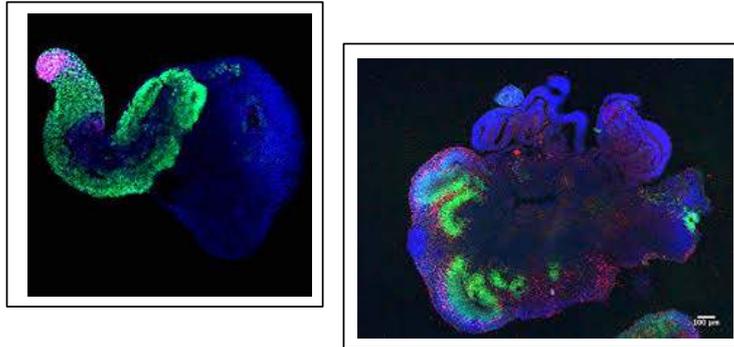


Denis Duboule

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



 @Duboule
 @CdF1530

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

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

Cours 6
11 juin 2019

Développement pré-implantation
Lignées cellulaires embryonnaires
Blastoïdes (blastocyste-like)
Embryoïdes (embryons ETS; ETX)
Gastruloïdes

'Organoïdes d'embryons'

Etat des lieux:

'Blastoïdes, Embryoïdes et Gastruloïdes'...

*Il s'agit avant tout de comprendre les étapes précoces du développement de l'embryon mammifère et d'y accéder expérimentalement, par une approche n'impliquant pas d'embryons...

*A terme, travailler avec des embryons humains (but thérapeutique, reproduction future etc...)

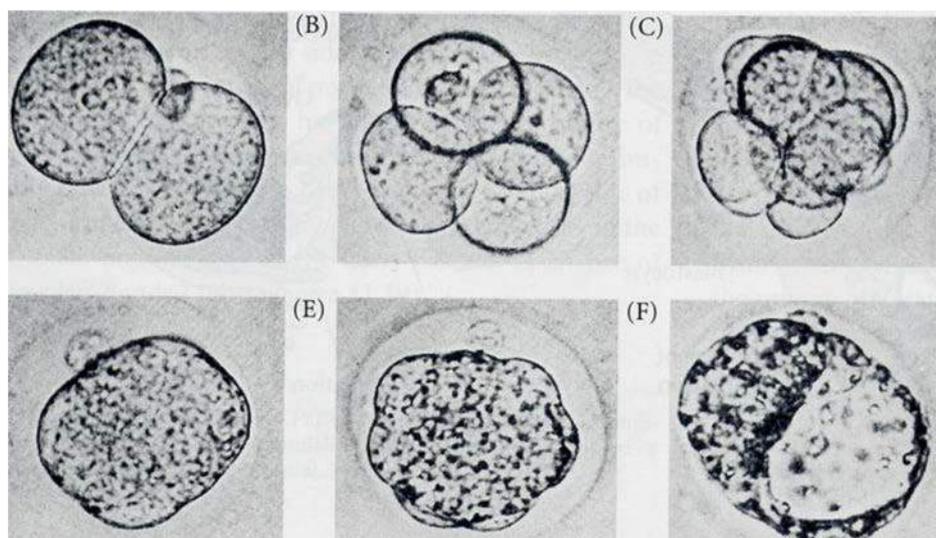
*Souris-humains; pareils mais différents...

L'Embryon mammifère (clivages et blastocyste)

Développement du blastocyste; clivages, compaction et formation de la cavité blastocoelique.

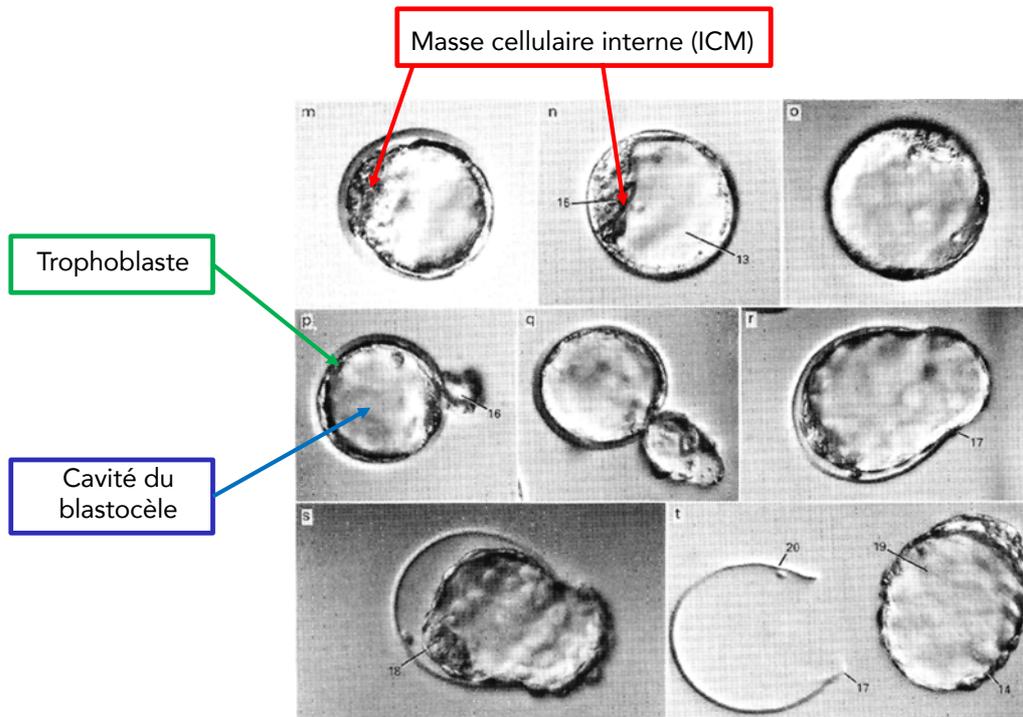
*Clivages holoblastique isolécithe rotationnel

*Blastomères (les clivages sont des mitoses très rapides, (phases G1 et G2 courtes, pas d'augmentation de taille générale...)



L'Embryon mammifère (éclosion)

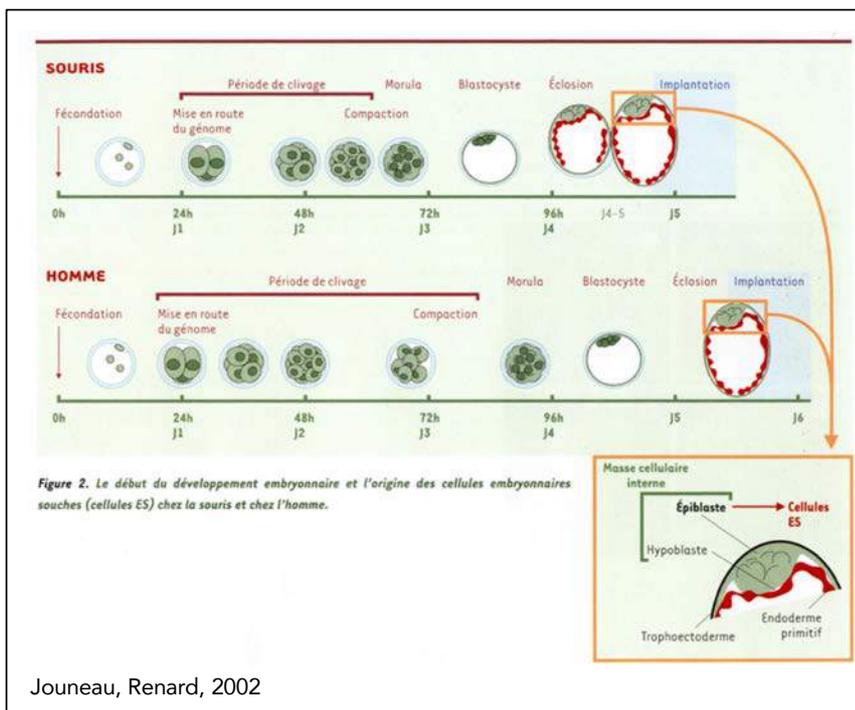
Blastocyste: éclosion *in vitro*, sortie de la zone pellucide. Moment de l'implantation *in vivo*.



