry:gata2b:gfp* in 30 hr postfertilization morphants embryos and their respective controls.

(E) Fluorescent microscopy of *flt1:dtomato;flt4:yfp* in 36 hr postfertilization morphants embryos and their respective controls.

(F) WISH for *cmyb* in 4 days postfertilization morphants and uninjected controls. 45 morphants and 58 respective uninjected embryos were analyzed and imaged for signal quantification. The plots indicate the intensity for *cmyb* expression in the CHT after background correction for each individual embryo. Error bars represent the SEM and \*\*\*\* indicates  $p \text{ value} < 0.0001$  using either two-tailed t-test or Mann and Whitney test.

## Supplemental Figure legends

### Figure S1 (related to Figure 3): Modules made of neuronal- and adhesion-related genes characterize the sub-aortic mesenchyme.

(A) PCA on the set obtained by integrating AGM stromal cell lines. Top panel: PCA using the entire transcriptome of 20777 genes and 18 samples. Bottom panel: PCA using 3635 DEGs resulting from ANOVA comparing DT to VT gene sets.

(B) PCA on the set obtained by integrating sorted AGM cell populations (EC, HC, HSC). Top panel: PCA using the entire transcriptome of 20536 genes and 15 samples. Bottom panel: PCA using 2423 DEGs resulting from ANOVA comparing DT to VT gene sets.

(C) Venn diagram of the gene sets obtained in B and C.

(D) WGCNA selection parameters. Left panel: Plot for choosing the power  $\beta$  of the signed weighted correlation networks; the square of the correlation coefficient between the connectivity frequency and the binned connectivity is represented on the y-axis, while the different powers adjusting the adjacencies are given on the x-axis. Right panel: Connectivity distribution using  $\beta$  power of 18.

(E) Cytoscape connectivity plot of genes in the EC cyan module. The 107 most connected genes (out of a total of 174 genes) are shown.

(F) Venn diagram of the gene sets of the VT Blue and Yellow modules and the gene set characteristic of mouse BM HSPC-supportive stromal cells as described in Desterke et al, 2020.

### Figure S2 (related to figure 5): Single cell level analyses identify neuro-mesenchymal cell populations in the subaortic tissue.

(A) Number of genes, transcripts and percentage of mitochondrial RNA detected in each scRNAseq sample before filtering

(B) Distribution of genes of the cyan, salmon, magenta, yellow and turquoise WGCNA modules among the different clusters. The score of each cell for each module is represented both on the UMAP embedding and on Violin plots.

(C) Expression pattern of *Tubb3*, *Th*, *Gata3* and *Col1a1* at E11.5.

(D) Expression pattern of *Dcn* and *Col1a1* in the fibroblast-specific single cell atlas (perturbed state).

**Figure S3 (related to Figure 5): Immunodetection for Tuj1 and Ntrk3 on E11.5 mouse sections and tomoseq traces.**

(A) Immunodetection for Tuj1 and Ntrk3 on E11.5 mouse sections. Top and middle panels represent the simple staining for Tuj1 and Ntrk3, respectively. Bottom panel represents the merge between Tuj1 and Ntrk3 staining. The dashed white line indicates the lumen of the dorsal aorta. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

(B) Top panel: Analysis of tomoseq traces of markers with known distribution (dorso-ventral axis): *Bmp4* (R1) and *Gata2* (R1) vs. *Shh* (R2) for E11.5 mouse sections. R1a is defined by the high expression of *Gata2* and the low expression of *Bmp4* and R1b with the low expression of *Gata2* and the high expression of *Bmp4*. The different sections are given on the x-axis and the corresponding number of reads on the y-axis. Middle panel: Analysis of tomoseq traces of HC genes. Bottom panel: Analysis of tomoseq traces of DT genes. *Sox2* belongs to the brown module, while *Pax1* and *Col9a1* belong to the turquoise one.

**Figure S4 (related to Figure 7): Quantification of *cmyb*<sup>+</sup> cells in the dorsal aorta and expression of two genes *ncam1* and *col1a1* linked to *dcn*.**

(A) WISH for *cmyb* expression in 36 hr postfertilization *dcn* morphants and respective uninjected controls. Arrowheads indicate *cmyb*<sup>+</sup> cells.

(B) Numbers of *cmyb*<sup>+</sup> cells in 23 *dcn* morphants and 33 uninjected embryos. Error bars represent the SEM and \*\*\*\* indicates p value < 0.0001 using either two-tailed t- or Mann and Whitney tests.

(C) qRT-PCR for *ncam1a*, *ncam1b*, *col1a1a* and *col1a1b* expression in 36 hr postfertilization *dcn* morphants and respective uninjected controls. In between 9 to 12 replicates were considered from 3 independent injection experiments. Error bars represent the SEM and \* indicates p value < 0.05 using unilateral Mann and Whitney test.

## **Supplemental Tables**

### **Supplemental Table 1. Laser microdissection quantification at E10.5, E11.5 and E12.5.**

This table indicates for each developmental stage the numbers of biological samples for VT and DT, the numbers of microdissected tissues, their corresponding surfaces and RNA concentrations.

### **Supplemental Table 2. The gene set accounting for the contrast between DT and VT tissues and the gene allocation to the different WGCNA modules.**

### **Supplemental Table 3. Characteristics of Louvain clusters found by single cell RNA-Seq analysis.**

**Supplemental Table 4. TomoSeq gene profiling: Genes with expression peak in the R1b region common to at least two species.** The TomoSeq profiles of individual genes were analyzed from data generated by Yvernogeu et al using slice 2 from cryosections collected in the middle portion of E11.5 mouse and day-35 human embryos, and in the anterior portion of E3 chicken embryos.

### **Supplemental Table 5. Taqman probes used for qRT-PCR.**

## **Supplemental videos**

**Supplemental Video 1. Laser microdissection.** This movie illustrates the microdissection of the dorsal tissue located between the notochord and the roof of the dorsal aorta at E12.5. The green line indicates the trajectory of the ultraviolet laser used for cutting the tissue. The green spots indicate the position of the infrared laser used for capturing the microdissected tissue.

**Supplemental Video 2. 3D imaging of Tenascin C (in green) and CD31 (in red) expression at E11.5.** This video was generated using Arivis software after whole-mount immunostaining, 3DISCO clearing and imaging using an ultramicroscope (LaVision Bio Tec). The movie shows the expression profiling of Tnc and CD31 along the antero-posterior axis of the embryo.

**Supplemental Video 3. 3D analysis of Ntrk3 expression at E11.5.** This video was generated using Arivis software after whole-mount immunostaining, 3DISCO clearing and imaging using an ultramicroscope (LaVision Bio Tec). The movie shows the expression profiling of Ntrk3 along the antero-posterior axis of the embryo.

