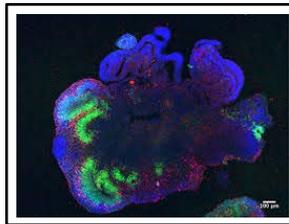
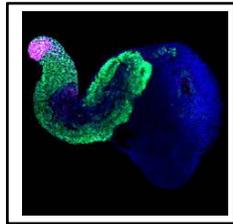


*Denis Duboule*

Collège de France  
Chaire: *Evolution des Génomes et du Développement*  
[Denis.Duboule@college-de-france.fr](mailto:Denis.Duboule@college-de-france.fr)



 @Duboule  
 @CdF1530

Collège de France  
Chaire: *Evolution des Génomes et du Développement*  
[Denis.Duboule@college-de-france.fr](mailto:Denis.Duboule@college-de-france.fr)

2018-2019  
*Organoïdes, embryoides: de cultures en trois dimensions aux modèles de développement et de pathologie*

*Cours 5*  
*4 juin 2019*

*Résumé de l'épisode précédent*  
*Organoïdes hépatiques murins*  
*'Tumeroïdes' de foie*  
*Organoïdes d'hépatocytes murins et humains*  
*Organoïdes d'hépatocytes à partir de cellules iPS humaines*  
*Syndrome d'Alagille*

## Résumé de l'épisode précédent (4/6)



\*Rappel sur l'utilisation possible des organoïdes intestinaux humains pour étudier des pathologies (colon, œsophage de Barret)

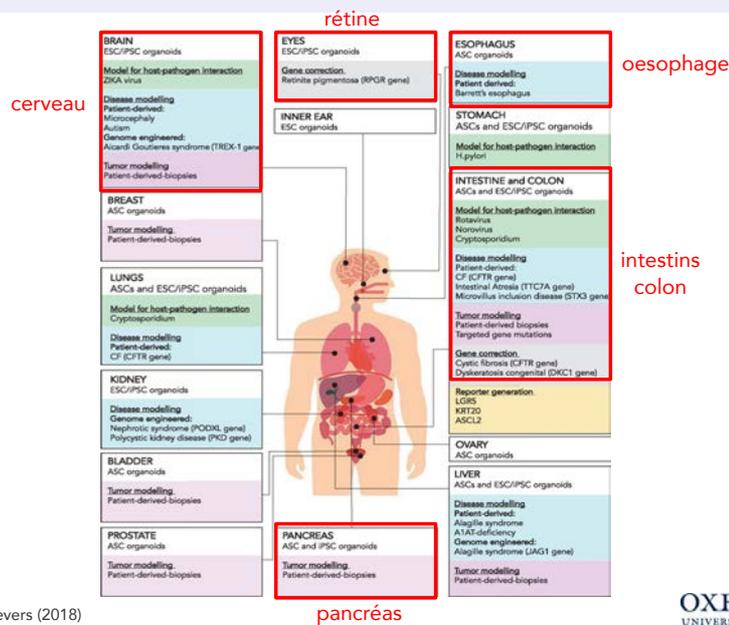
\*Mini-cerveaux, méthodes

\*Efforts de standardisation, reproductibilité..

\*Utilisation pour l'étude de pathologies (microcéphalie, cancers)

\*Développement d'un 'cerveau' in vitro? Fantasme ou réalité?

## Organoïdes: Recherches récentes



Artegiani and Clevers (2018)

Human Molecular Genetics, Volume 27, Issue R2, 01 August 2018, Pages R99–R107, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy187>

OXFORD  
UNIVERSITY PRESS

# Les organoïdes (cérébraux) ne sont pas des (cerveaux)..



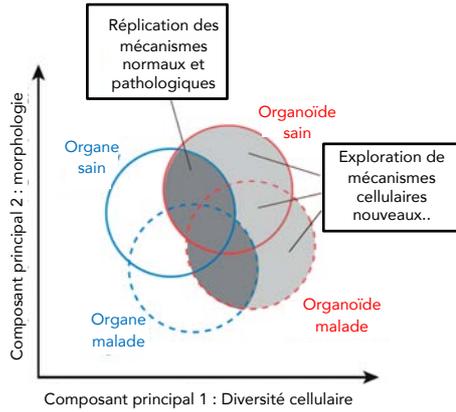
© 2018. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2018) 145, dev172049. doi:10.1242/dev.172049



## SPOTLIGHT

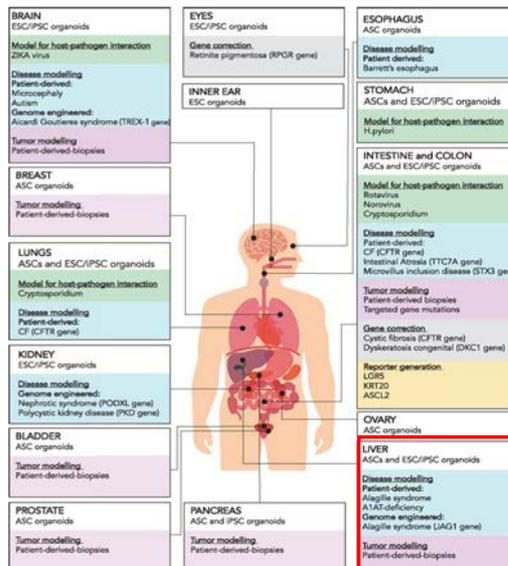
### Exploring landscapes of brain morphogenesis with organoids

Denis Jabaudon<sup>1,2,\*</sup> and Madeline Lancaster<sup>3,\*</sup>



\*Les organoïdes permettent de récapituler des conditions normales difficilement accessibles, mais également d'étudier des mécanismes qui leurs sont propres et qui peuvent révéler des comportements cellulaires inattendus

# Organoïdes: Recherches récentes



organoïdes hépatiques

Artegiani and Clevers (2018)

Human Molecular Genetics, Volume 27, Issue R2, 01 August 2018, Pages R99–R107, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy187>



## Organoïdes

### Organoïdes de foie

- \*Production chez la souris et les humains
- \*Tumouroïdes
- \*Expansion à long terme des hépatocytes (régénération)
- \*Syndrome génétique (Alagille ALGS)

## Le foie

\*Le foie est une glande amphicrine (à la fois exocrine et endocrine) aux fonctions multiples:

\*Fonction exocrine (production et sécrétion de la bile dans le duodénum par le canal (conduit) cholédoque)

\*Fonction de nutrition (production de glucose, de cholestérol, de triglycérides, glycogénolyse..)

\*Fonction de synthèse (synthèse de la bile à partir du cholestérol)

\*Fonction sanguine (production des facteurs de coagulation, nettoyage du sang..)

\*Fonction endocrine (vitamine D..)

\*Fonction antitoxique (destruction des toxines –clairance hépatique-, transformation de l'ammoniac en urée..)

\*Fonction de stockage (Vitamine B12, Fe, Cu..)

## Régénération du foie



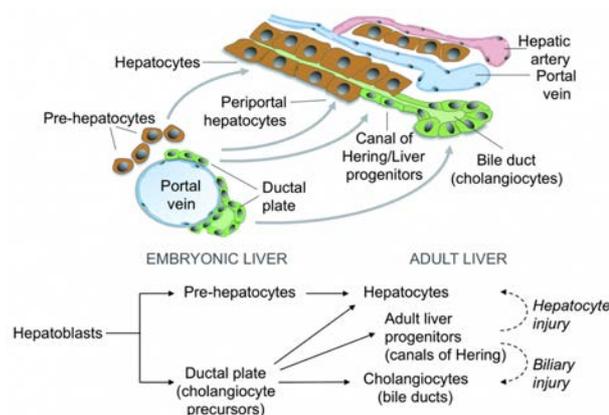
\*Le foie peut régénérer après une hépatectomie partielle (2/3..) ou des attaques chimiques ou des infections virales.

\*Après une hépatectomie, la régénération semble se faire par une réactivation mitotique rapide des hépatocytes sans apparente différenciation, un retour vers un état de cellules progéniteurs.

\*Dans le cas d'une infection virale chronique ou d'une exposition à un agent chimique, de petites 'cellules ovales' localisées proches des voies biliaires sont alors mobilisées (qui pourraient être des cellules souches pour les hépatocytes et les cholangiocytes –les cellules épithéliales du canal biliaire-).

\*La régénération par les hépatocytes semble être la voie majeure mais démonstration récente que les 'cellules ovales' peuvent être impliquées et qu'elles dérivent de cholangiocytes.