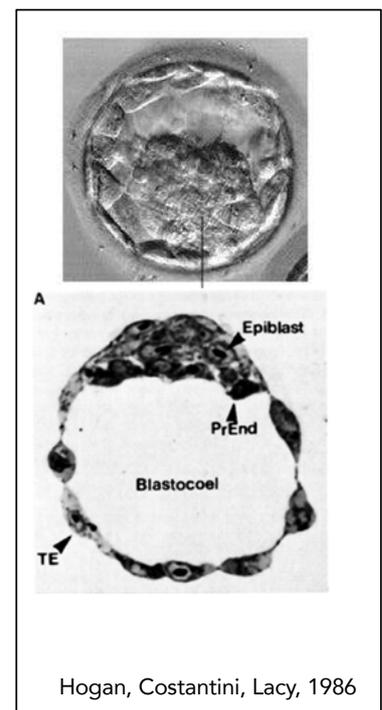
Cellules souches embryonnaires (ESC)

Emergence des cellules souches embryonnaires

Comparaison des timings entre la souris et les humains



Jouneau, Renard, 2002



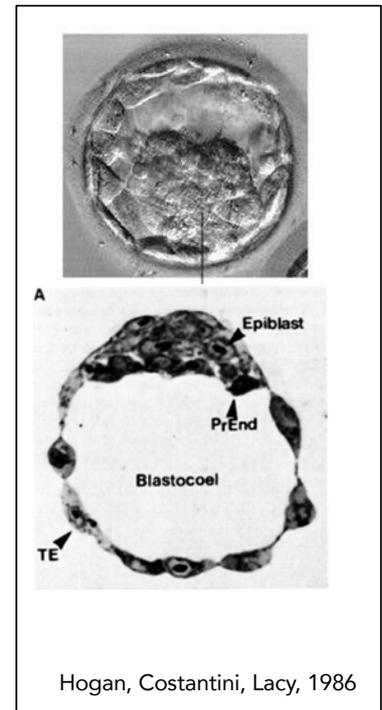
Hogan, Costantini, Lacy, 1986

Emergence des cellules souches embryonnaires

*Les cellules souches embryonnaires (ES) ne sont pas 'totipotentes' car elles ne peuvent pas produire de 'trophectoderme' (la couche externe qui les entoure et qui est nécessaire à l'implantation dans la muqueuse utérine)

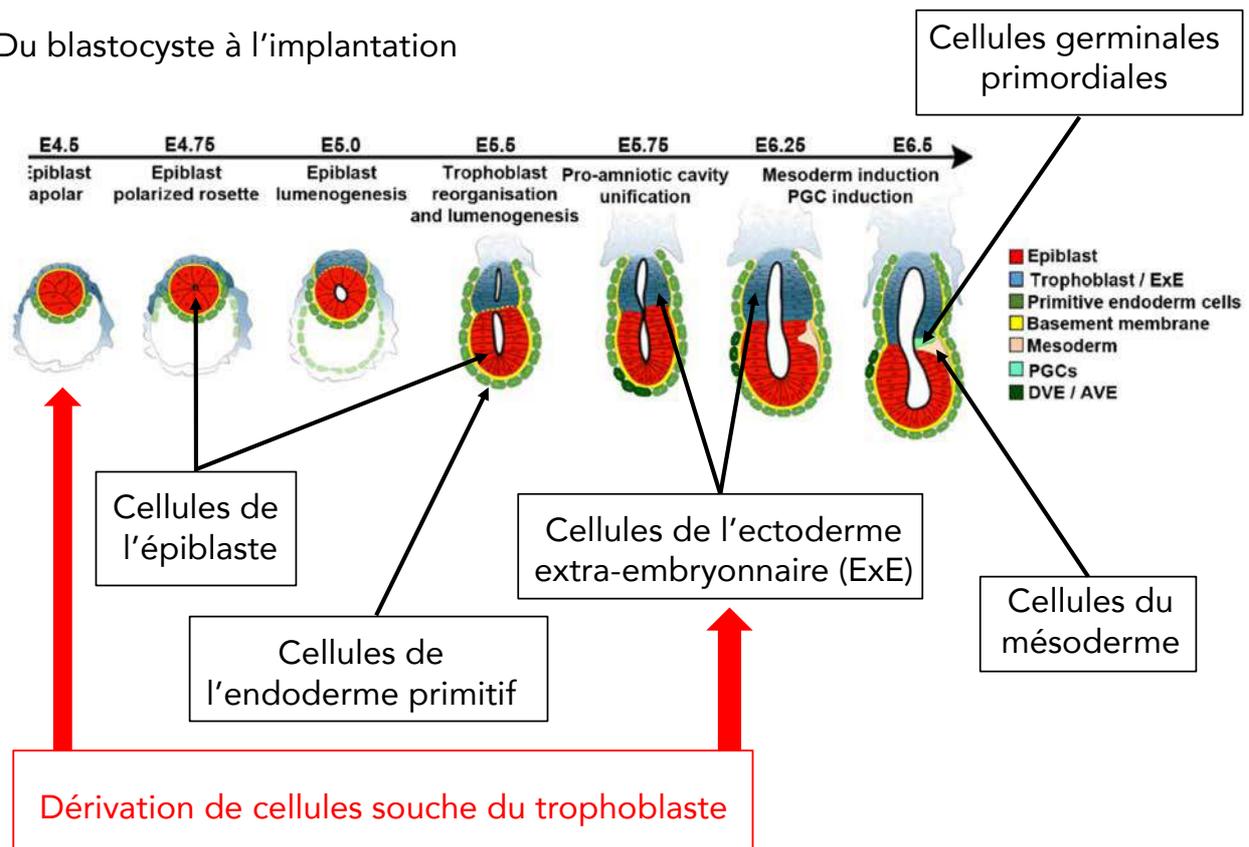
*D'où la nécessité de produire également des cellules de type 'trophoblastes' dans le but de reconstruire un 'embryon' *in vitro*.

Quelles cellules utiliser?



Embryon mammifère; premières différenciations cellulaires

Du blastocyste à l'implantation



Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4

Satoshi Tanaka,* Tilo Kunath, Anna-Katerina Hadjantonakis, Andras Nagy, Janet Rossant†

The trophoblast cell lineage is essential for the survival of the mammalian embryo in utero. This lineage is specified before implantation into the uterus and is restricted to form the fetal portion of the placenta. A culture of mouse blastocysts or early postimplantation trophoblasts in the presence of fibroblast growth factor 4 (FGF4) permitted the isolation of permanent trophoblast stem cell lines. These cell lines differentiated to other trophoblast subtypes in vitro in the absence of FGF4 and exclusively contributed to the trophoblast lineage in vivo in chimeras.

11 DECEMBER 1998 VOL 282 SCIENCE www.sciencemag.org

Origines des cellules: ExE à 6.5 ou blastocyste

also some extraembryonic membranes. However, the trophectoderm is exclusively restricted to form the fetal portion of the placenta and the trophoblast giant cells. The polar trophectoderm (the subset of the trophectoderm that is in direct contact with the ICM) maintains a proliferative capacity and forms the extraembryonic ectoderm (ExE), the ectoplacental cone (EPC), and the secondary giant cells of the

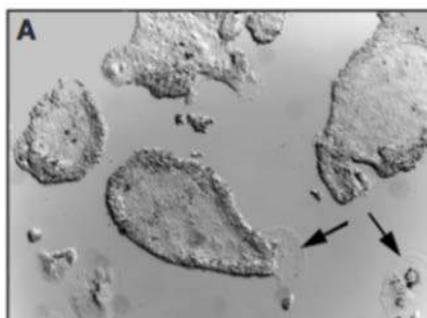
Cellules souches de trophoblaste

Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4

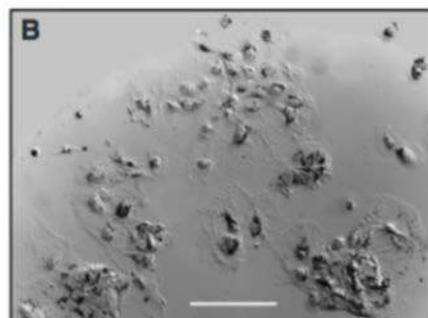
Satoshi Tanaka,* Tilo Kunath, Anna-Katerina Hadjantonakis, Andras Nagy, Janet Rossant†

11 DECEMBER 1998 VOL 282 SCIENCE www.sciencemag.org

avec FGF4



sans FGF4



*Culture de trophoblaste dérivé soit d'ectoderme extra-embryonnaire (ExE) soit de blastocystes (efficacités similaires). Culture dans un milieu conditionné avec des fibroblastes embryonnaire et du FGF4 (A). Sinon, différenciation dans des types de cellules trophoblastiques (cellules géantes, flèches).