## References

- Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S., Mack, P.J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dicey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M.W., Yoder, M.C., et al. (2009). Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* *459*, 1131-1135. 10.1038/nature08073.
- Bartkowska, K., Turlejski, K., and Djavadian, R.L. (2010). Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* *70*, 454-467.
- Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., and Chédotal, A. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell reports* *9*, 1191-1201. 10.1016/j.celrep.2014.10.037.
- Bertrand, J.Y., Chi, N.C., Santos, B., Teng, S., Stainier, D.Y., and Traver, D. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* *464*, 108-111. 10.1038/nature08738.
- Boisset, J.C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., and Robin, C. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* *464*, 116-120. 10.1038/nature08764.
- Buechler, M.B., Pradhan, R.N., Krishnamurty, A.T., Cox, C., Calviello, A.K., Wang, A.W., Yang, Y.A., Tam, L., Caothien, R., Roose-Girma, M., et al. (2021). Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature* *593*, 575-579. 10.1038/s41586-021-03549-5.
- Charbord, P., Pouget, C., Binder, H., Dumont, F., Stik, G., Levy, P., Allain, F., Marchal, C., Richter, J., Uzan, B., et al. (2014). A systems biology approach for defining the molecular framework of the hematopoietic stem cell niche. *Cell stem cell* *15*, 376-391. 10.1016/j.stem.2014.06.005.
- Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* *457*, 887-891. 10.1038/nature07619.
- Crane, G.M., Jeffery, E., and Morrison, S.J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol* *17*, 573-590. 10.1038/nri.2017.53.
- de Bruijn, M.F., Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K., Sanchez, M.J., and Dzierzak, E. (2002). Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* *16*, 673-683. 10.1016/s1074-7613(02)00313-8.
- Desterke, C., Petit, L., Sella, N., Chevallier, N., Cabeli, V., Coquelin, L., Durand, C., Oostendorp, R.A.J., Isambert, H., Jaffredo, T., and Charbord, P. (2020). Inferring Gene Networks in Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell-Supporting Stromal Niche Populations. *iScience* *23*, 101222. 10.1016/j.isci.2020.101222.
- Dobrzycki, T., Krecsmarik, M., and Monteiro, R. (2020). Genotyping and Quantification of In Situ Hybridization Staining in Zebrafish. *J Vis Exp*. 10.3791/59956.
- Durand, C., Charbord, P., and Jaffredo, T. (2018). The crosstalk between hematopoietic stem cells and their niches. *Curr Opin Hematol* *25*, 285-289. 10.1097/moh.0000000000000438.
- Durand, C., Robin, C., Bollerot, K., Baron, M.H., Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2007). Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 20838-20843. 10.1073/pnas.0706923105.
- Durinck, S., Spellman, P.T., Birney, E., and Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* *4*, 1184-1191. 10.1038/nprot.2009.97.
- Easterbrook, J., Rybtsov, S., Gordon-Keylock, S., Ivanovs, A., Taoudi, S., Anderson, R.A., and Medvinsky, A. (2019). Analysis of the Spatiotemporal Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Early Human Embryo. *Stem cell reports* *12*, 1056-1068. 10.1016/j.stemcr.2019.03.003.
- Espín-Palazón, R., Stachura, D.L., Campbell, C.A., García-Moreno, D., Del Cid, N., Kim, A.D., Candel, S., Meseguer, J., Mulero, V., and Traver, D. (2014). Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell* *159*, 1070-1085. 10.1016/j.cell.2014.10.031.
- Fitch, S.R., Kimber, G.M., Wilson, N.K., Parker, A., Mirshekar-Syahkal, B., Göttgens, B., Medvinsky, A., Dzierzak, E., and Ottersbach, K. (2012). Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell stem cell* *11*, 554-566. 10.1016/j.stem.2012.07.002.
- Hafemeister, C., and Satija, R. (2019). Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol* *20*, 296. 10.1186/s13059-019-1874-1.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic acids research* *35*, W169-175. 10.1093/nar/gkm415.
- Ichii, M., Frank, M.B., Iozzo, R.V., and Kincade, P.W. (2012). The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* *119*, 1683-1692. 10.1182/blood-2011-07-369199.

- Isern, J., García-García, A., Martín, A.M., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F., and Méndez-Ferrer, S. (2014). The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *eLife* 3, e03696. 10.7554/eLife.03696.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., and Dieterlen-Lièvre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development (Cambridge, England)* 125, 4575-4583.
- Kissa, K., and Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 464, 112-115. 10.1038/nature08761.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development (Cambridge, England)* 129, 4891-4899.
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9, 559. 10.1186/1471-2105-9-559.
- Lee, Y., Manegold, J.E., Kim, A.D., Pouget, C., Stachura, D.L., Clements, W.K., and Traver, D. (2014). FGF signalling specifies haematopoietic stem cells through its regulation of somitic Notch signalling. *Nat Commun* 5, 5583. 10.1038/ncomms6583.
- Li, Y., Esain, V., Teng, L., Xu, J., Kwan, W., Frost, I.M., Yzaguirre, A.D., Cai, X., Cortes, M., Maijenburg, M.W., et al. (2014). Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production. *Genes Dev* 28, 2597-2612. 10.1101/gad.253302.114.
- Mariani, S.A., Li, Z., Rice, S., Krieg, C., Frangkogianni, S., Robinson, M., Vink, C.S., Pollard, J.W., and Dzierzak, E. (2019). Pro-inflammatory Aorta-Associated Macrophages Are Involved in Embryonic Development of Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 50, 1439-1452.e1435. 10.1016/j.immuni.2019.05.003.
- Marshall, C.J., Kinnon, C., and Thrasher, A.J. (2000). Polarized expression of bone morphogenetic protein-4 in the human aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* 96, 1591-1593.
- Mascarenhas, M.I., Parker, A., Dzierzak, E., and Ottersbach, K. (2009). Identification of novel regulators of hematopoietic stem cell development through refinement of stem cell localization and expression profiling. *Blood* 114, 4645-4653. 10.1182/blood-2009-06-230037.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906. 10.1016/s0092-8674(00)80165-8.
- Midwood, K.S., Chiquet, M., Tucker, R.P., and Orend, G. (2016). Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci* 129, 4321-4327. 10.1242/jcs.190546.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334. 10.1038/nature12984.
- Müller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301. 10.1016/1074-7613(94)90081-7.
- North, T.E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., Lord, A.M., Weber, G.J., Harris, J., Cutting, C.C., Huang, P., et al. (2009). Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell* 137, 736-748. 10.1016/j.cell.2009.04.023.
- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., and Péault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development (Cambridge, England)* 129, 4147-4157.
- Oostendorp, R.A., Harvey, K.N., Kusadasi, N., de Bruijn, M.F., Saris, C., Ploemacher, R.E., Medvinsky, A.L., and Dzierzak, E.A. (2002). Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood* 99, 1183-1189. 10.1182/blood.v99.4.1183.
- Peeters, M., Ottersbach, K., Bollerot, K., Orelia, C., de Bruijn, M., Wijgerde, M., and Dzierzak, E. (2009). Ventral embryonic tissues and Hedgehog proteins induce early AGM hematopoietic stem cell development. *Development (Cambridge, England)* 136, 2613-2621. 10.1242/dev.034728.
- Petit-Cocault, L., Volle-Challier, C., Fleury, M., Péault, B., and Souyri, M. (2007). Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis. *Development (Cambridge, England)* 134, 3031-3040. 10.1242/dev.001818.
- Pouget, C., Peterkin, T., Simões, F.C., Lee, Y., Traver, D., and Patient, R. (2014). FGF signalling restricts haematopoietic stem cell specification via modulation of the BMP pathway. *Nat Commun* 5, 5588. 10.1038/ncomms6588.
- Richard, C., Drevon, C., Canto, P.Y., Villain, G., Bollérot, K., Lempereur, A., Teillet, M.A., Vincent, C., Rosselló Castillo, C., Torres, M., et al. (2013). Endothelio-mesenchymal interaction controls runx1 expression and modulates the notch pathway to initiate aortic hematopoiesis. *Dev Cell* 24, 600-611. 10.1016/j.devcel.2013.02.011.
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J.L., and Bigas, A. (2005). RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development (Cambridge, England)* 132, 1117-1126. 10.1242/dev.01660.