## Développement et régénération du foie

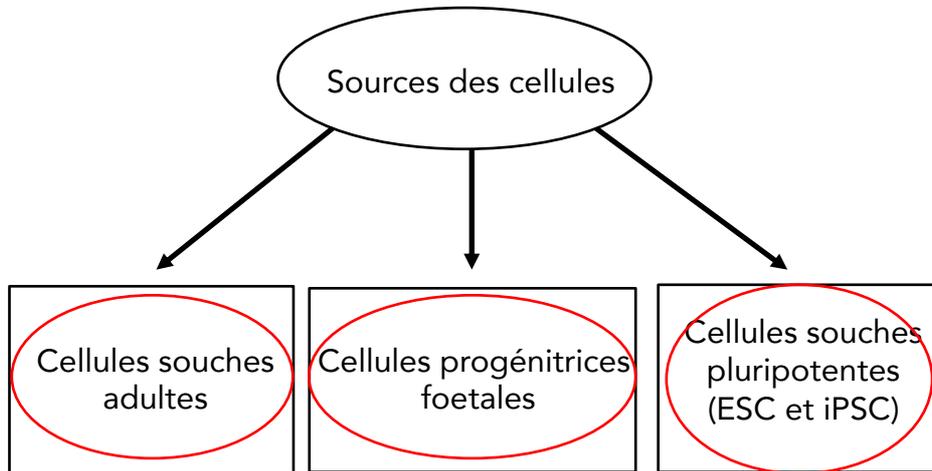


Tiré de: <https://www.deduveinstitute.be/fr/differentiation>

## Organoïdes: Origine cellulaire et production



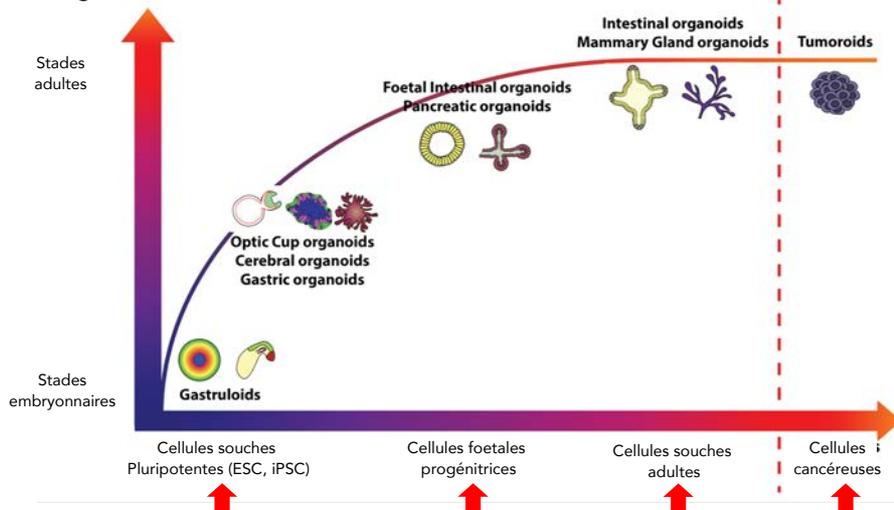
Origine des cellules



## Organoïdes: Origine cellulaire et production



Origine des cellules

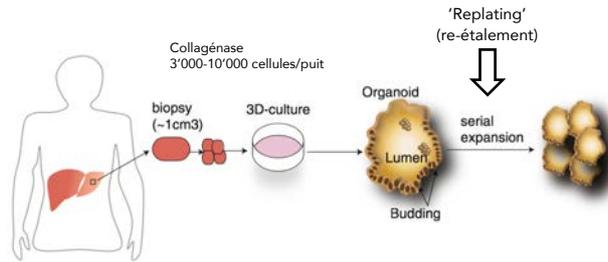


Rossi et al., (2018) Nat. Rev. Genetics

**Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver**

Meritxell Huch,<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup> Helmut Gehart,<sup>1,2</sup> Ruben van Boxtel,<sup>1,2</sup> Karlen Hamer,<sup>1</sup> Francis Blokzijl,<sup>1</sup> Monique M.A. Versteeg,<sup>1</sup> Ewa Ellis,<sup>1</sup> Martien van Werum,<sup>1</sup> Sabine A. Fuchs,<sup>1</sup> Joep de Lig,<sup>1</sup> Marc van de Wetering,<sup>1,2</sup> Nobuo Sasaki,<sup>1</sup> Susanne J. Boers,<sup>1</sup> Hans Kempferman,<sup>1</sup> Jeroen de Jonge,<sup>1</sup> Jan N.M. Ijzermans,<sup>1</sup> Edward E.S. Neuwirthuis,<sup>1</sup> Ruudtje Hoekstra,<sup>1</sup> Stephen Strom,<sup>1</sup> Robert R.G. Vries,<sup>1,2</sup> Luc J.W. van der Laan,<sup>1</sup> Edwin Cuppen,<sup>1</sup> and Hans Clevers<sup>1,2</sup>

Origine cellules adultes



**Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver**

Meritxell Huch,<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup> Helmut Gehart,<sup>1,2</sup> Ruben van Boxtel,<sup>1,2</sup> Karlen Hamer,<sup>1</sup> Francis Blokzijl,<sup>1</sup> Monique M.A. Versteeg,<sup>1</sup> Ewa Ellis,<sup>1</sup> Martien van Werum,<sup>1</sup> Sabine A. Fuchs,<sup>1</sup> Joep de Lig,<sup>1</sup> Marc van de Wetering,<sup>1,2</sup> Nobuo Sasaki,<sup>1</sup> Susanne J. Boers,<sup>1</sup> Hans Kempferman,<sup>1</sup> Jeroen de Jonge,<sup>1</sup> Jan N.M. Ijzermans,<sup>1</sup> Edward E.S. Neuwirthuis,<sup>1</sup> Ruudtje Hoekstra,<sup>1</sup> Stephen Strom,<sup>1</sup> Robert R.G. Vries,<sup>1,2</sup> Luc J.W. van der Laan,<sup>1</sup> Edwin Cuppen,<sup>1</sup> and Hans Clevers<sup>1,2</sup>

**Human Liver Organoid Culture**

Liver biopsies (0.5–1 cm<sup>3</sup>) were obtained from donor and explant livers during liver transplantation performed at the Erasmus MC, Rotterdam. The Medical Ethical Council of the Erasmus Medical Center approved the use of this material for research purposes, and informed consent was provided from all patients. For EpCAM sorting experiments and hepatocyte isolation, primary human liver tissue was obtained with informed consent and approval by the Regional Ethics Board, from the CLINTEC division of Karolinska institute (Dnr: 2010/678-31/3) (Jorns et al., 2014). Liver cells were isolated from human liver biopsies (0.5–1 cm<sup>3</sup>) by collagenase-accutase digestion, as described in the [Extended Experimental Procedures](#). The different fractions were mixed and washed with cold Advanced DMEM/F12 and spun at 300–400 × g for 5 min. The cell pellet was mixed with Matrigel (BD Biosciences) or reduced growth factor BME 2 (Basement Membrane Extract, Type 2, Pathclear), and 3,000–10,000 cells were seeded per well in a 48-well/plate. Non-attaching plates were used (Greiner). After Matrigel or BME had solidified, culture medium was added. Culture media was based on AdDMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 1% N2 and 1% B27 (both from GIBCO), 1.25 mM N-Acetylcysteine (Sigma), 10 nM gastrin (Sigma), and the growth factors: 50 ng/ml EGF (Peprotech), 10% RSPO1 conditioned media (homemade), 100 ng/ml FGF10 (Peprotech), 25 ng/ml HGF (Peprotech), 10 mM Nicotinamide (Sigma), 5 μM A83.01 (Tocris), and 10 μM FSK (Tocris). For the establishment of the culture, the first 3 days after isolation, the medium was supplemented with 25 ng/ml Noggin (Peprotech), 30% Wnt CM (homemade prepared as described in [Barker et al. \[2010\]](#)), and 10 μM (Y27632, Sigma Aldrich) or hES cell cloning recovery solution (Stemgent). Then, the medium was changed into a medium without Noggin, Wnt, Y27632, hES cell cloning recovery solution. After 10–14 days, organoids were removed from the Matrigel or BME, mechanically dissociated into small fragments, and transferred to fresh matrix. Passage was performed in a 1:4–1:8 split ratio once every 7–10 days for at least 6 months. To prepare frozen stocks, organoid

- Biopsie →
- Digestion enzymatique →
- Matrigel →
- 3000-10000 cellules →
- Milieu avec:
  - Gastrin
  - EGF
  - Hgf
  - A83.01 (Tgfbeta inhibiteur)
  - Fsk (augmente le cAMP)
  - Noggin
  - Wnt (milieu conditionné)
- Enlevé du matrigel et mis sur de la matrice fraîche →
- Passages jusqu'à 6 mois min. →