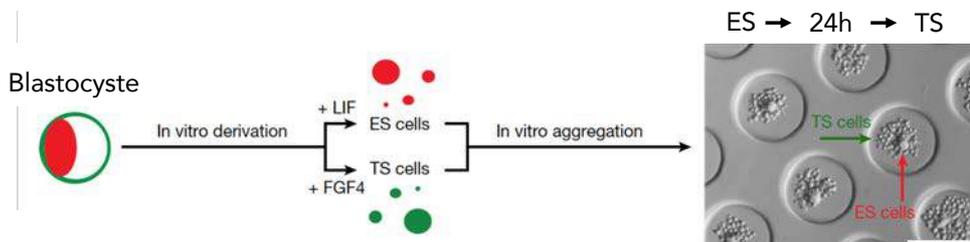
LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrijl¹, Jean-Charles Boisset², Jeroen Korving³, Judith Vivie^{2,3}, Roman K. Truckenmüller¹, Alexander van Oudenaarden², Clemens A. van Blitterswijk^{1,5} & Niels Geijsen^{2,4,5}

Rivron et al., Nature (2018)



- *App. 5 cellules ES / cuvette
- *24h pour former de petits agrégats
- *Rajout de cellules TS
- *Induction de cystes dans les cellules TS

*Dans app. 0.3% des cas, les cellules TS s'organisent en cystes avec des cellules ES à l'intérieur: *Blastoïdes*

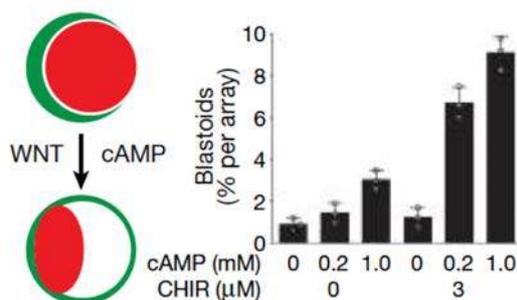
LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Rivron et al., Nature (2018)

*Production de blastoïdes



*L'inhibition des voies de signalisations WNT et de l'AMPC réduit la formation de la cavité blastocœlique (années 1980's)
(Wnt est sécrété par les cellules du trophectoderme)

*Donc, culture en présence de Chiron (WNT agoniste) et d'AMPC, ce qui augmente les fréquences de façon notable

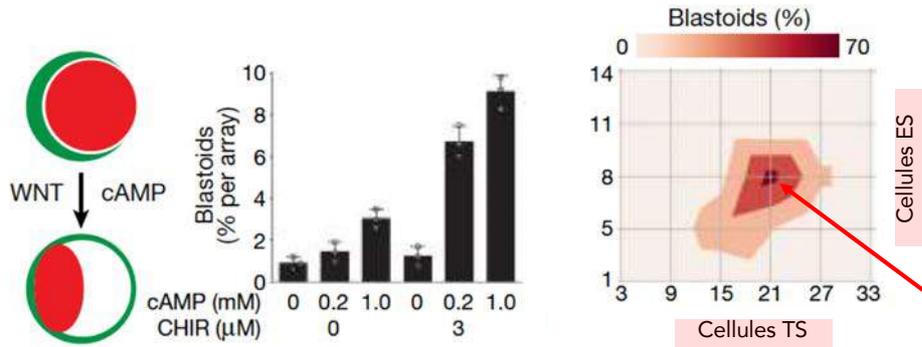
Blastoïdes; un mélange de cellules souches embryonnaires

LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*Approche systématique pour fixer le nombre idéal de cellules ES et TS de départ



*L'inhibition des voies de signalisations WNT et de l'AMPc réduit la formation de la cavité blastocœlique (années 1980's)

*Donc, culture en présence de Chiron (WNT agoniste) et d'AMPc, ce qui augmente les fréquences de façon notable

*Jusqu'à 70% de succès avec 8 ESc et 21 TSc

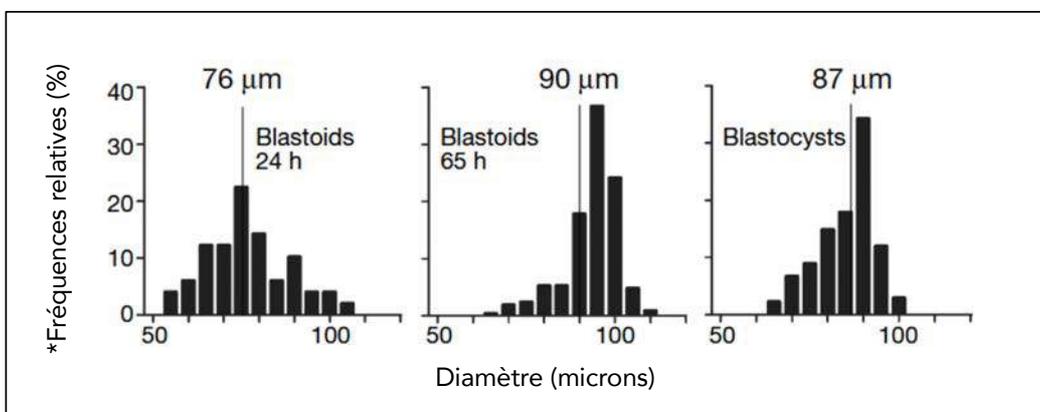
Blastoïdes; un mélange de cellules souches embryonnaires

LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*Production de blastoïdes
Tailles moyennes



*Ces blastoïdes sont similaires en taille aux blastocystes normaux

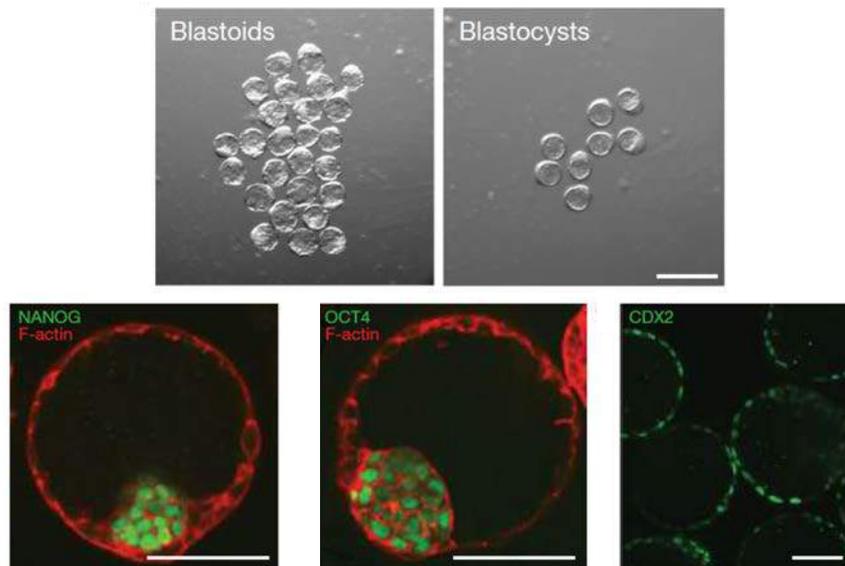
Blastoïdes; un mélange de cellules souches embryonnaires

LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*Production de blastoïdes



*Ces blastoïdes sont similaires en aspect général aux blastocystes normaux

*Mais! alors que marqueurs de pluripotence (*Nanog*, *OCT4*) sont bien exprimés dans les cellules ES, *CDX2* (marqueur des cellules TS) est faible dans les TS