- Robin, C., Ottersbach, K., Durand, C., Peeters, M., Vanes, L., Tybulewicz, V., and Dzierzak, E. (2006). An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell* *11*, 171-180. 10.1016/j.devcel.2006.07.002.
- Sawamiphak, S., Kontarakis, Z., and Stainier, D.Y. (2014). Interferon gamma signaling positively regulates hematopoietic stem cell emergence. *Dev Cell* *31*, 640-653. 10.1016/j.devcel.2014.11.007.
- Sella, N., Verny, L., Uguzzoni, G., Affeldt, S., and Isambert, H. (2018). MIIC online: a web server to reconstruct causal or non-causal networks from non-perturbative data. *Bioinformatics* *34*, 2311-2313. 10.1093/bioinformatics/btx844.
- Souilhols, C., Gonneau, C., Lendinez, J.G., Batsivari, A., Rybtsov, S., Wilson, H., Morgado-Palacin, L., Hills, D., Taoudi, S., Antonchuk, J., et al. (2016). Inductive interactions mediated by interplay of asymmetric signalling underlie development of adult haematopoietic stem cells. *Nat Commun* *7*, 10784. 10.1038/ncomms10784.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoekius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* *177*, 1888-1902 e1821. 10.1016/j.cell.2019.05.031.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 15545-15550. 10.1073/pnas.0506580102.
- Takahashi, Y., Sipp, D., and Enomoto, H. (2013). Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science (New York, N.Y.)* *341*, 860-863. 10.1126/science.1230717.
- Taoudi, S., and Medvinsky, A. (2007). Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 9399-9403. 10.1073/pnas.0700984104.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H.S., Dieterlen-Lièvre, F., and Péault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* *87*, 67-72.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F., and Postlethwait, J.H. (1993). Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development (Cambridge, England)* *119*, 1203-1215.
- Travnickova, J., Tran Chau, V., Julien, E., Mateos-Langerak, J., Gonzalez, C., Lelièvre, E., Lutfalla, G., Tavian, M., and Kissa, K. (2015). Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nat Commun* *6*, 6227. 10.1038/ncomms7227.
- Verny, L., Sella, N., Affeldt, S., Singh, P.P., and Isambert, H. (2017). Learning causal networks with latent variables from multivariate information in genomic data. *PLoS Comput Biol* *13*, e1005662. 10.1371/journal.pcbi.1005662.
- Wilkinson, R.N., Pouget, C., Gering, M., Russell, A.J., Davies, S.G., Kimelman, D., and Patient, R. (2009). Hedgehog and Bmp polarize hematopoietic stem cell emergence in the zebrafish dorsal aorta. *Dev Cell* *16*, 909-916. 10.1016/j.devcel.2009.04.014.
- Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V., Alix, P., Leprince, P., Glejzer, A., Poulet, C., Hennuy, B., Sommer, L., Shakhova, O., and Rogister, B. (2012). Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci* *69*, 2593-2608. 10.1007/s00018-012-0937-1.
- Yokomizo, T., and Dzierzak, E. (2010). Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Development (Cambridge, England)* *137*, 3651-3661. 10.1242/dev.051094.
- Yvernogeu, L., Klaus, A., Maas, J., Morin-Poulard, I., Weijts, B., Schulte-Merker, S., Berezikov, E., Junker, J.P., and Robin, C. (2020). Multispecies RNA tomography reveals regulators of hematopoietic stem cell birth in the embryonic aorta. *Blood*. 10.1182/blood.2019004446.
- Zhang, W., Ge, Y., Cheng, Q., Zhang, Q., Fang, L., and Zheng, J. (2018). Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget* *9*, 5480-5491. 10.18632/oncotarget.23869.
- Zovein, A.C., Hofmann, J.J., Lynch, M., French, W.J., Turlo, K.A., Yang, Y., Becker, M.S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J.C., et al. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* *3*, 625-636. 10.1016/j.stem.2008.09.018.

Figure 01

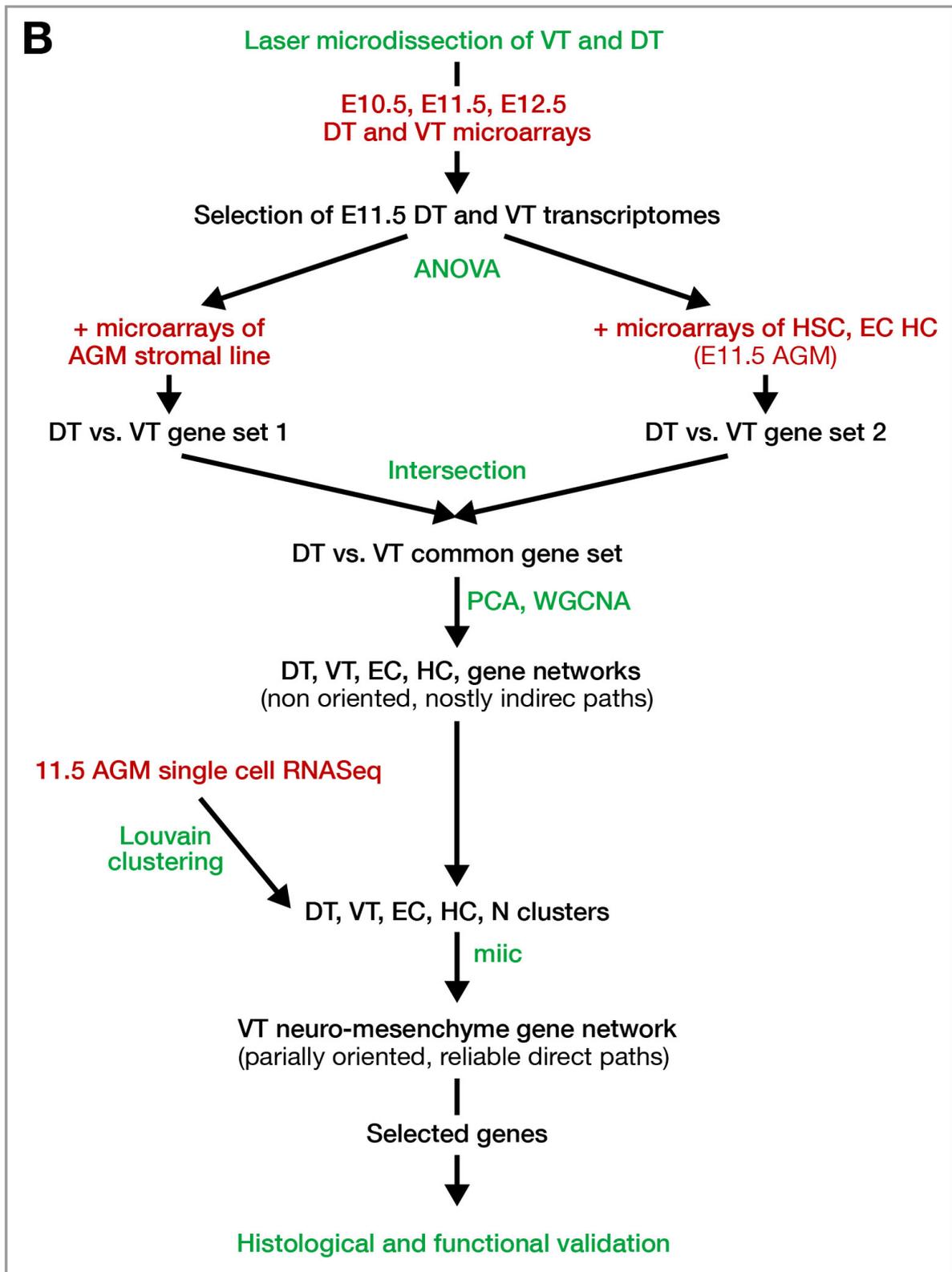
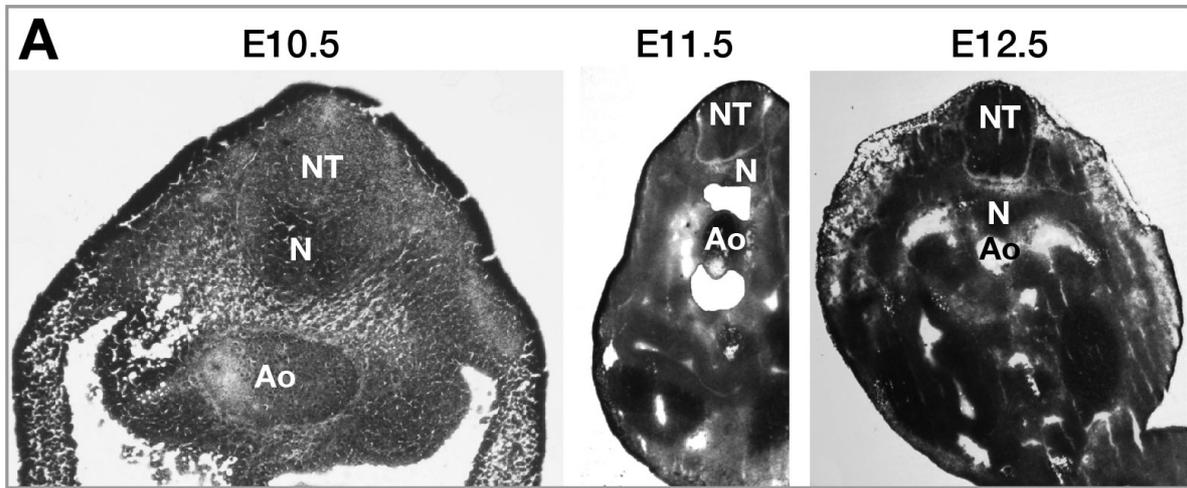