# Organoïdes de foie (étude initiale)



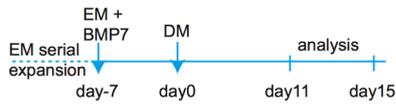
Article (2015)

Cell

## Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver

Mertzelig Huch,<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Helmut Gehart,<sup>1,2</sup> Ruben van Boxtel,<sup>1,2</sup> Karlien Hamer,<sup>1</sup> Francis Blokzijl,<sup>1</sup> Monique M.A. Versteeg,<sup>2</sup> Ewa Ellis,<sup>1</sup> Martien van Wierum,<sup>1</sup> Sabine A. Fuchs,<sup>1</sup> Joep de Ligt,<sup>1</sup> Marc van de Wetering,<sup>1,2</sup> Nobuo Sasaki,<sup>1</sup> Suzanne J. Boers,<sup>1</sup> Hans Kemperman,<sup>1</sup> Jeroen de Jonge,<sup>1</sup> Jan N.M. Gijzen,<sup>1</sup> Edward E.S. Meuwissen,<sup>1</sup> Ruudtje Hoekstra,<sup>1</sup> Stephen Storm,<sup>1</sup> Robert R.G. Wires,<sup>1</sup> Luc J.W. van der Laan,<sup>1</sup> Edwin Cuppen,<sup>1</sup> and Hans Clevers<sup>1,2</sup>

Les organoïdes n'expriment pas d'ARNs marqueurs des hépatocytes



Les cellules EpCAM+ se différencient en cellules progénitrices bipotentes qui peuvent être gardées pendant des mois en cystes. En enlevant des stimuli de croissance (Fsk, R-spondin), les cellules 'repartent' vers un destin 'biliaire'. Mais si Notch est bloqué et en présence de BMP7, Fgf19 et dexaméthasone, les cellules se différencient en hépatocytes

# Organoïdes de foie (étude initiale)

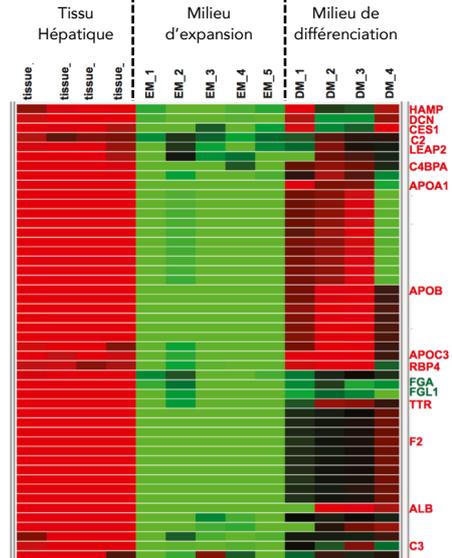
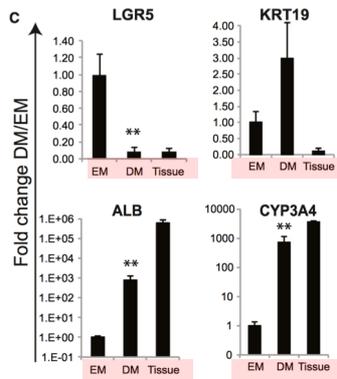


Article (2015)

Cell

## Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver

Mertzelig Huch,<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Helmut Gehart,<sup>1,2</sup> Ruben van Boxtel,<sup>1,2</sup> Karlien Hamer,<sup>1</sup> Francis Blokzijl,<sup>1</sup> Monique M.A. Versteeg,<sup>2</sup> Ewa Ellis,<sup>1</sup> Martien van Wierum,<sup>1</sup> Sabine A. Fuchs,<sup>1</sup> Joep de Ligt,<sup>1</sup> Marc van de Wetering,<sup>1,2</sup> Nobuo Sasaki,<sup>1</sup> Suzanne J. Boers,<sup>1</sup> Hans Kemperman,<sup>1</sup> Jeroen de Jonge,<sup>1</sup> Jan N.M. Gijzen,<sup>1</sup> Edward E.S. Meuwissen,<sup>1</sup> Ruudtje Hoekstra,<sup>1</sup> Stephen Storm,<sup>1</sup> Robert R.G. Wires,<sup>1</sup> Luc J.W. van der Laan,<sup>1</sup> Edwin Cuppen,<sup>1</sup> and Hans Clevers<sup>1,2</sup>



## Organoïdes de foie (Tumeuroïdes)



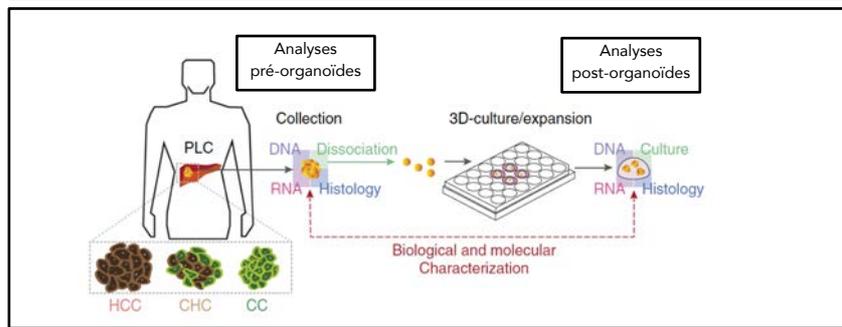
ARTICLES (2017)

nature  
medicine

### Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening

Laura Broutier<sup>1</sup>, Gianmarco Mastrogiovanni<sup>1,2,10</sup>, Monique MA Verstege<sup>3,10</sup>, Hayley E Francies<sup>4,10</sup>, Lena Morrill Gavarro<sup>5</sup>, Charles R Bradshaw<sup>1</sup>, George E Allen<sup>1</sup>, Robert Arnes-Benito<sup>1</sup>, Olga Sidorova<sup>1</sup>, Marcia P Gasperz<sup>3</sup>, Nikitas Georgakopoulos<sup>5</sup>, Bon-Kyoung Koo<sup>2</sup>, Sabine Dietmann<sup>2</sup>, Susan E Davies<sup>6</sup>, Rajaj K Prasadom<sup>3</sup>, Ruby Lieshout<sup>3</sup>, Jan N M IJzermans<sup>3</sup>, Stephen J Wigmore<sup>8</sup>, Kourosh Saeb-Parsy<sup>5</sup>, Mathew J Garnett<sup>4</sup>, Luc JW van der Laan<sup>9</sup> & Meritxell Huch<sup>1-2,9</sup>

HCC: Carcinome hépatocellulaire (hépatocarcinome; 500'000 cas/an, 5<sup>ème</sup> cancer, hépatite B et C)  
CC : Cholangiocarcinome (épithélium des voies biliaires)  
CHC: Hépatocarcinome et cholangiocarcinome combinés



## Organoïdes de foie (Tumeuroïdes)

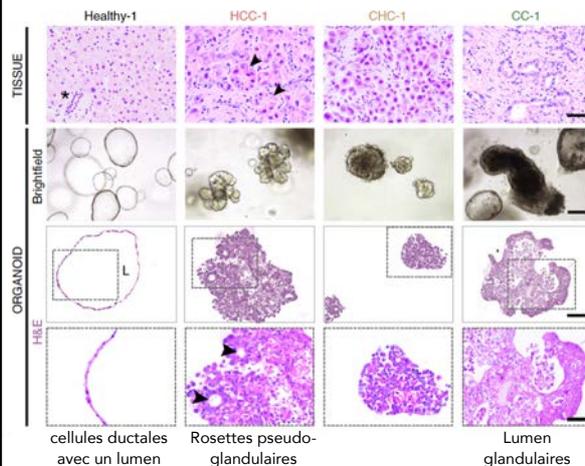


ARTICLES  
Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening

Laura Broutier<sup>1</sup>, Gianmarco Mastrogiovanni<sup>1,2,10</sup>, Monique MA Verstege<sup>3,10</sup>, Hayley E Francies<sup>4,10</sup>, Lena Morrill Gavarro<sup>5</sup>, Charles R Bradshaw<sup>1</sup>, George E Allen<sup>1</sup>, Robert Arnes-Benito<sup>1</sup>, Olga Sidorova<sup>1</sup>, Marcia P Gasperz<sup>3</sup>, Nikitas Georgakopoulos<sup>5</sup>, Bon-Kyoung Koo<sup>2</sup>, Sabine Dietmann<sup>2</sup>, Susan E Davies<sup>6</sup>, Rajaj K Prasadom<sup>3</sup>, Ruby Lieshout<sup>3</sup>, Jan N M IJzermans<sup>3</sup>, Stephen J Wigmore<sup>8</sup>, Kourosh Saeb-Parsy<sup>5</sup>, Mathew J Garnett<sup>4</sup>, Luc JW van der Laan<sup>9</sup> & Meritxell Huch<sup>1-2,9</sup>