Blastoïdes; Implantation dans l'utérus

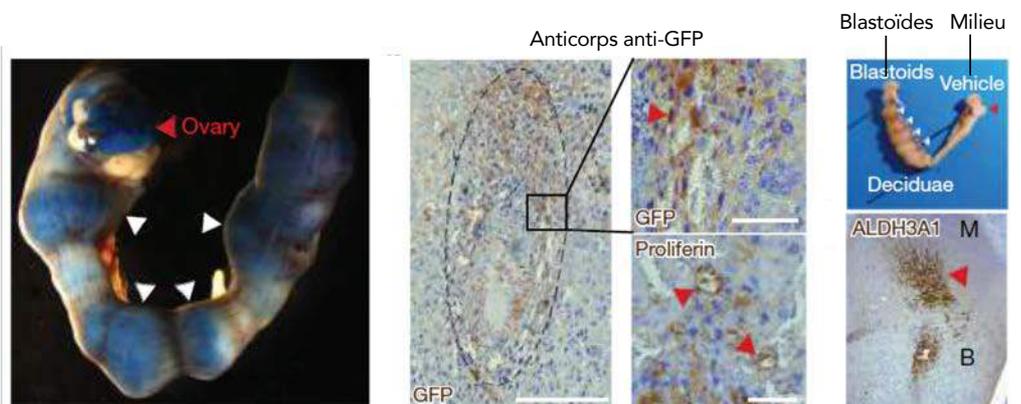
LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*Implantation de ces blastoïdes?

Blastoïdes implantés chirurgicalement dans des uteri de femelles 'pseudo-portantes' (femelles hormonées et croisées avec des mâles stériles)



*Blastoïdes de E3.5 implantés et uteri collectés à E7.5. Coloration à l'Évan blue', qui révèle les sites de perméabilité vasculaire (décidua)

*Blastoïdes implantés, fait à partir de cellules TS GFP+

*Réaction de décidua visualisée Par la ALDH3A1

LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*Implantation de ces blastoïdes

Développement d'embryons *in utero*?

Blastoids transferred into the uterus of pseudo-pregnant mice induced deciduae formation with typical local vascular permeability (Fig. 2f), suggesting anastomosis of trophoblasts with the mother's vascular system¹⁵. Indeed, blastoid trophoblasts generated cells incorporated into the ingrowing maternal vasculature and expressing proliferin, a marker for trophoblast giant cells^{6,16} (Fig. 2g). Blastoids did not support full bona fide embryonic development, but generated numerous cells positive for a variety of extra-embryonic markers of different post-implantation trophoblast cell types^{6,15,17} (Extended Data Fig. 5b). Decidualization is a complex process regulated by the

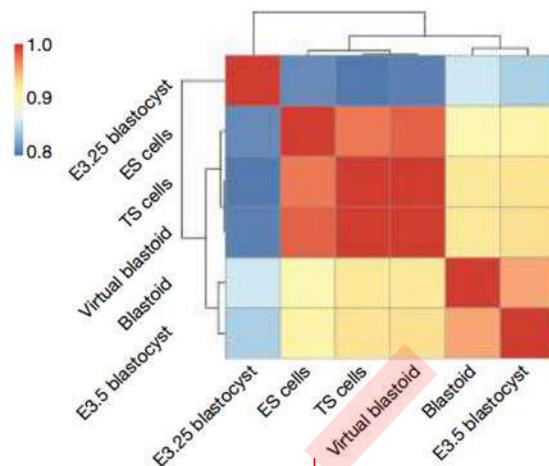
Blastoïdes; analyses des ARNs et clustering

LETTER

<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

Séquences des ARNs des cellules de départ et des blastoïdes, suivies d'une analyse par clustering..



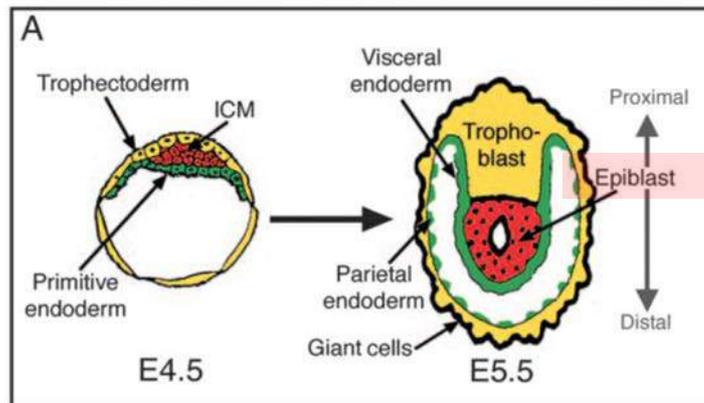
*Mais, toutes les conditions maintiennent les marqueurs de pluripotence (par exemple pas de marqueurs de épiSC ('epiblast stem cells'))

*Blastoïdes cluster avec des blastocystes de E3.5

*Cellules ES et TS ne cluster pas avec les blastoïdes

*Virtual blastoïdes (ES et TS cultivées en milieu blastoïdes conditionné et ARNs mis ensemble..) cluster avec lignées parentales et non avec blastoïdes

donc, communication ES et TS nécessaire...



Kunath et al., Development (2005)

L'épiblaste est la couche cellulaire à partir de laquelle l'embryon sera produit

Blastoïdes; Induction du trophoctoderme

LETTER

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

*En utilisant des épi-stem cells (EpiSCs), la fréquence des blastoïdes diminue et ils sont plus petits.. Et d'autres types cellulaires sont inactifs.

*Donc un potentiel inductif lié aux cellules ES (signalisent aux cellules TS)

*Fgf4 connu pour réguler la prolifération et le self-renewal du trophoblaste

*8 fois plus de Fgf4 dans les ES que dans les EpiSCs...

*Exemple d'utilisation des blastoïdes dans l'étude de phénomènes précoces difficiles à analyser sur l'embryon lui-même.

*La voie de signalisation TGFbeta dans le blastocyste (BMP4, Nodal)

*ES induisent la voie de signalisation TGFbeta dans les cellules trophoblastiques

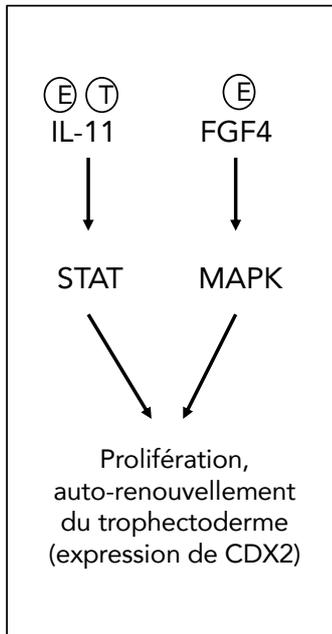
*Les ARNs des ligands Nodal et BMP4 sont produits par les cellules ES

LETTER

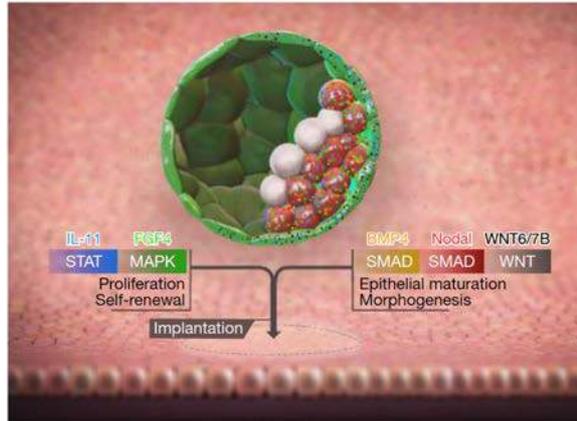
<https://doi.org/10.1038/n41586-018-0051-0>

- Ⓔ Compartiment embryonnaire (ES)
- Ⓓ Compartiment trophoblastique (TS)

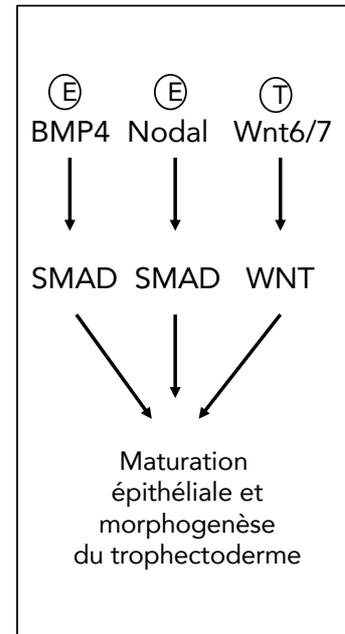
Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)



Résumé



*Le 'compartiment' embryonnaire (ES) envoie des signaux au trophoctoderme qui entretient la prolifération et la morphogénèse du trophoctoderme et le prépare à l'implantation.