Figure 02

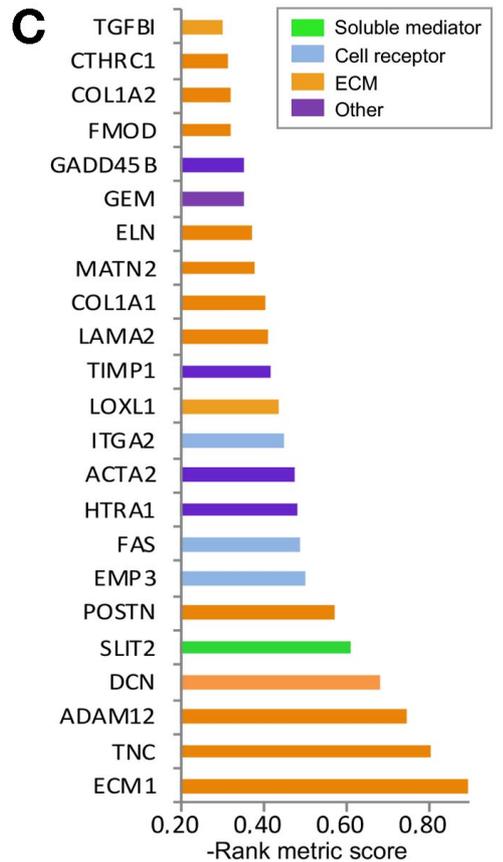
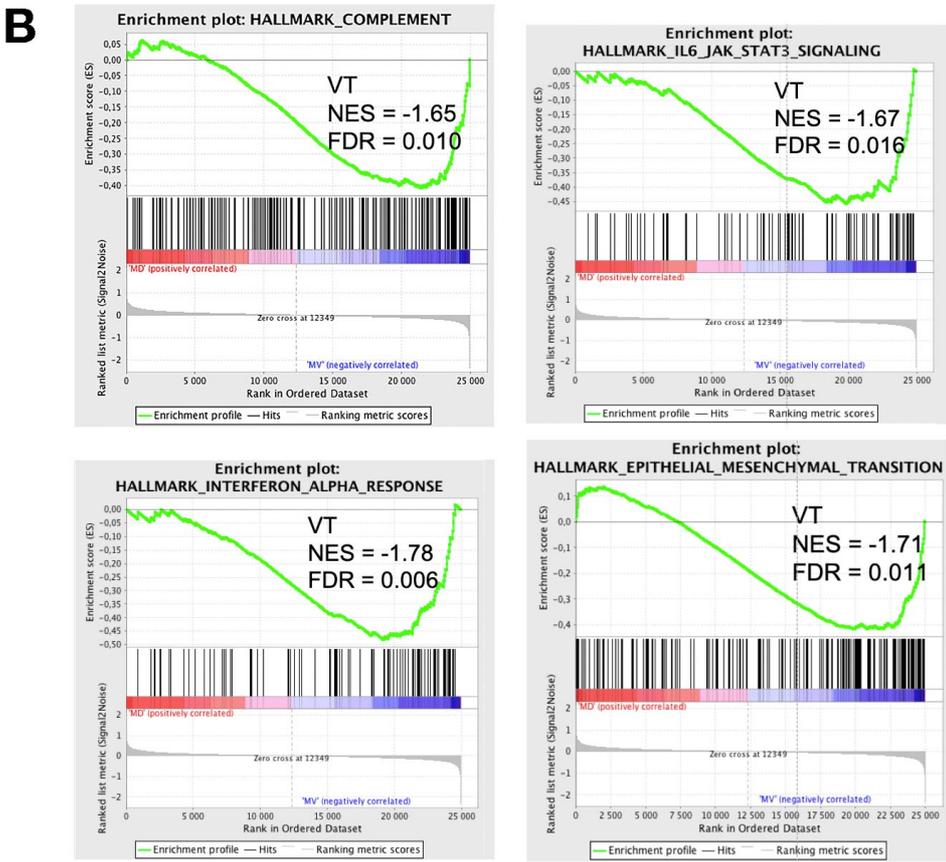
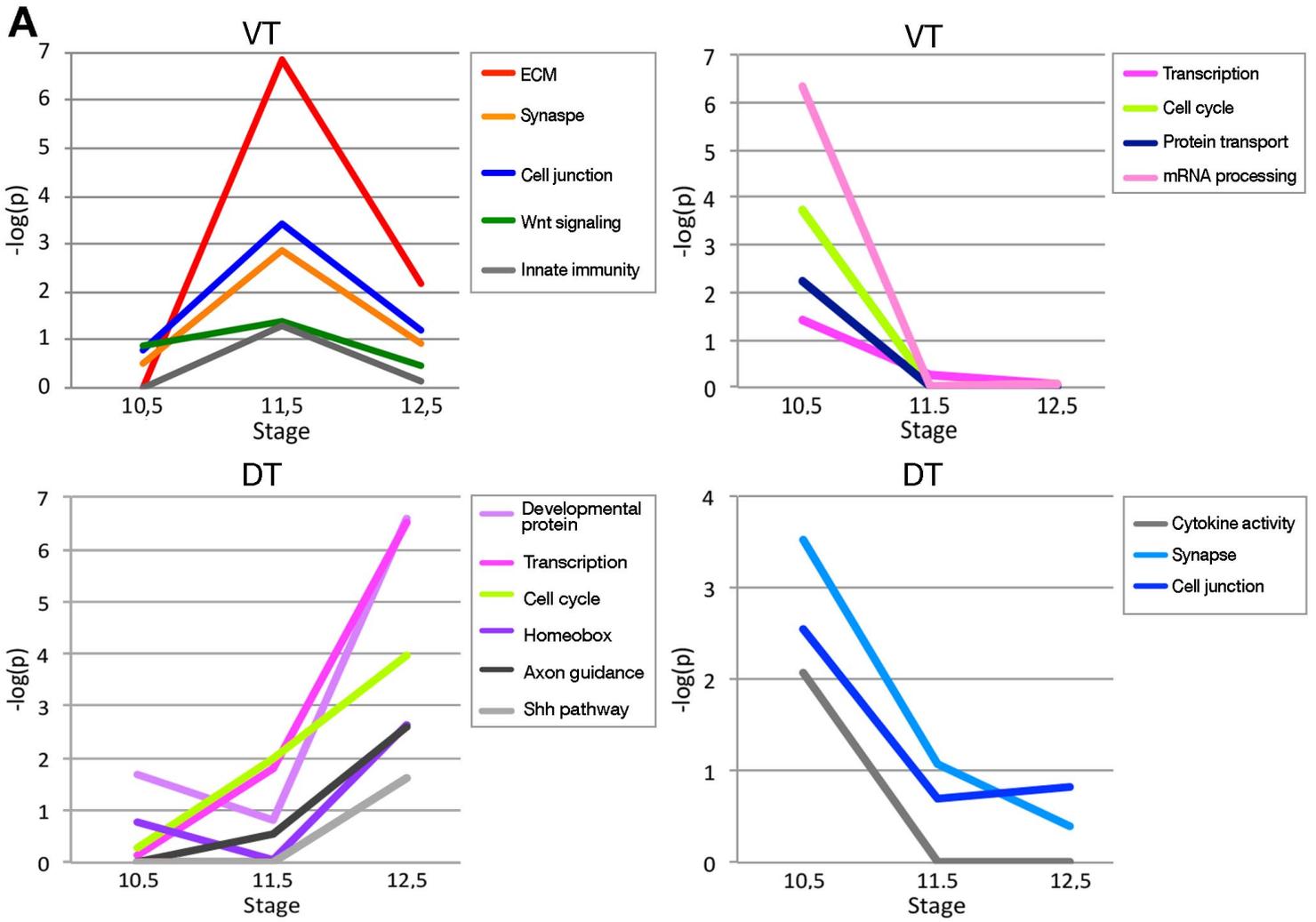