Les organoïdes tumoraux conservent les caractéristiques des tumeurs de départ

HCC: Hépatocarcinome  
CC : Cholangiocarcinome  
CHC: Hépatocarcinome et cholangiocarcinome combinés



Using this novel protocol, we successfully established human PLC-derived organoids from eight different patients with PLC, including poorly to moderately to well-differentiated HCC (n = 3) and CC (n = 3), and combined HCC/CC (CHC; n = 2) (Fig. 1, Supplementary Fig. 2a and Supplementary Table 1). We found a strong correlation between the derivation success rate (establishment) and the proliferation index of the original tumor. Thus, the efficiency of establishment of organoid cultures was 100% for those samples derived from tumors that contained >5% proliferating cells (n = 3 for HCC; n = 2 for CHC and n = 3 for CC), whereas we did not succeed in deriving organoids from very well-differentiated lesions, with <5% proliferative cells in the original samples (n = 8 for HCC and n = 1 for CC), in agreement with the histological grading of early HCCs<sup>5</sup>

Le succès de dérivation des tumeuroïdes dépend de l'index de prolifération des tumeurs de départ...

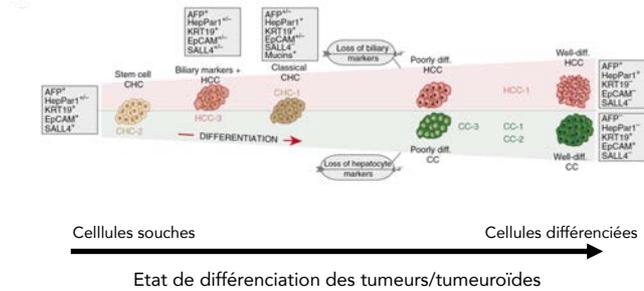
## Organoïdes de foie (Tumeroïdes)

**ARTICLES**  
**Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening**

Laura Boulter<sup>1</sup>\*, Giacomo Mastrogiovanni<sup>1,2,3</sup>, Montagu MA Verheijen<sup>1,2</sup>, Hayley E Francis<sup>1,2</sup>, Lena Morrell Garavito<sup>1</sup>, Charles B Bradshaw<sup>1</sup>, George E Alban<sup>1</sup>, Robert Arneson Restani<sup>1</sup>, Olga Nakou<sup>1</sup>, Manjia P Casperu<sup>1</sup>, Nikitas Georgakopoulos<sup>1</sup>, Ben-Kyung Koel<sup>1</sup>, Sabine Dietmann<sup>1</sup>, Susan E Davies<sup>1</sup>, Raul K Freudenheim<sup>1</sup>, Eder Lindauer<sup>1</sup>, Jan N M Diermans<sup>1</sup>, Stephen J Wigmore<sup>1</sup>, Konrad Sobk-Parys<sup>1</sup>, Mathew J Garnett<sup>1</sup>, Luc JW van der Laan<sup>1</sup> & Matthias Hack<sup>1,2,3</sup>\*

Les organoïdes tumoraux conservent les caractéristiques des tumeurs de départ incluant les marqueurs génétiques

HCC: Hépatocarcinome  
 CC : Cholangiocarcinome  
 CHC: Hépatocarcinome et cholangiocarcinome combinés



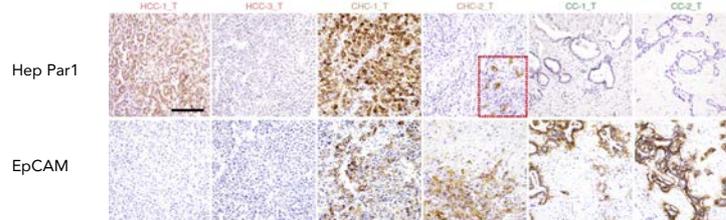
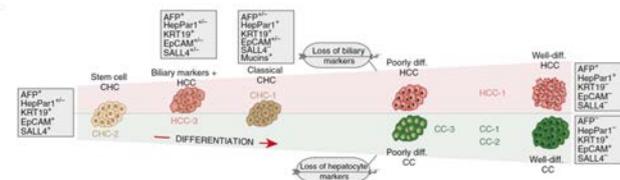
## Organoïdes de foie (Tumeroïdes)

**ARTICLES**  
**Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening**

Laura Boulter<sup>1</sup>\*, Giacomo Mastrogiovanni<sup>1,2,3</sup>, Montagu MA Verheijen<sup>1,2</sup>, Hayley E Francis<sup>1,2</sup>, Lena Morrell Garavito<sup>1</sup>, Charles B Bradshaw<sup>1</sup>, George E Alban<sup>1</sup>, Robert Arneson Restani<sup>1</sup>, Olga Nakou<sup>1</sup>, Manjia P Casperu<sup>1</sup>, Nikitas Georgakopoulos<sup>1</sup>, Ben-Kyung Koel<sup>1</sup>, Sabine Dietmann<sup>1</sup>, Susan E Davies<sup>1</sup>, Raul K Freudenheim<sup>1</sup>, Eder Lindauer<sup>1</sup>, Jan N M Diermans<sup>1</sup>, Stephen J Wigmore<sup>1</sup>, Konrad Sobk-Parys<sup>1</sup>, Mathew J Garnett<sup>1</sup>, Luc JW van der Laan<sup>1</sup> & Matthias Hack<sup>1,2,3</sup>\*

Les organoïdes tumoraux conservent les caractéristiques des tumeurs de départ incluant les marqueurs génétiques

HCC: Hépatocarcinome  
 CC : Cholangiocarcinome  
 CHC: Hépatocarcinome et cholangiocarcinome combinés



Hep Par1: anticorps monoclonal spécifique pour les hépatocarcinomes  
 EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

# Organoïdes de foie (Tumeroïdes)

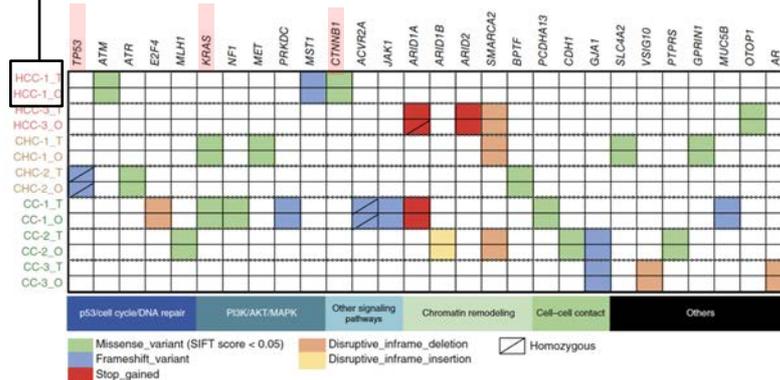


**ARTICLES**  
nature **medicine**  
Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening

Laura Brouha<sup>1,2</sup>, Gianmarco Mastrogiovanni<sup>1,2,3</sup>, Monique M.A. Versteeg<sup>1,2</sup>, Hayley E. Francis<sup>1,2</sup>, Lena Morfitt Garavito<sup>1</sup>, Charles R. Bradshaw<sup>1</sup>, George E. Allen<sup>1</sup>, Robert Arzoo Bantua<sup>1</sup>, Olga Sabinova<sup>1</sup>, Maria P. Casperu<sup>1</sup>, Nikita Georgakopoulos<sup>1</sup>, Ben-Kyung Koel<sup>1</sup>, Sabine Dietmann<sup>1</sup>, Susan E. Davies<sup>1</sup>, Raik K. Preussner<sup>1</sup>, Babu Lindeman<sup>1</sup>, Jan N.M. Diermanse<sup>1</sup>, Stephen J. Wigmore<sup>1</sup>, Koushik Sarkar<sup>1</sup>, Mathew J. Garnett<sup>1</sup>, Luc JW van der Laan<sup>1</sup> & Meritxell Huch<sup>1,2,3</sup>

Les organoïdes tumoraux conservent les caractéristiques des tumeurs de départ incluant les marqueurs génétiques

HCC-T : Tumeur de départ (Tissue)  
HCC-O : Tmeuroïde dérivé (Organoïde)



Les tmeuroïdes retiennent en cultures les mutations initialement présentes dans les sous-types de tumeurs de départ