'Embryons-ETS'; un mélange de cellules souches embryonnaires

RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Sarah Ellys Harrison,^{1*} Berna Sozen,^{1,2*} Neophytos Christodoulou,¹ Christos Kyprianou,¹ Magdalena Zernicka-Goetz^{1†}

Harrison et al., *Science* **356**, eaal1810 (2017) 14 April 2017



Mammalian embryogenesis requires intricate interactions between embryonic and extraembryonic tissues to orchestrate and coordinate morphogenesis with changes in developmental potential. Here, we combined mouse embryonic stem cells (ESCs) and extraembryonic trophoblast stem cells (TSCs) in a three-dimensional scaffold to generate structures whose morphogenesis is markedly similar to that of natural embryos. By using genetically modified stem cells and specific inhibitors, we show that embryogenesis of ESC- and TSC-derived embryos—ETS-embryos—depends on cross-talk involving Nodal signaling. When ETS-embryos develop, they spontaneously initiate expression of mesoderm and primordial germ cell markers asymmetrically on the embryonic and extraembryonic border, in response to Wnt and BMP signaling. Our study demonstrates the ability of distinct stem cell types to self-assemble in vitro to generate embryos whose morphogenesis, architecture, and constituent cell types resemble those of natural embryos.

(auto-organisation appliquée à l'embryon)

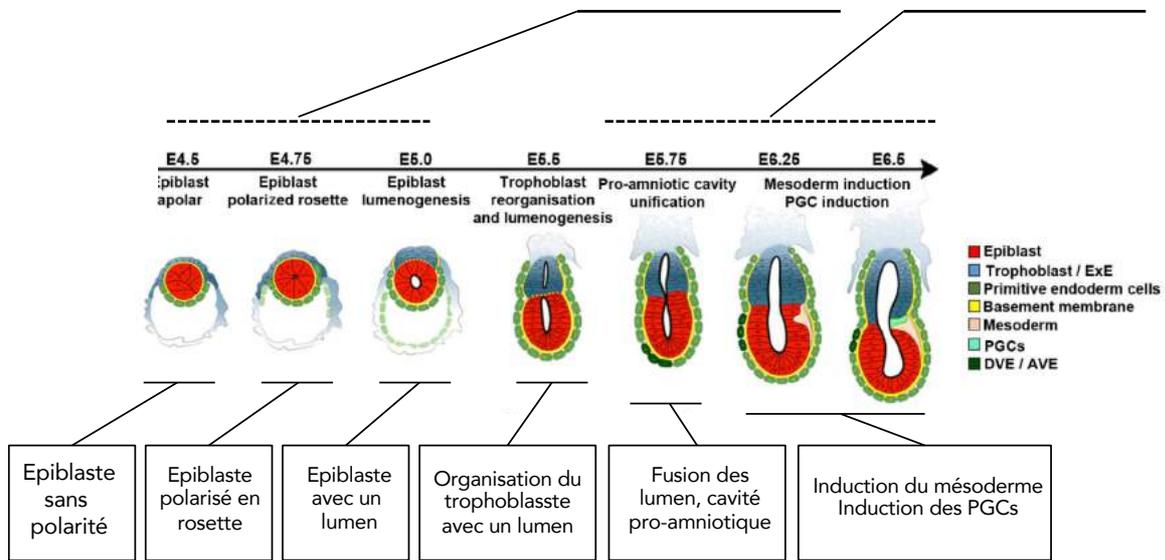
'Développement normal de l'embryon de souris

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison *et al.*, *Science* **356**, eaal1810 (2017) 14 April 2017

*Des stades pré-implantation à la post-implantation



PGCs: Cellules germinales primordiales
DVE: Endoderme viscéral distal
AVE: Endoderme viscéral antérieur

'Embryons-ETS'; un mélange de cellules souches embryonnaires

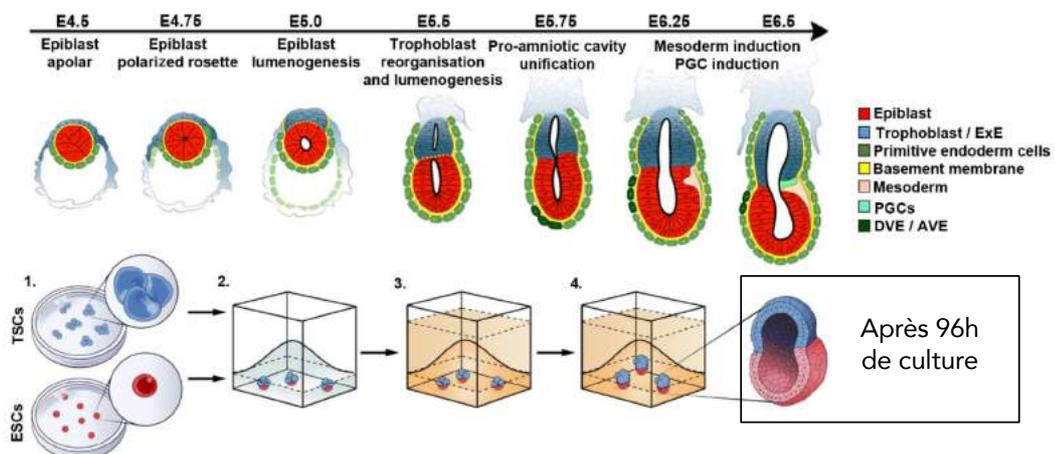
DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison *et al.*, *Science* **356**, eaal1810 (2017) 14 April 2017

*Production des 'embryons-ETS'

Conditions de culture similaires à Rivron *et al.*
Mais: Une cellule ES et petit agrégat de TS
Suspension en 3D/Matrigel/goutte solidifiée



Milieu de culture spécifique à ces agrégats

'Embryons-ETS'; un mélange de cellules souches embryonnaires

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison *et al.*, *Science* **356**, eaal1810 (2017) 14 April 2017

*Milieu de culture:

"3D embedded" culture

ESC colonies were dissociated to single cells, and TSC colonies dissociated into small clumps by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37°C. Cells were pelleted by centrifugation for 5 min/1000 rpm, washed with PBS, and repelleted. This was repeated twice, then ESC and TSC suspensions were mixed and repelleted. The pellet was resuspended in Matrigel (BD, 356230). The cell suspension was plated on μ -plates (Ibidi) and incubated at 37°C until the Matrigel solidified. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂. ETS-embryo medium was as follows: 50% RPMI 25% DMEM F-12, and 25% Neurobasal A supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM 2ME, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.25x N2 supplement, 0.5x B27 supplement, or SOS supplement (Cell Guidance Systems Ltd, Cambridge) FGF4 (12.5 ng/ml) and heparin (Sigma) 500 ng/ml (ETS-Embryo medium, ETM, Cell Guidance Systems Ltd., Cambridge). For some experiments, cells were plated by using a 3D "on top" protocol (56).

*Milieu utilisé normalement pour faire pousser des populations de neurones..