Figure 03

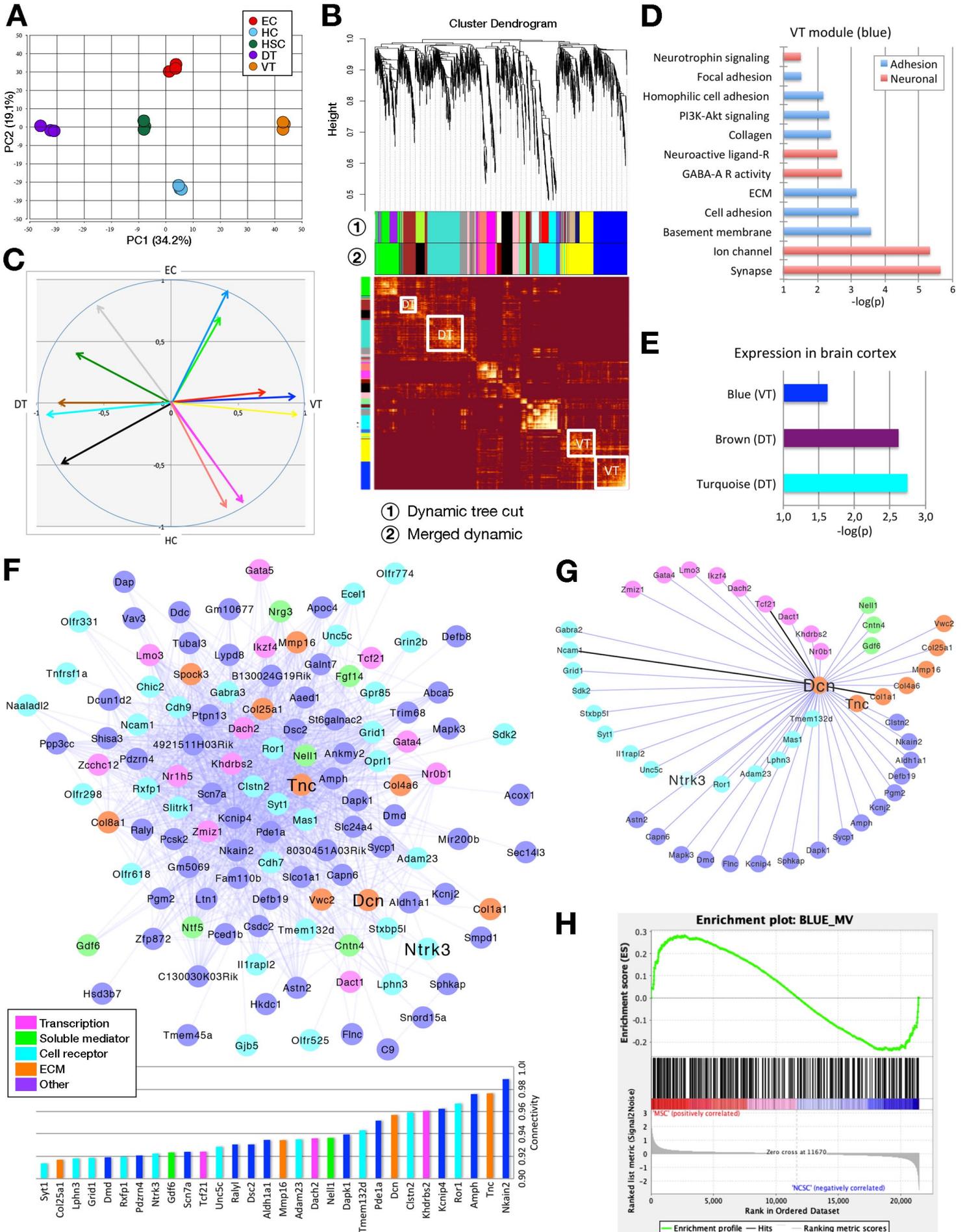


Figure 04

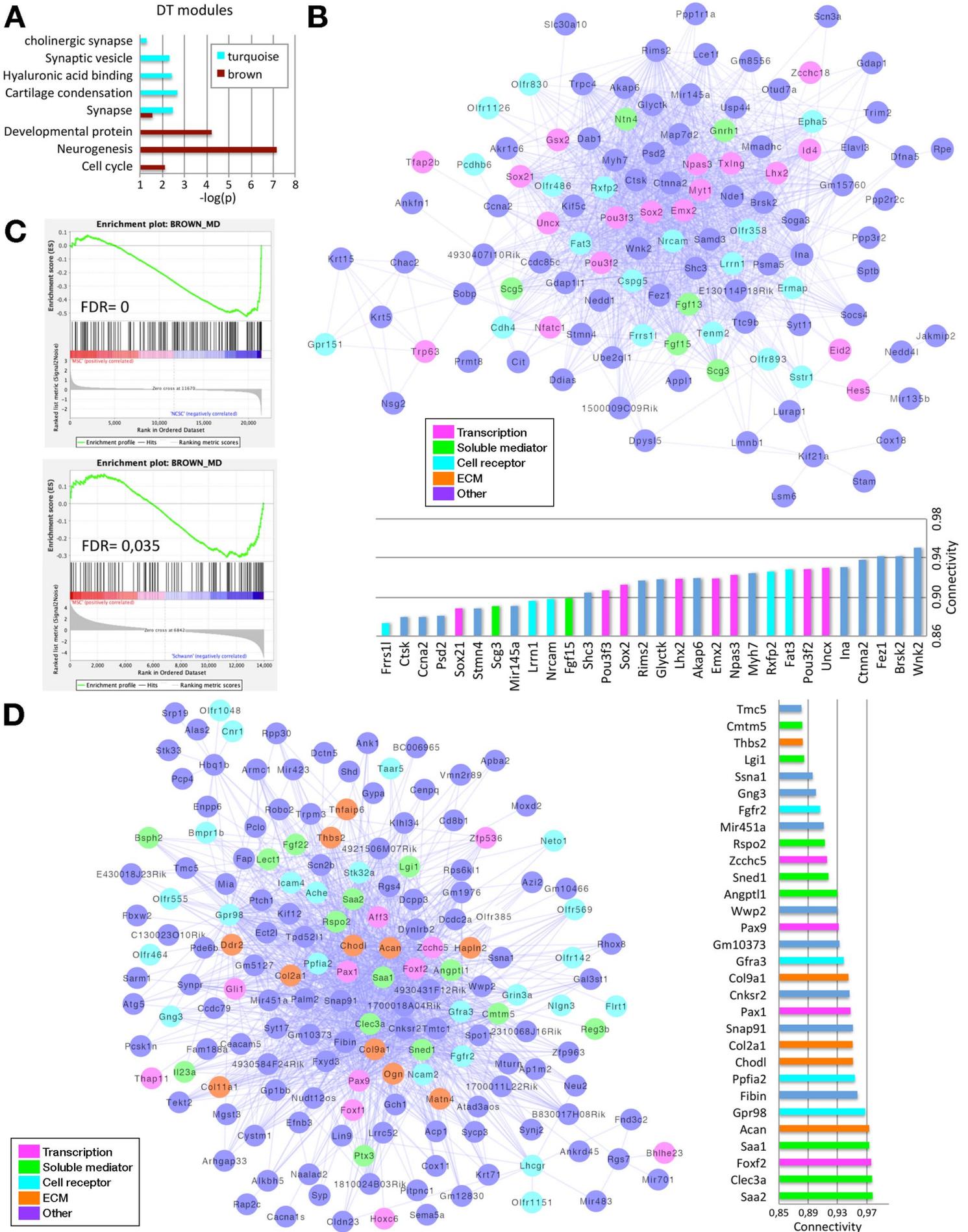


Figure 05