# Organoïdes de foie (Tumeroïdes)

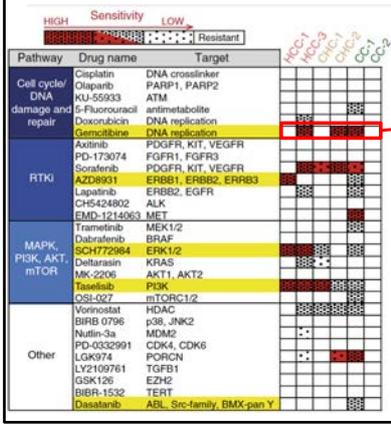


**ARTICLES**  
nature **medicine**  
Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening

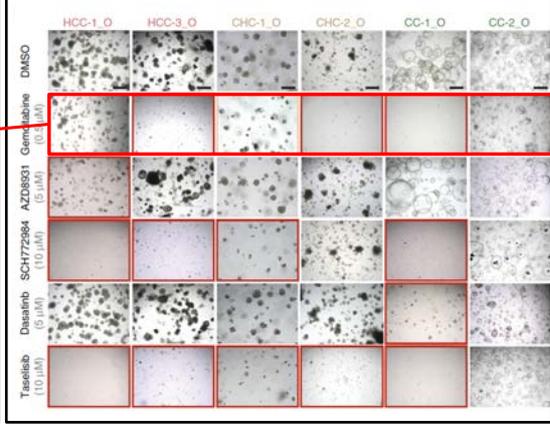
Laura Brouha<sup>1,2</sup>, Gianmarco Mastrogiovanni<sup>1,2,3</sup>, Monique M.A. Versteeg<sup>1,2</sup>, Hayley E. Francis<sup>1,2</sup>, Lena Morfitt Garavito<sup>1</sup>, Charles R. Bradshaw<sup>1</sup>, George E. Allen<sup>1</sup>, Robert Arzoo Bantua<sup>1</sup>, Olga Sabinova<sup>1</sup>, Maria P. Casperu<sup>1</sup>, Nikita Georgakopoulos<sup>1</sup>, Ben-Kyung Koel<sup>1</sup>, Sabine Dietmann<sup>1</sup>, Susan E. Davies<sup>1</sup>, Raik K. Preussner<sup>1</sup>, Babu Lindeman<sup>1</sup>, Jan N.M. Diermanse<sup>1</sup>, Stephen J. Wigmore<sup>1</sup>, Koushik Sarkar<sup>1</sup>, Mathew J. Garnett<sup>1</sup>, Luc JW van der Laan<sup>1</sup> & Meritxell Huch<sup>1,2,3</sup>

Conclusion: Les organoïdes tumoraux peuvent être utilisés comme un outils de recherches thérapeutiques

Tumeurs primaires: réponses aux drogues



Tmeuroïdes dérivés: réponses aux drogues



## Organoïdes de foie et régénération



Article (2018)

Cell

### Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids

Huli Hu,<sup>1,2</sup> Helmuth Gehart,<sup>1,11</sup> Benedetta Artergiani,<sup>1,11</sup> Carmen López-Iglesias,<sup>11</sup> Florijn Dekkers,<sup>1</sup> Onur Basak,<sup>1</sup> Johan van Es,<sup>1</sup> Susana M. Chaves de Sousa Lopes,<sup>1</sup> Harry Begthel,<sup>1</sup> Jeroen Korving,<sup>1</sup> Maaike van den Born,<sup>1</sup> Chenhui Zou,<sup>6,9</sup> Corinne Quirk,<sup>9</sup> Luis Chiriboga,<sup>10</sup> Charles M. Rice,<sup>7</sup> Stephanie Ma,<sup>7</sup> Anne Rios,<sup>8</sup> Peter J. Peters,<sup>2</sup> Ype P. de Jong,<sup>10</sup> and Hans Clevers<sup>1,3,4,12\*</sup>

\*Deux types de réponse aux dommages du foie. Une réponse impliquant les cellules ovales (organoïdes décrit précédemment) généralement suivant une infection, et une réponse proliférative des hépatocytes eux-mêmes lors d'un dommage aiguë, tel une hépatectomie partielle.

Reprogrammation des hépatocytes adultes en cellules progénitrices bipotentes est connue (trans-différenciation en cellules épithéliales de type cholangiocytes) mais impossibilité de garder et d'amplifier ces cellules...



\*Développement d'un protocole pour obtenir des hépatocytes à long terme, à partir d'hépatocyte(s), qui sont capables d'intégrer le foie d'une souris hôte.

#### SUMMARY

The mammalian liver possesses a remarkable regenerative ability. Two modes of damage response have been described: (1) The "oval cell" response emanates from the biliary tree when all hepatocytes are affected by chronic liver disease. (2) A massive, proliferative response of mature hepatocytes occurs upon acute liver damage such as partial hepatectomy (PHx). While the oval cell response has been captured *in vitro* by growing organoids from cholangiocytes, the hepatocyte proliferative response has not been recapitulated in culture. Here, we describe the establishment of a long-term 3D organoid culture system for mouse and human primary hepatocytes. Organoids can be established from single hepatocytes and grown for multiple months, while retaining key morphological, functional and gene expression features. Transcriptional profiles of the organoids resemble those of proliferating hepatocytes after PHx. Human hepatocyte organoids proliferate extensively after engraftment into mice and thus recapitulate the proliferative damage-response of hepatocytes.

## Organoïdes de foie (cultures d'hépatocytes à long terme)



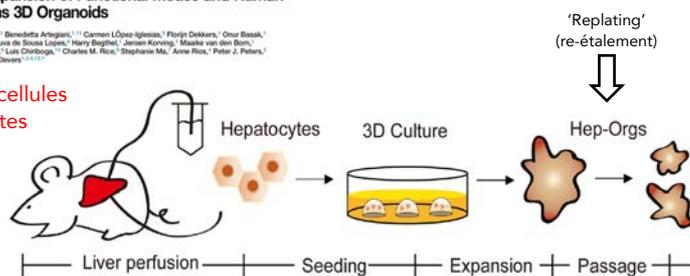
Article (2018)

Cell

### Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids

Huli Hu,<sup>1,2</sup> Helmuth Gehart,<sup>1,11</sup> Benedetta Artergiani,<sup>1,11</sup> Carmen López-Iglesias,<sup>11</sup> Florijn Dekkers,<sup>1</sup> Onur Basak,<sup>1</sup> Johan van Es,<sup>1</sup> Susana M. Chaves de Sousa Lopes,<sup>1</sup> Harry Begthel,<sup>1</sup> Jeroen Korving,<sup>1</sup> Maaike van den Born,<sup>1</sup> Chenhui Zou,<sup>6,9</sup> Corinne Quirk,<sup>9</sup> Luis Chiriboga,<sup>10</sup> Charles M. Rice,<sup>7</sup> Stephanie Ma,<sup>7</sup> Anne Rios,<sup>8</sup> Peter J. Peters,<sup>2</sup> Ype P. de Jong,<sup>10</sup> and Hans Clevers<sup>1,3,4,12\*</sup>

Origine cellules adultes



- \*Perfusion en collagénase,
- \*Triage des hépatocytes (centri) \*suspension cellulaire
- \*20'000 cellules par puits avec matrigel
- \*Après solidification, milieu de culture:
- Milieu +: EGF, Gastrin, Chiron (Wnt), HGF, FGF7, FGF10, Nicotinamide, Rho inh.
- \*changer le matrigel après 14 jours
- \*400 microns après 20 jours
- \*croissance ralentie après quelques mois...

\*Efficacité assez basse (1% des hépatocytes), comparable aux organoïdes de prostate ou d'estomac..

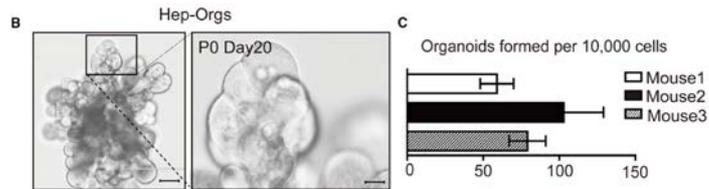
## Organoïdes de foie



Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)



\*Fréquence assez basse (ca. 1 %)

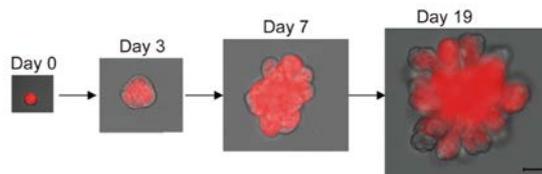
## Organoïdes de foie



Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)



\*Origine cellulaire

Utilisation de souris:  
*Albumin-CreERT2; Rosa26-LSL-tdTomato*  
Après traitement au tamoxifène,  
99% des hépatocytes sont marqués.  
Triage des cellules marquées qui  
sont capables de faire des organoïdes.