*Co-facteur de Fgf qui promeut la signalisation par la voie Fgf

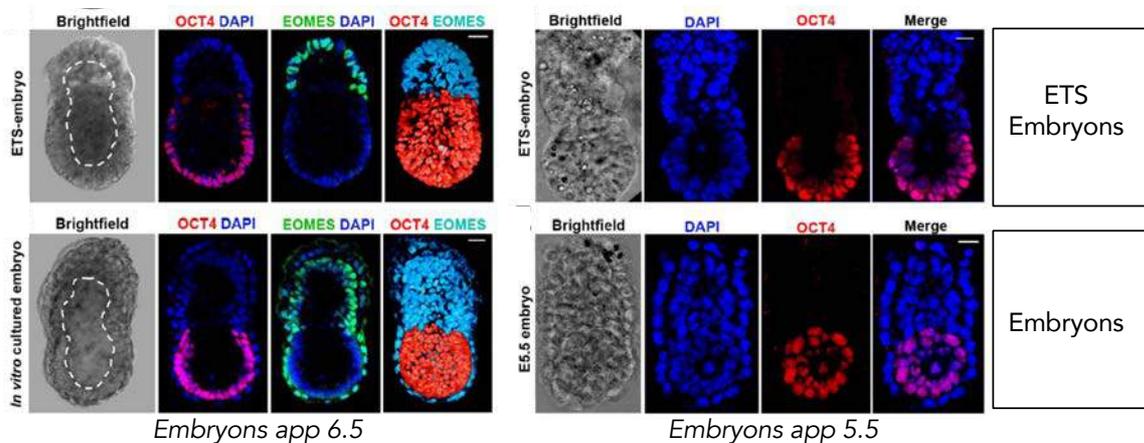
'Embryons-ETS'; Marqueurs de l'embryon

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison *et al.*, *Science* **356**, eaal1810 (2017) 14 April 2017

Embryons-ETS après 96h de culture
Embryons normaux 48h post-blastocyste
Embryon post-implantation à 5.5 jours



OCT4: Marqueur de cellules embryonnaires
EOMES: Marqueur de cellules extra-embryonnaires
DAPI: Marqueur des noyaux

22% de toutes les structures produites contiennent des cellules ES et TS et 92% de ces structures montrent cet aspect cylindrique typique (egg-cylindre)

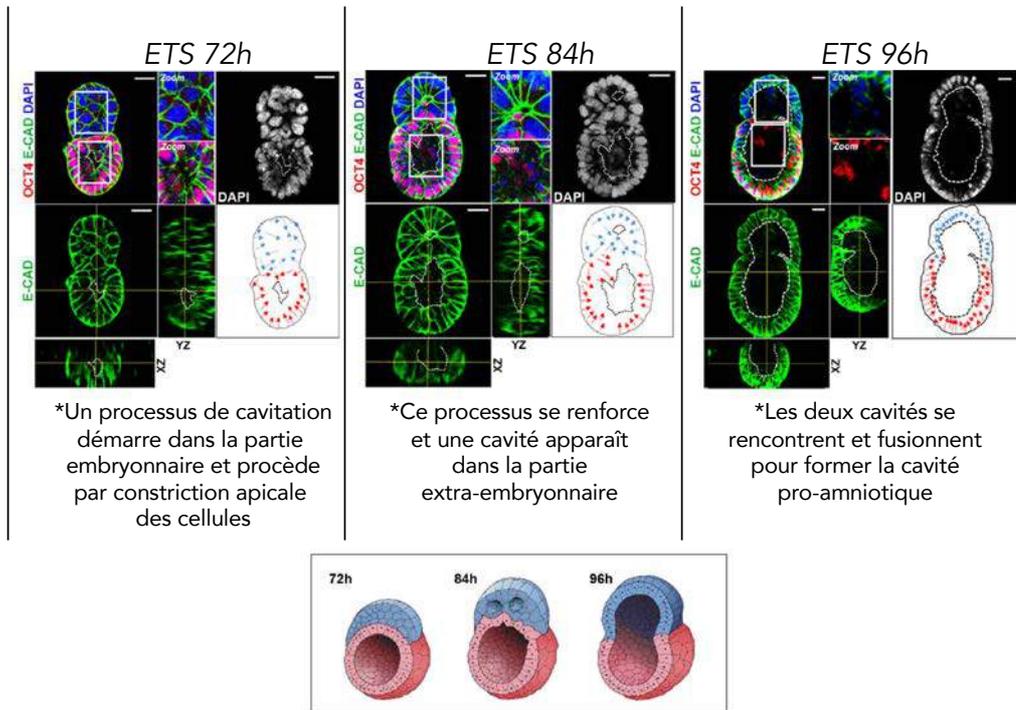
'Embryons-ETS'; dynamique de la cavité pro-amniotique

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison et al., *Science* 356, eaal1810 (2017) 14 April 2017

La formation de la cavité pro-amniotique est identique au processus observé dans l'embryon normal

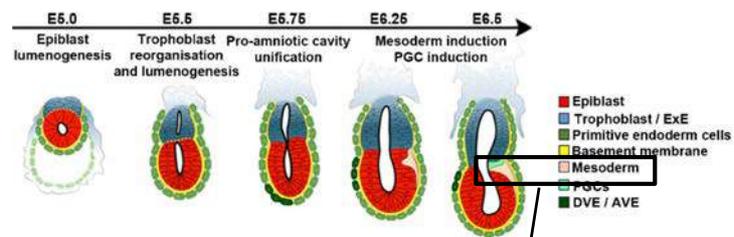


'Embryons-ETS'; Apparition du mésoderme

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

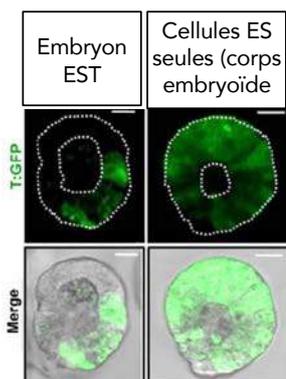
Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison et al., *Science* 356, eaal1810 (2017) 14 April 2017

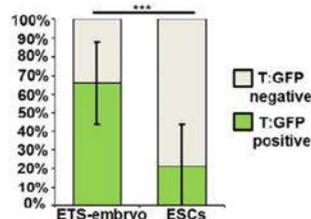


Le mésoderme apparaît dans la partie embryonnaire de façon **asymétrique**

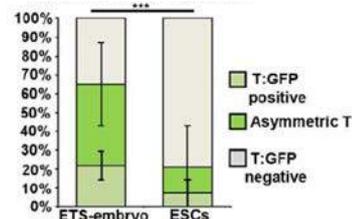
- *Marqueur du mésoderme précoce: Le gène Brachyury ('Bra' ou 'T')
- *Cellules ES marquées avec un gène de fusion Bra:GFP (T:GFP)



% de structures avec fluorescence



% de structures avec fluorescence asymétrique



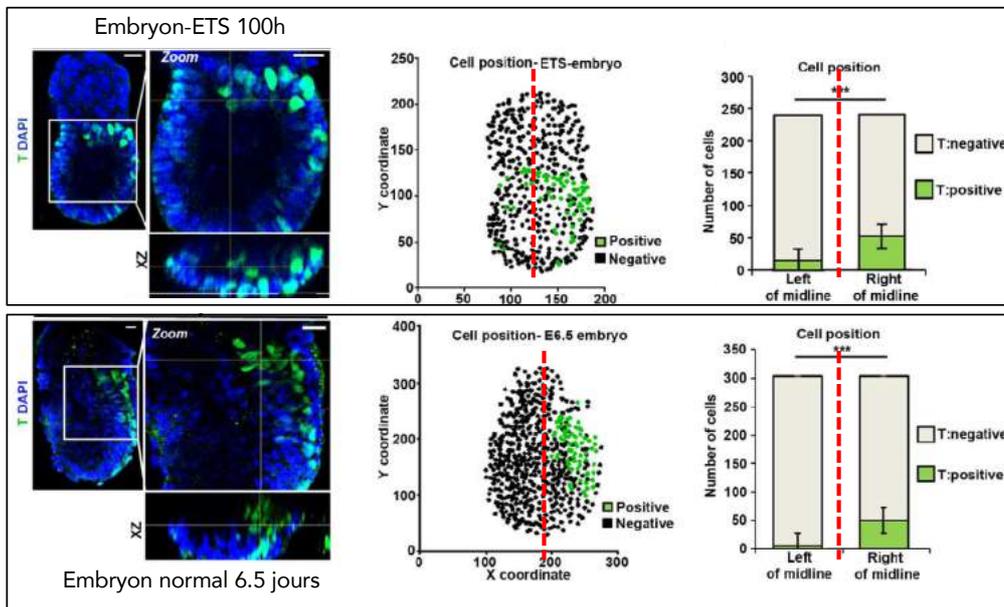
'Embryons-ETS'; Apparition du mésoderme

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison et al., Science 356, eaal1810 (2017) 14 April 2017