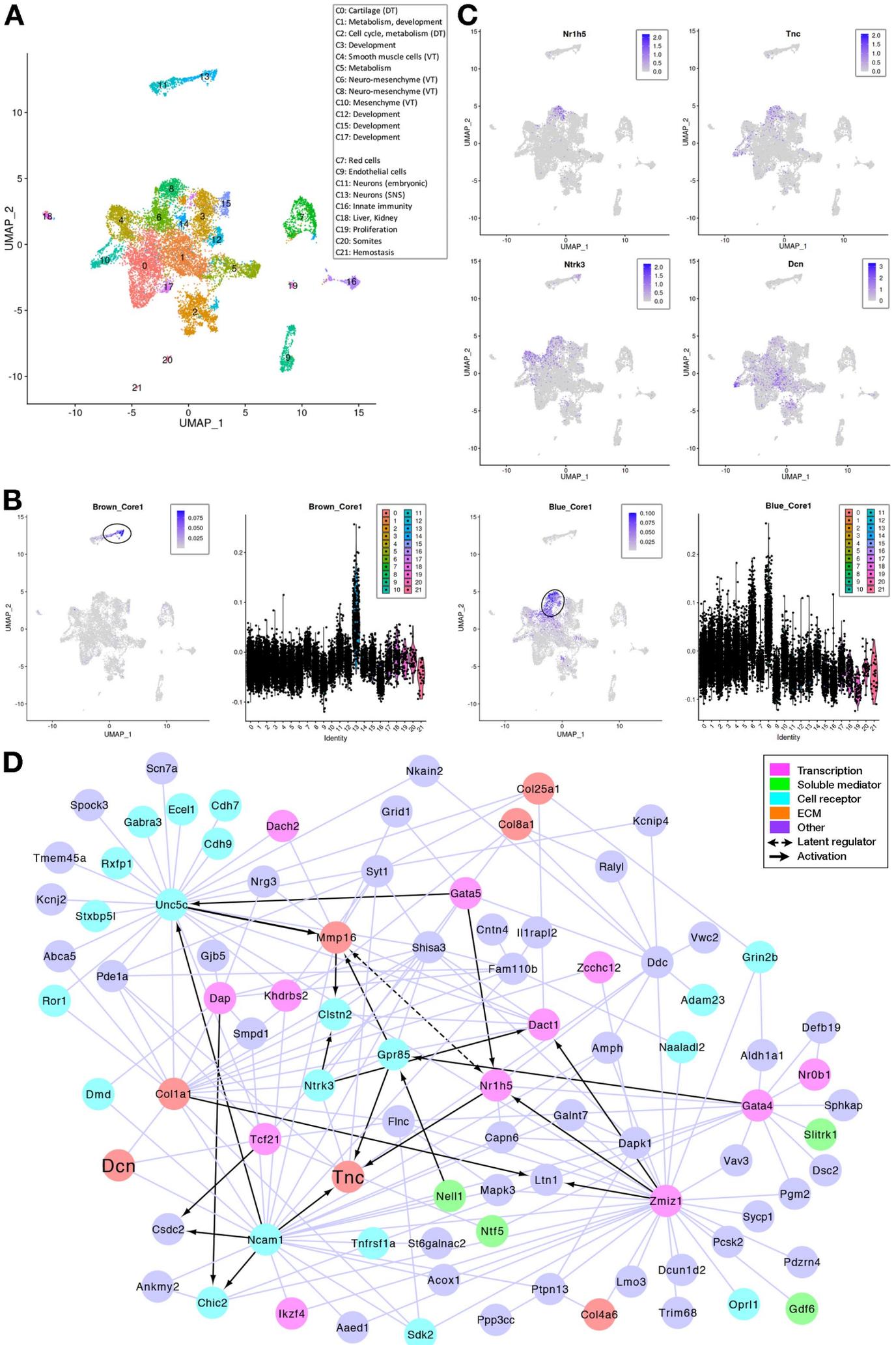


Figure 06

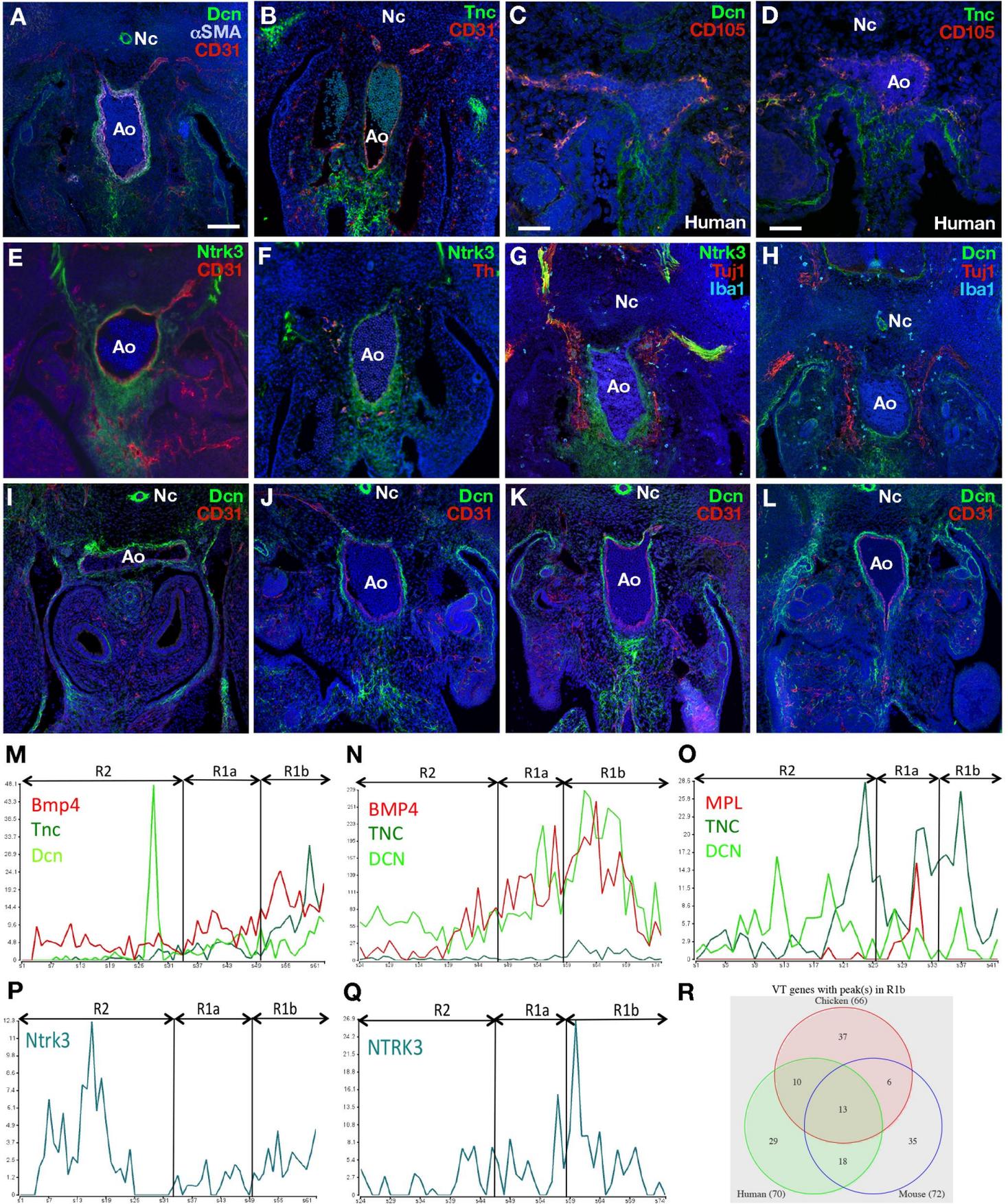


Figure 07

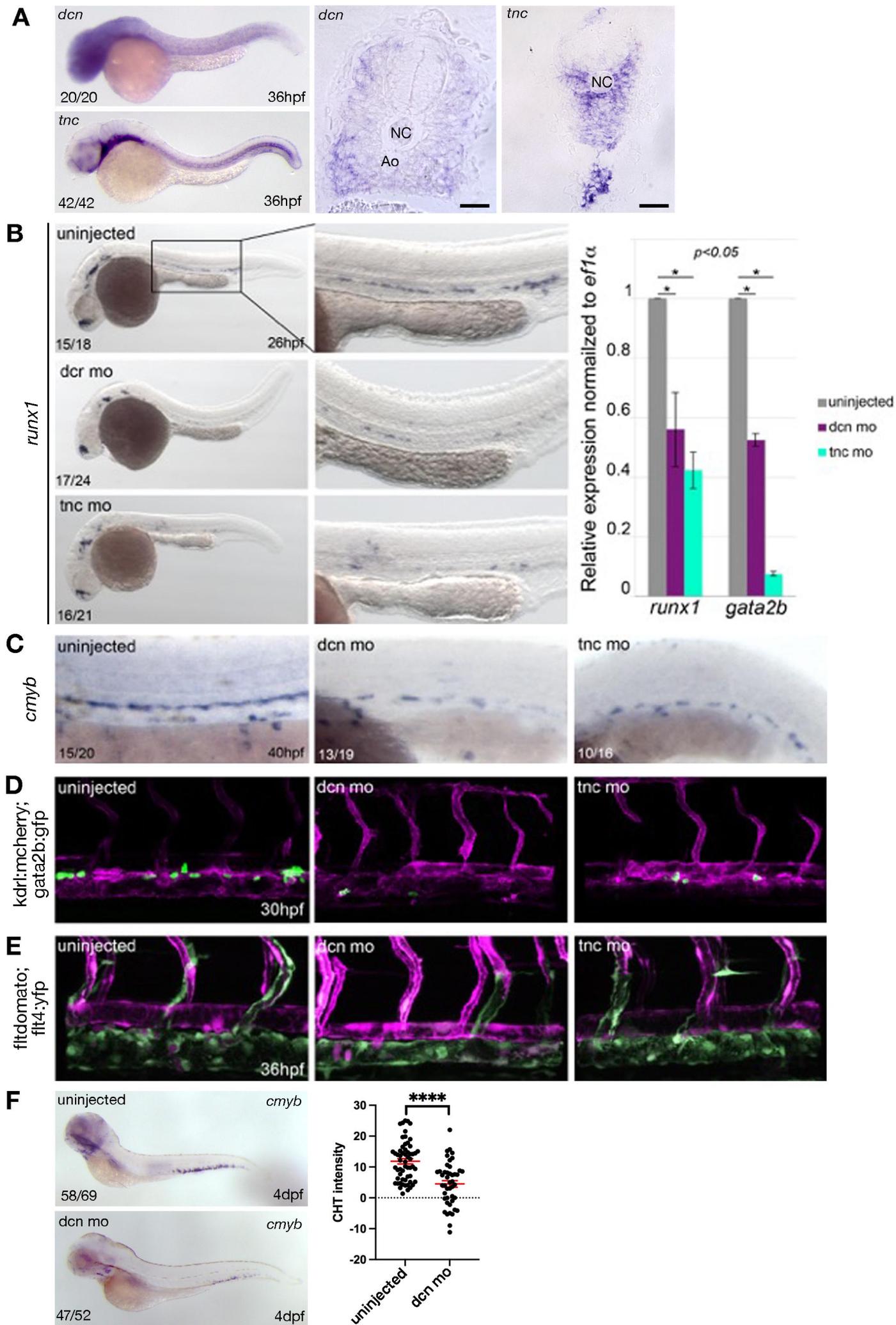