Donc des hépatocytes différenciés exprimant de l'albumine peuvent être à l'origine d'organoïdes hépatiques

# Organoïdes de foie

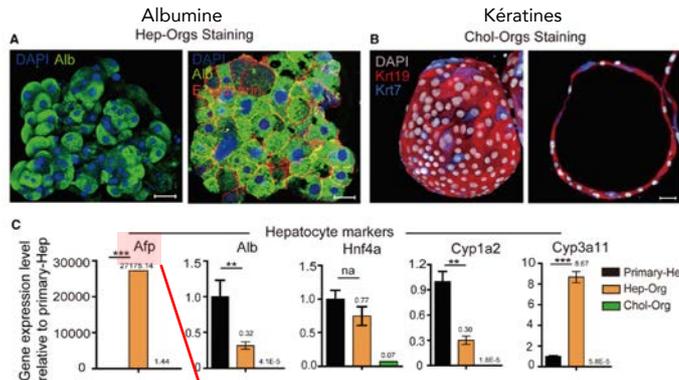


Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

Hep-Orgs: Organoïdes dérivés d'hépatocytes  
Chol-Orgs: Organoïdes dérivés de cholangiocytes  
(Cholangiocytes: épithélium des voies biliaires)



\*Expression de marqueurs différents  
\*Présence de alpha foeto-protéine dans les organoïdes... (prolifération)

# Organoïdes de foie

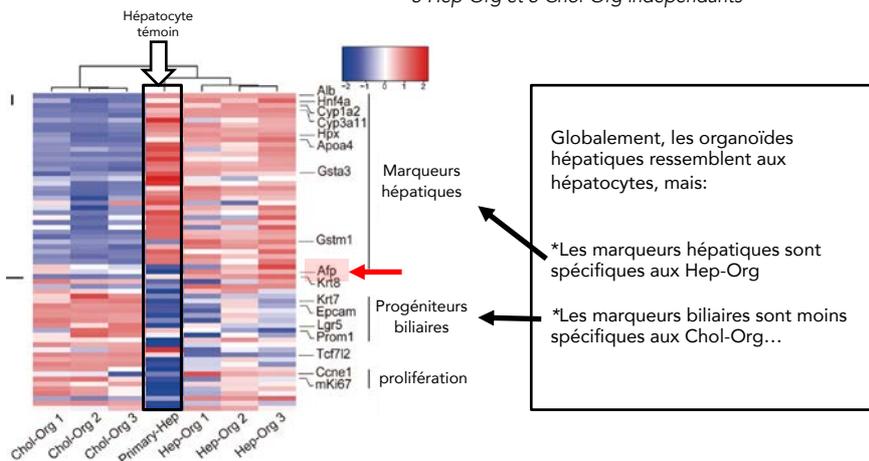


Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

Séquences des ARNs de gènes spécifiques pour les hépatocytes (40), les cholangiocytes (10) et des gènes liés à la prolifération cellulaire.  
3 Hep-Org et 3 Chol-Org indépendants



# Organoïdes de foie

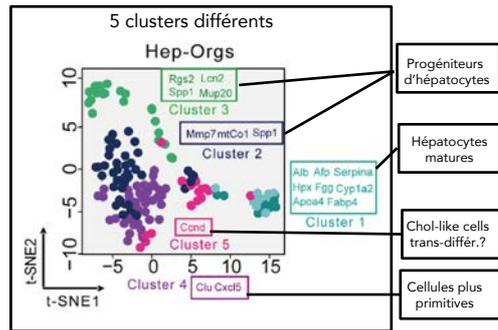
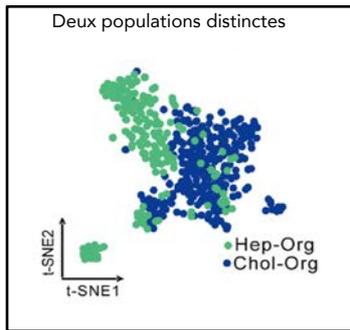
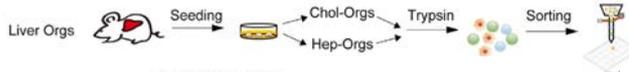


Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

La composition cellulaire fine des organoïdes peut être déterminée par les séquences des ARNs de cellules isolées



Analyses par 'clustering'

# Organoïdes de foie

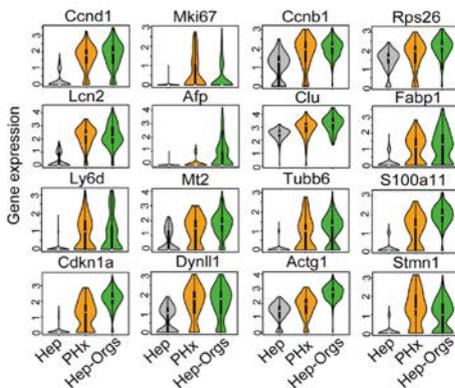
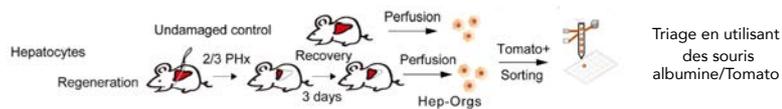


Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

Comparaison des profiles d'ARNs entre des organoïdes et des hépatocytes peu après une hépatectomie



Hep: Hépatocytes  
PH: Hépatocytes après une hépatectomie partielle  
Hep-Orgs: Organoïdes

Conclusion: les organoïdes hépatiques de souris dérivés d'hépatocytes sont similaires à des hépatocytes post-hépatectomie

## Organoïdes hépatiques de foie humain



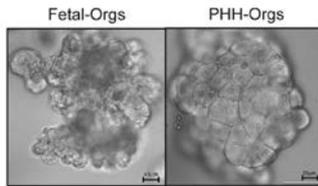
Article

Cell

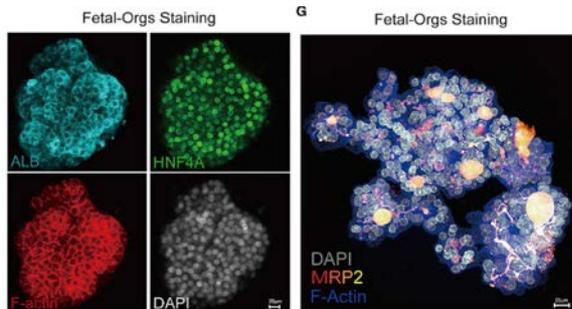
Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

Dérivation d'organoïdes hépatiques humains

Origine cellules  
foetales



- \*Foetus de 11-20 semaines (Fetal-Org)
- \*Une année en culture (+long)
- \*Dérivés d'hépatocytes congelés (PHH-Org)



\*Expression massive d'albumine et de HNF4alpha

\*Coloration de MRP2 (impliquée dans le transport de la bile) révèle un réseau de voies biliaires..(absent des organoïdes souris... contamination de départ?)

## Organoïdes de foie humaine



Article

Cell

Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids  
Hu et al., Cell (2018)

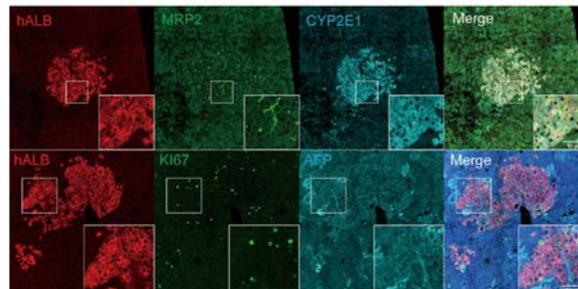
Dérivation d'organoïdes hépatiques humains et greffe chez la souris.

\*Conditions de culture favorisant la maturation des hépatocytes (+ Dex, oncostatine M, sur des plaques collagène)

\*Transplantés dans des souris immuno-déficientes par injection splénique

\*Détection de nodules positifs pour ALB et MRP2, avec perte de l'AFP.