Quantification de l'asymétrie de détection de Bra:GFP



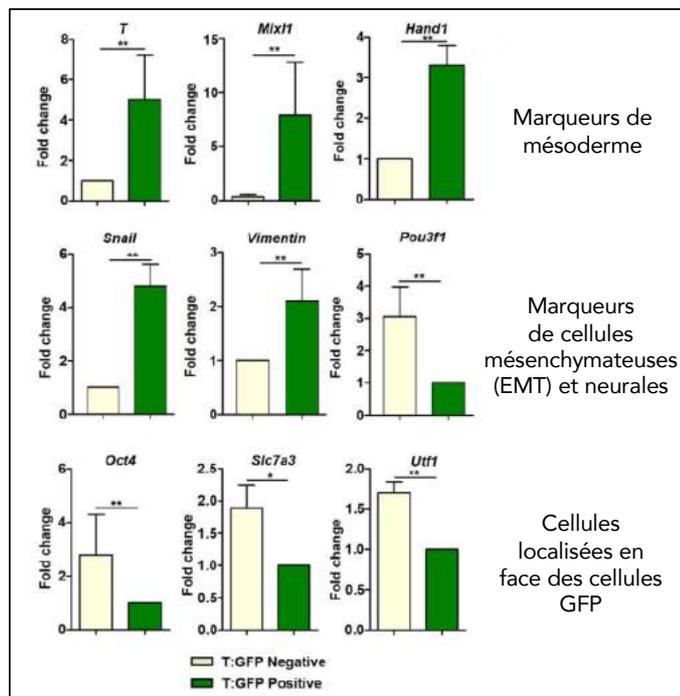
'Embryons-ETS'; Caractérisation du mésoderme

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

Harrison et al., Science 356, eaal1810 (2017) 14 April 2017

Les cellules positives pour Bra:GFP sont-elles vraiment des cellules mésodermique?
Isoler les cellules GFP et qPCR sur des gènes cibles



Methodes:

T:GFP-negative cells in Fig. 5J and fig. 7, e and g, ETS-embryos were treated briefly with an enzyme-free Hanks'-based cell dissociation buffer for 2 min to remove the Matrigel, then had their TSC-compartment dissected away. The ESC compartment was dissociated to single cells by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37°C. On average, 15 to 20 GFP-positive and -negative cells were collected separately under a fluorescent microscope and transferred into lysis buffer (Life Technologies). Total RNA was extracted with the Arcturus Pico Pure RNA Isolation Kit, and qRT-PCR was performed with the Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Life Technologies) and a Step One Plus Real-time PCR machine (Applied Biosystems).



'Embryons-ETS'; Cellules germinales primordiales (PGCs)

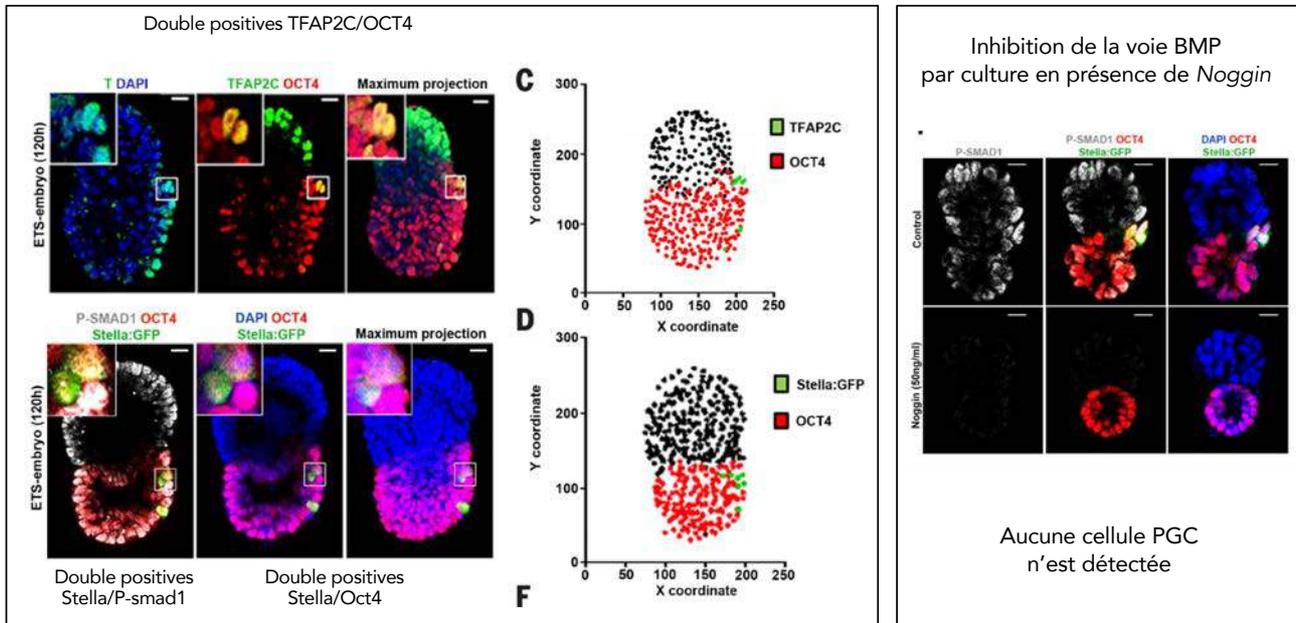
DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro

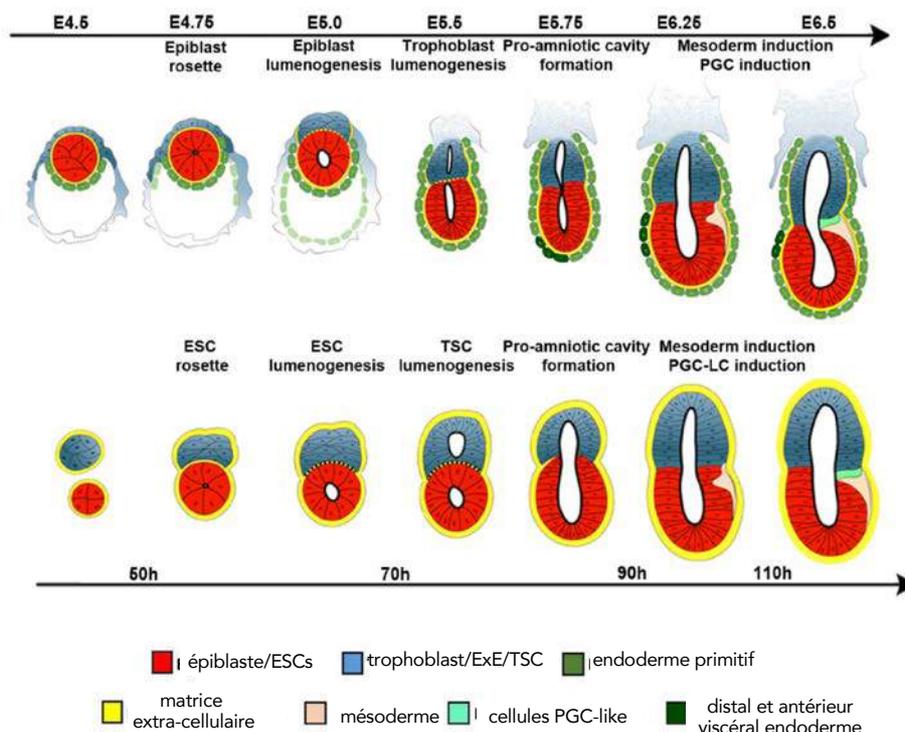
Harrison et al., *Science* 356, eaal1810 (2017) 14 April 2017