Figure S1

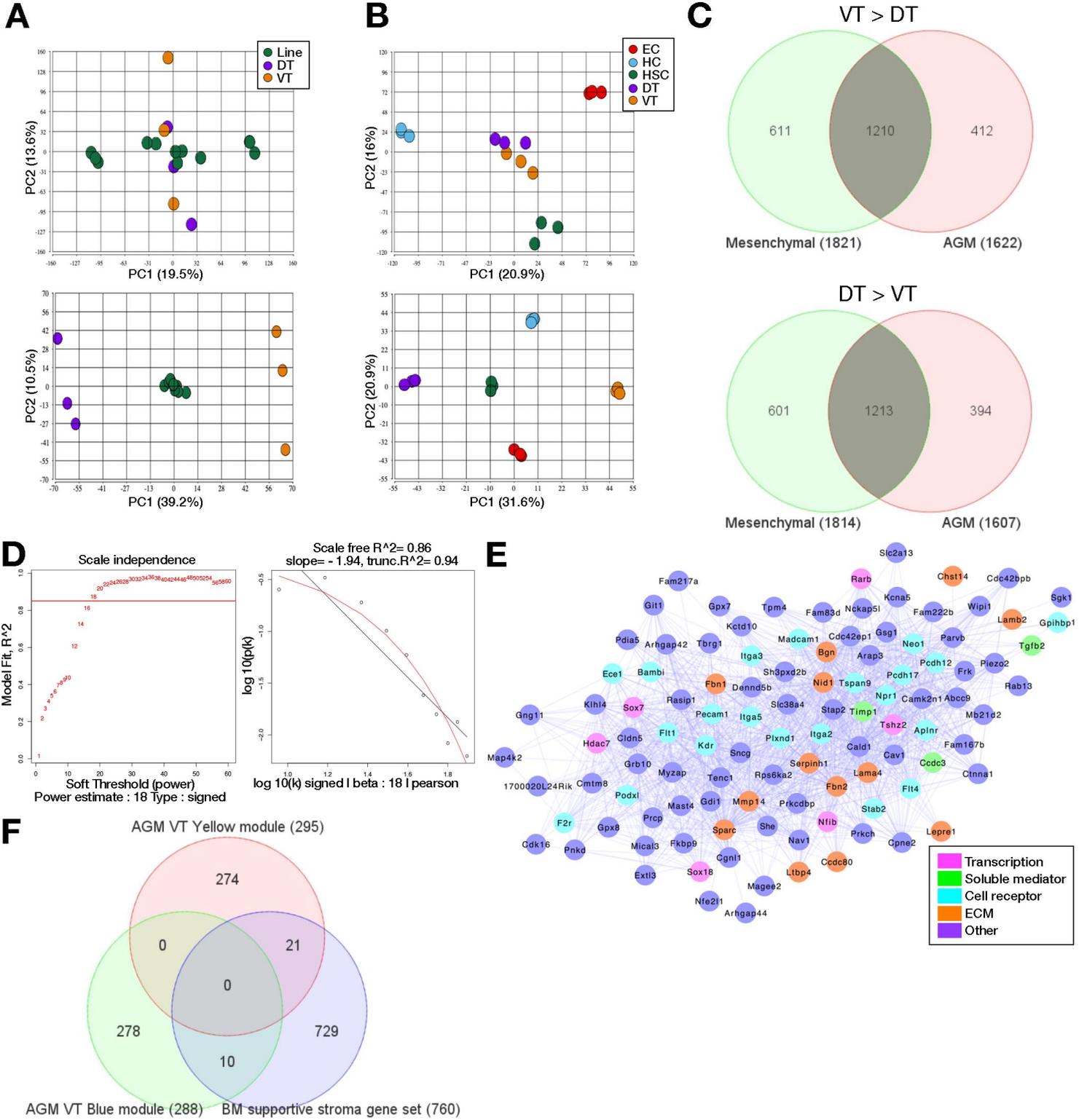
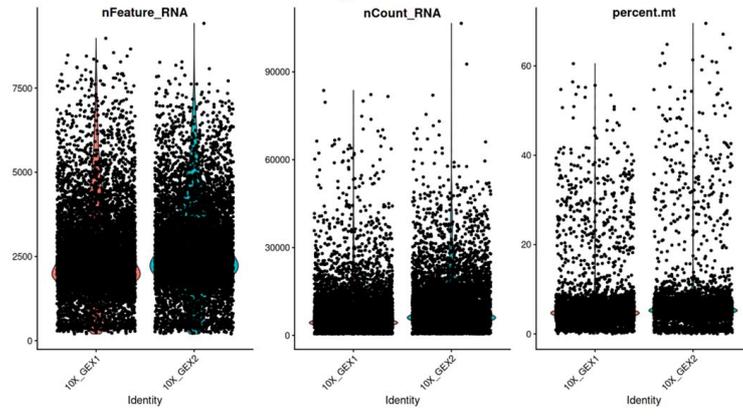
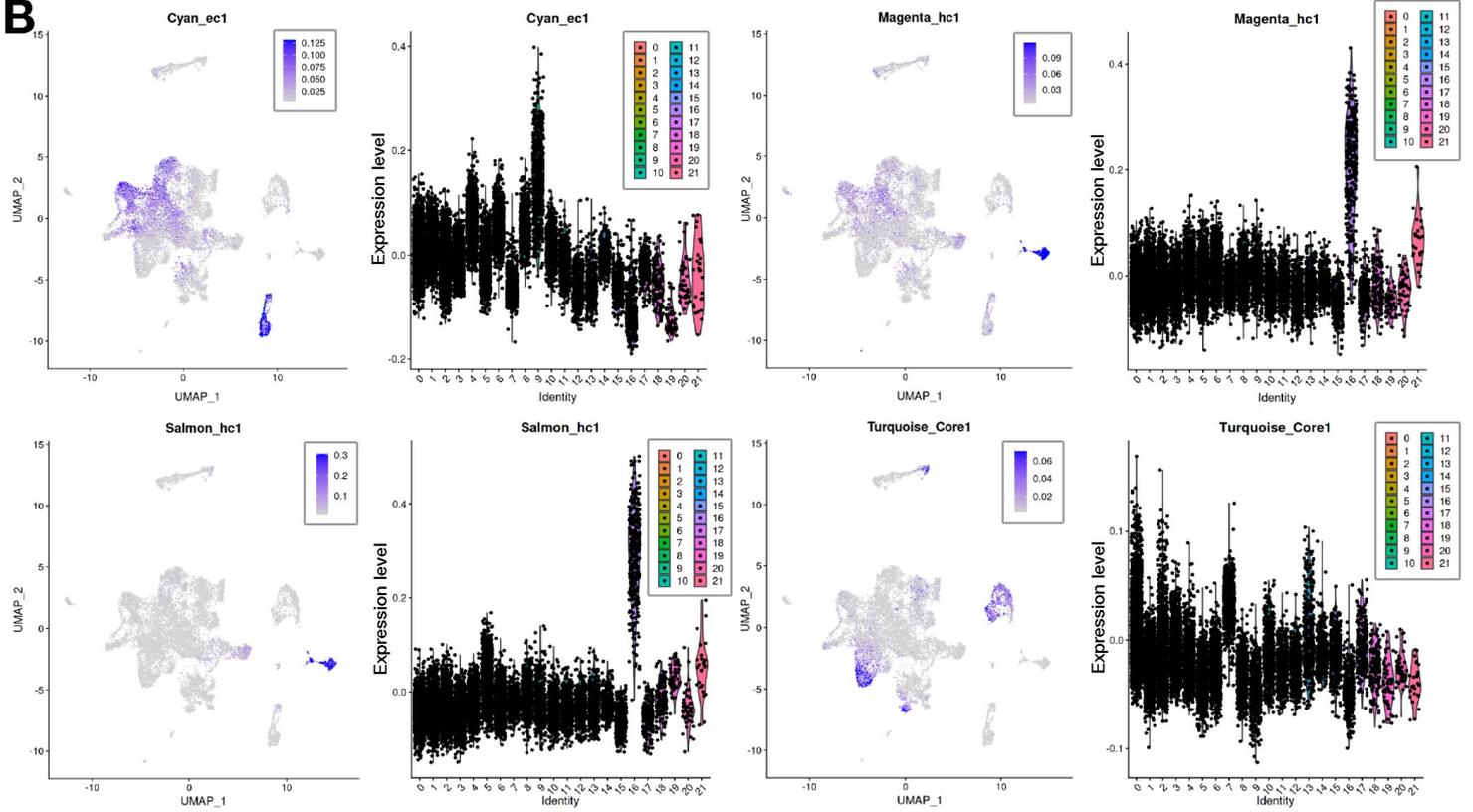