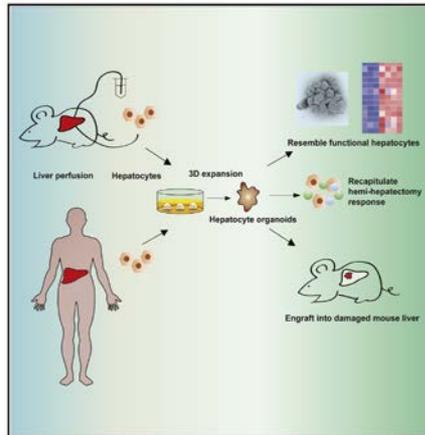
Fetal-Org transplantés après 90 jours



Cell

## Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids

Graphical Abstract



Authors

Huili Hu, Helmuth Gehart, Benedetta Artegiani, ..., Peter J. Peters, Ype P. de Jong, Hans Clevers

Points forts (les auteurs disent)

- \*Les hépatocytes humains et murins peuvent être produits et maintenus à long terme
- \*Les organoïdes hépatiques contiennent des hépatocytes différenciés ainsi que des cellules précurseurs
- \*Les organoïdes hépatiques murins dérivés d'hépatocytes reflètent un état régénératif post-hépatectomie
- \*Les organoïdes hépatiques humains dérivés d'hépatocytes peuvent être greffés et s'intégrer dans un foie de souris

JCI INSIGHT

(2017)

TECHNICAL ADVANCE

Origine cellules adultes, cellules iPS et tumeurs

### Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases

Yuan Guan,<sup>1</sup> Dan Xu,<sup>1</sup> Phillip M. Garfin,<sup>2,3</sup> Ursula Ehmer,<sup>2,3</sup> Melissa Hurwitz,<sup>2</sup> Greg Enns,<sup>2</sup> Sara Michie,<sup>4</sup> Manhong Wu,<sup>1</sup> Ming Zheng,<sup>1</sup> Toshihiko Nishimura,<sup>5,6</sup> Julien Sage,<sup>2,3</sup> and Gary Peltz<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Department of Anesthesia, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, <sup>3</sup>Department of Genetics, and <sup>4</sup>Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA, <sup>5</sup>Center for the Advancement of Health and Bioscience, Sunnyvale, California, USA, <sup>6</sup>Central Institute for Experimental Animals, Tokyo, Japan.

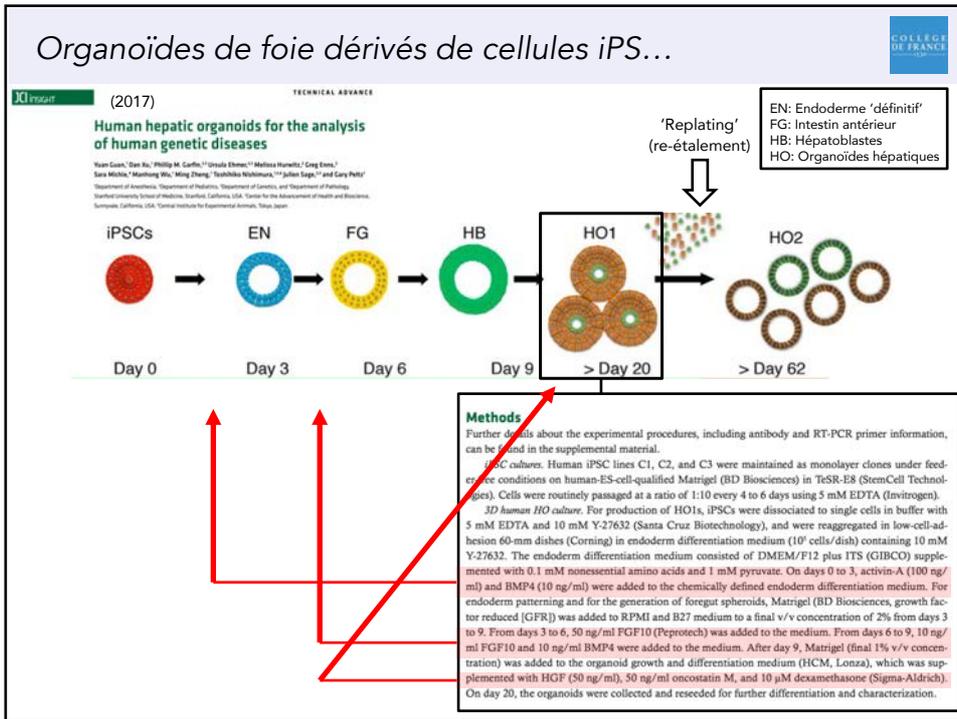
'proof of principle'

We developed an in vitro model system where induced pluripotent stem cells (iPSCs) differentiate into 3-dimensional human hepatic organoids (HOs) through stages that resemble human liver during its embryonic development. The HOs consist of hepatocytes, and cholangiocytes, which are organized into epithelia that surround the lumina of bile duct-like structures. The organoids provide a potentially new model for liver regenerative processes, and were used to characterize the effect of different *JAG1* mutations that cause: (a) Alagille syndrome (ALGS), a genetic disorder where NOTCH signaling pathway mutations impair bile duct formation, which has substantial variability in its associated clinical features

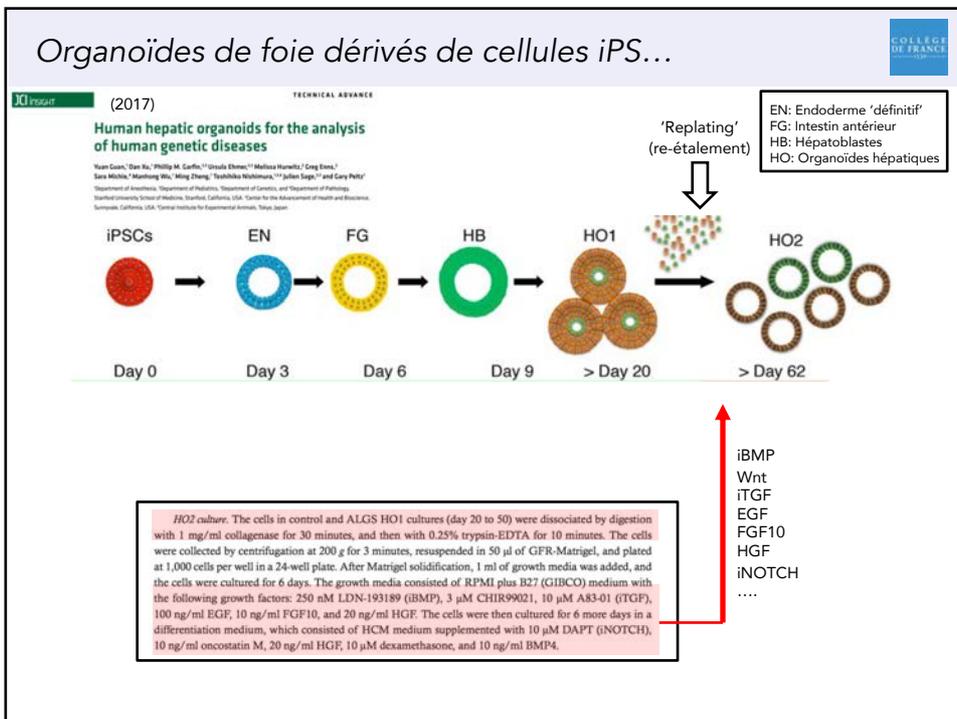
\*Dérivation d'organoïdes hépatiques à partir de cellules humaines iPS 'normales' ou obtenues de patients (syndrome d'Alagille –ALGS-).

\*Ces organoïdes contiennent des hépatocytes et des cholangiocytes, qui sont organisés en structures épithéliales.

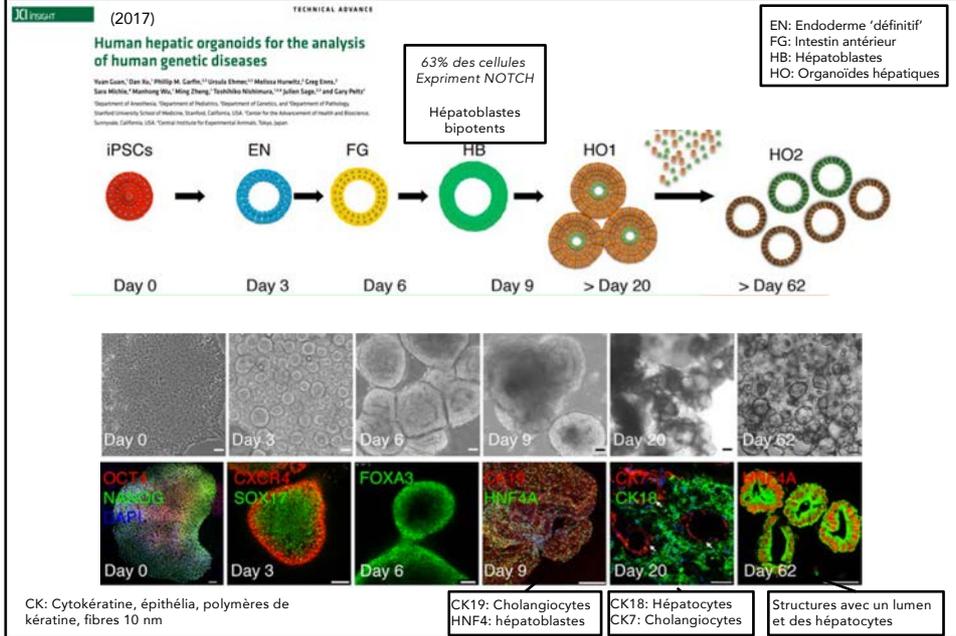
# Organoïdes de foie dérivés de cellules iPS...