Figure S2

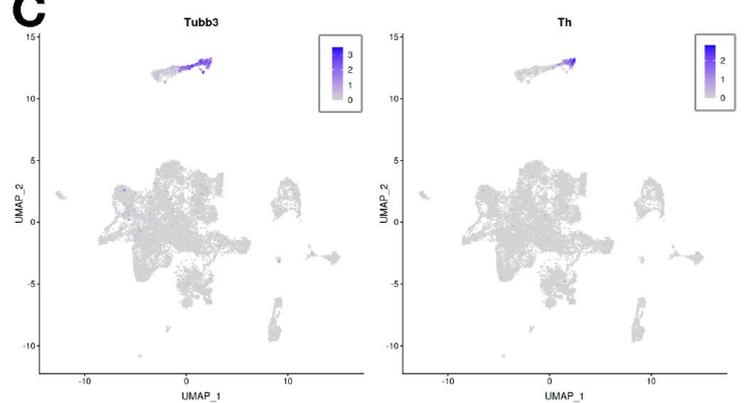
**A**



**B**



**C**



**D**

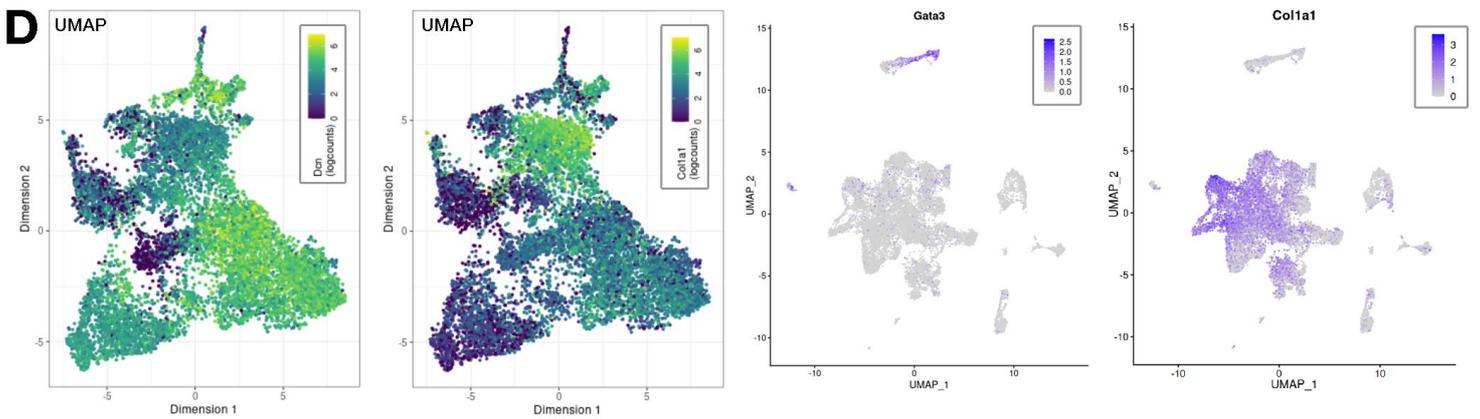


Figure S3

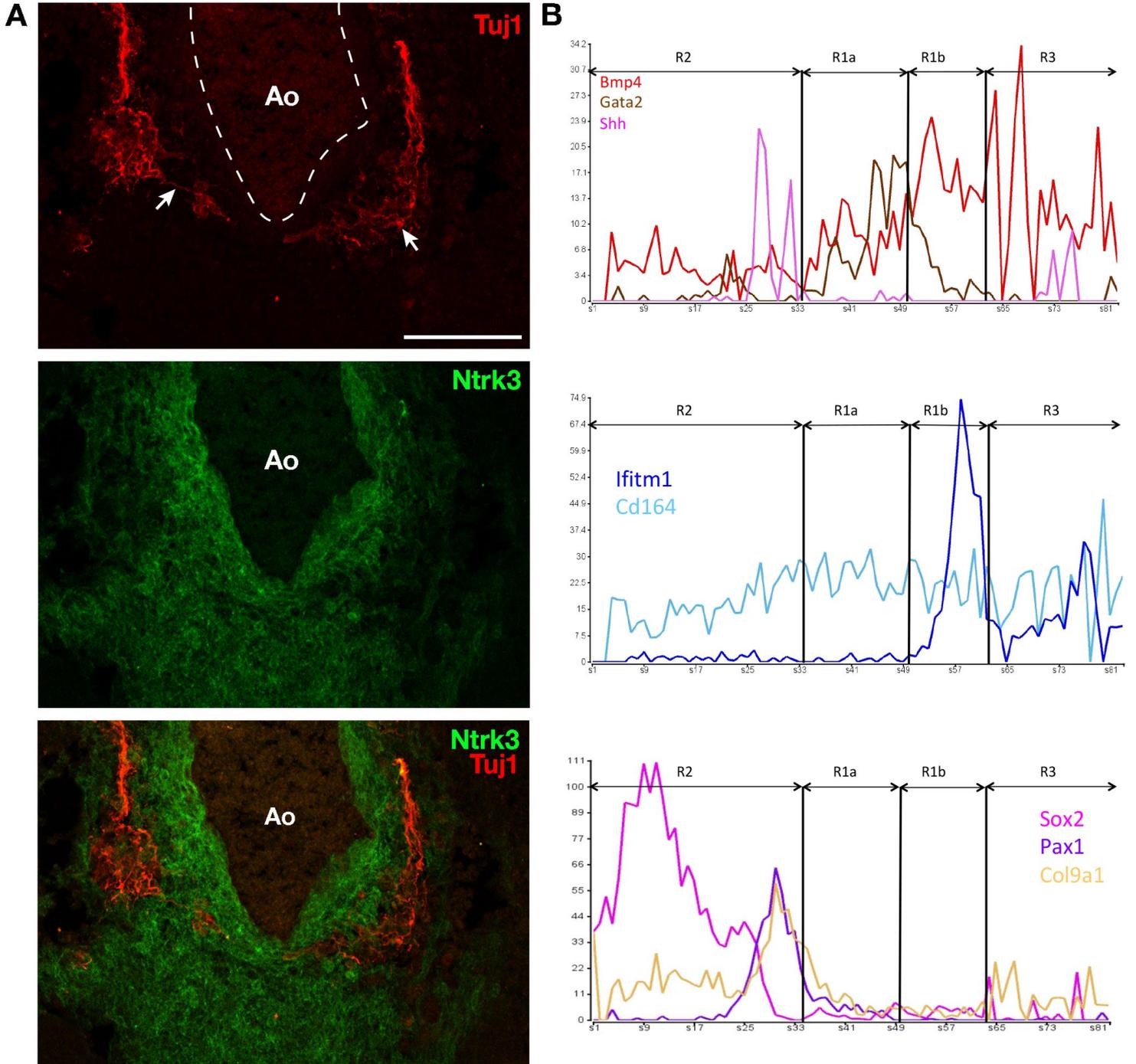


Figure S4