# Organoïdes de foie dérivés de cellules iPS...



## Organoïdes de foie dérivés de cellules iPS...



## Organoïdes de foie dérivés de patient ALGS

### Syndrome d'Alagille

- \*Défaut de développement des voies biliaires intra-hépatiques
- \*Cardiopathie congénitale
- \*Faciès caractéristique
- \*Déformation des vertèbres
- \*Anomalie oculaire
- \*.....

Le syndrome d'Alagille (SAG) est caractérisé par une cholestase chronique liée à une paucité des voies biliaires (diminution de la sécrétion biliaire)

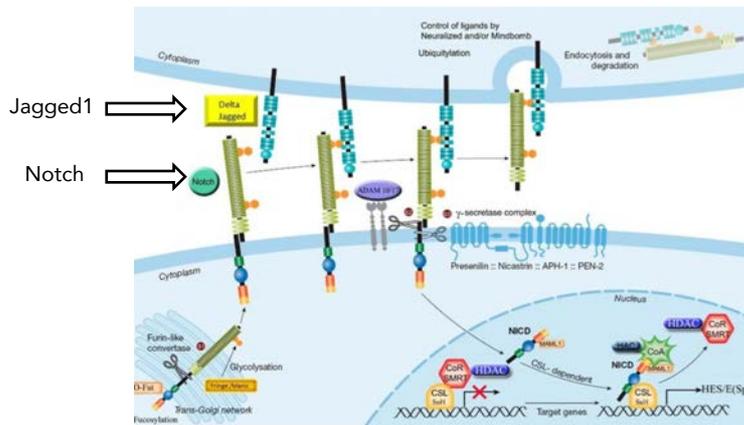
*Etiologie:* Le plus souvent, le syndrome est dû à des mutations du gène *JAG1* codant pour un ligand de la voie de signalisation *Notch*, ou à des mutations de *NOTCH2*.

## Organoïdes de foie dérivés de patient ALGS



### Syndrome d'Alagille

*Etiologie:* Le plus souvent, le syndrome est dû à des mutations du gène *JAG1* codant pour un ligand de la voie de signalisation *Notch*, ou à des mutations de *NOTCH2*.



Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Representation-schematique-de-la-voie-Notch-Adapte-de-Radtke-F-Schweisguth-F-Pear-W\\_fig3\\_281015711](https://www.researchgate.net/figure/Representation-schematique-de-la-voie-Notch-Adapte-de-Radtke-F-Schweisguth-F-Pear-W_fig3_281015711)

## Organoïdes de foie dérivés de patient ALGS



### Syndrome d'Alagille

- \*Défaut de développement des voies biliaires intra-hépatiques
- \*Cardiopathie congénitale
- \*Faciès caractéristique
- \*Déformation des vertèbres
- \*Anomalie oculaire
- \*.....

Le syndrome d'Alagille (SAG) est caractérisé par une cholestase chronique liée à une paucité des voies biliaires (diminution de la sécrétion biliaire)

*Etiologie:* Le plus souvent, le syndrome est dû à des mutations du gène *JAG1* codant pour un ligand de la voie de signalisation *Notch*, ou à des mutations de *NOTCH2*.

Effet semi-dominant (les patients ont une copie du gène muté)

*Haplo-insuffisance ou effet dominant-négatif?*  
(données contradictoires dans la littérature)

## Organoïdes de foie dérivés de patient ALGS



### Syndrome d'Alagille

Effet observé est post-natal, i.e. le foie ne peut pas assurer le développement des canaux biliaires dans les parties qui se développent après la naissance. Les hépatoblastes semblent avoir un problème à se différencier en cellules épithéliales du système biliaire, causé par la modification de la voie Notch.

Organoïdes hépatiques à partir de patients mutants ALGS et de cellules iPS normales ayant été mutées par CRISPR-cas9 pour produire une mutation ciblée

Les organoïdes ALGS ne peuvent pas générer des HO2 et ont des problèmes pour produire des cholangiocytes et des structures de canaux biliaires (contrairement aux témoins) (NOTCH a un effet inhibiteur sur la différenciation des hépatocytes).

## Organoïdes de foie dérivés de cellules iPS et patient ALGS



Les patients ont des mutations stop ou de l'épissage

C1, C2: Témoins #1 et #2: Organoïdes de cellules iPS 'normales'

ALGS1: Cellules iPS de patient muté dans Jag1 (mutation stop; C829X)

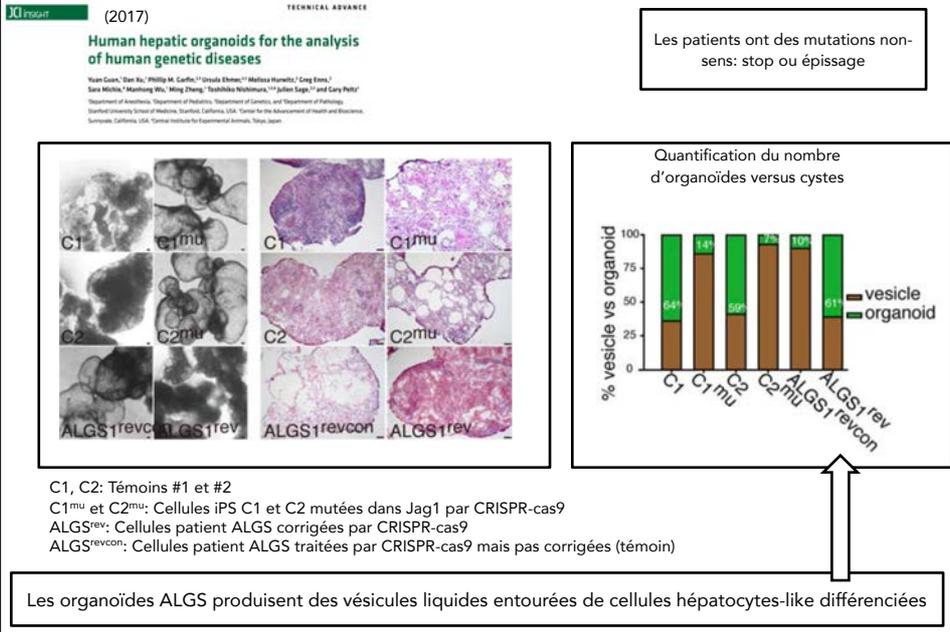
ALGS2: Cellules iPS de patient muté dans l'épissage de Jag1

C1<sup>mu</sup> et C2<sup>mu</sup>: Cellules iPS C1 et C2 ciblées dans Jag1 par CRISPR-cas9 pour induire la mutation stop identique à l'une de celles trouvées chez les patients (pour être certain que cette mutation seule cause le syndrome...C829X).

ALGS<sup>rev</sup>: Cellules iPS patient ALGS1 traitées par CRISPR-cas9 pour corriger la mutation (chirurgie génétique)

ALGS<sup>revcon</sup>: Cellules iPS du patient ALGS1 traitées par CRISPR-cas9 mais dans lesquelles la chirurgie (correction) n'a pas marché (témoin)('off target effects').

## Organoïdes de foie dérivés de cellules iPS et patient ALGS



## Organoïdes de patient ALGS; conclusions



### Syndrome d'Alagille

Ces études ajoutées au fait que les délétions complètes de *Jag1* chez la souris ne sont PAS haplo-insuffisantes, suggèrent que:

*"For the vast majority of those with other types of JAG1 mutations, our organoid results indicate that ALGS liver disease is likely to be mediated by a dominant-negative effector mechanism"* (conclusion de l'étude).

Syndrome d'Alagille

Ces études ajoutées au fait que les délétions complètes de *Jag1* chez la souris ne sont PAS haplo-insuffisantes, suggèrent que:

*"For the vast majority of those with other types of JAG1 mutations, our organoid results indicate that ALGS liver disease is likely to be mediated by a dominant-negative effector mechanism"* (conclusion de l'étude).

MAIS: Les différences dans les effets haplo-insuffisants chez l'homme et la souris sont observées dans de nombreux cas de syndromes génétiques, ce qui suggère également qu'il pourrait y avoir une différence d'ordre général dans les dosages de plusieurs protéines d'importance fondamentale pour le développement des organes et des structures.