Détection des cellules germinales primordiales en réponse au traitement BMP (inducteur des PGCs dans l'embryon, par signalisation à partir du compartiment extra-embryonnaire)

Marqueurs: PGCs: *Tfp2c*, *Stella*, *Stella:GFP*
BMP: *P-smad1*



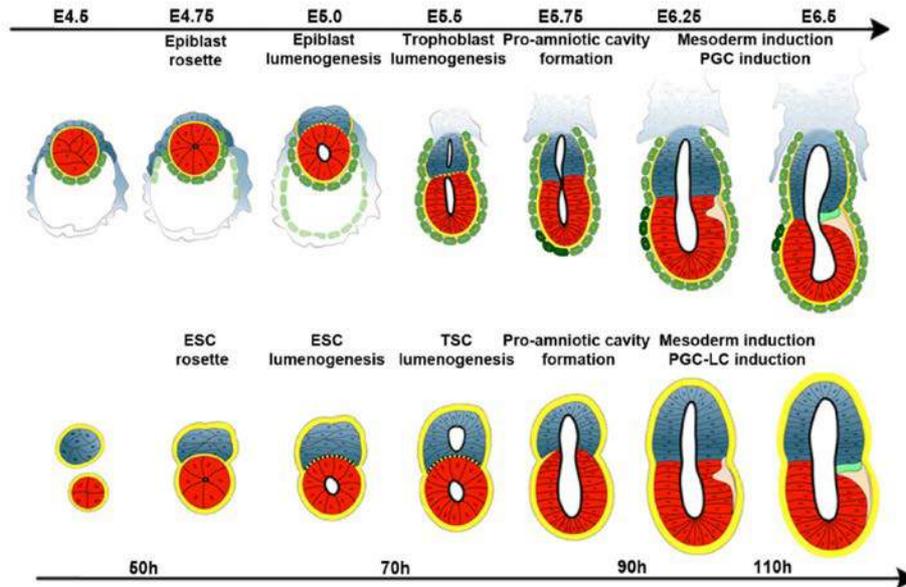
'Embryons-ETS'; Résumé, comparaison avec l'embryon normal



Embryon-ETS entouré d'une matrice extra-cellulaire ressemblant à celle de la membrane basale de l'endoderme viscéral

L'Embryon-ETS n'a ni trophodermes, ni endoderme primitif

'Embryons-ETS'; Résumé, comparaison avec l'embryon normal



De surcroît, la transition épithélio-mesenchymateuse typique de la gastrulation ne se produit pas...

Les embryons-ETS sont post-implantation mais pré-gastrulation...

'Embryons-ETX'; un mélange de trois types de cellules

nature cell biology

TECHNICAL REPORT

<https://doi.org/10.1038/n41556-018-0147-7>

Corrected: Publisher Correction

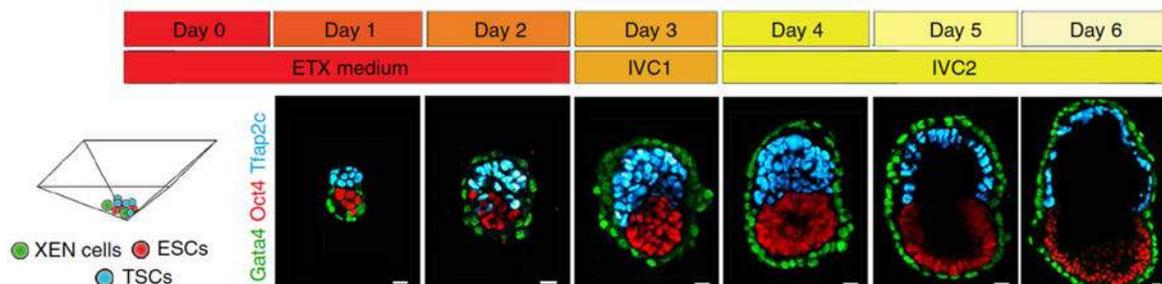
Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures

Berna Sozen^{1,2,10}, Gianluca Amadei^{1,10}, Andy Cox¹, Ran Wang³, Ellen Na⁴, Sylwia Czukiewska¹, Lia Chappell⁵, Thierry Voet^{5,6}, Geert Michel⁷, Naihe Jing^{3,8}, David M. Glover⁹ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1*}

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 20 | AUGUST 2018 | 979-989 | www.nature.com/naturecellbiology

$$Esc + TSc + XENc = Embryons ETX$$

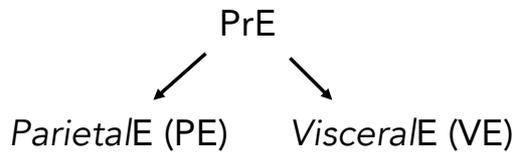
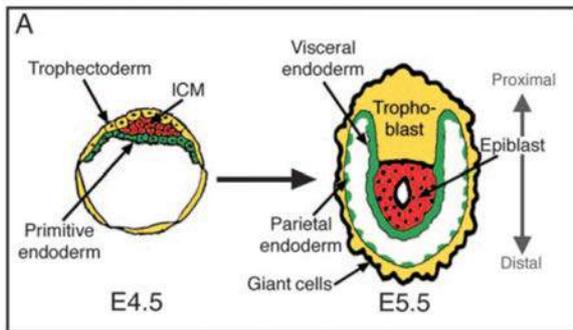
(XENc: endoderme extra-embryonnaire)



Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts

Tilo Kunath^{1,2,*}, Danielle Arnaud³, Gary D. Uy⁴, Ikuhiro Okamoto⁵, Corinne Chureau³, Yojiro Yamanaka¹, Edith Heard⁵, Richard L. Gardner⁴, Philip Avner^{3,1} and Janet Rossant^{1,2,†}

Development 132, 1649-1661
Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/dev.01715



Materials and methods

XEN cell line derivation and culture conditions

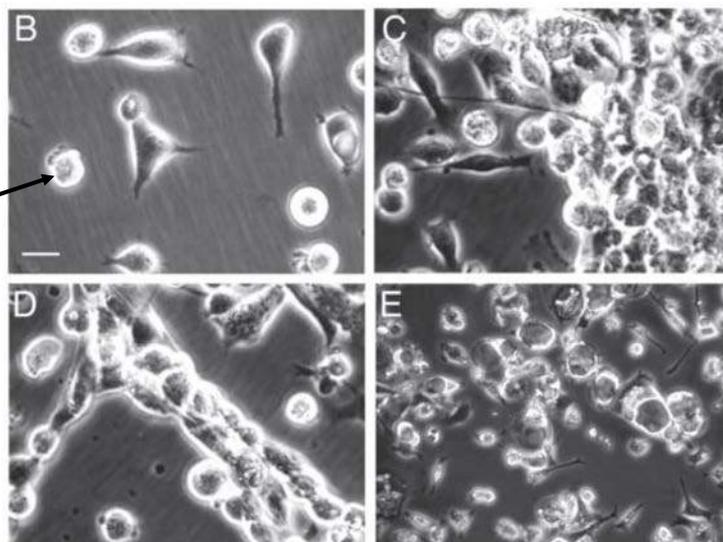
Extra-embryonic endoderm (XEN) cell lines were derived by three methods. Four lines were derived from the PO strain (Oxford University, Oxford). E3.5 blastocysts, hemizygous for the ROSA26 βgeo transgene (Zambrowicz et al., 1997), were subjected to immunosurgery to isolate their inner cell masses (ICMs) (Hogan et al., 1994; Lin, 1969). ICM pairs were aggregated and incubated overnight to obtain mini blastocysts, which were plated on embryonic fibroblasts (EMFIs) in TS cell line derivation conditions (Uy et al., 2002). The resulting blastocyst outgrowths were disaggregated 2-3 days after attachment. Although TS cell colonies were present, the vast majority of the cells were XEN cells. The XEN cell lines were designated IM5A1, IM8A1, IM8A2 and IM9C4. In the second method, XEN cell lines were derived from wild-type ICR embryos. E3.5 blastocysts were plated in four-well plates on EMFIs in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (CanSera, Rexdale, Canada), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 mg/ml each of penicillin/streptomycin (all from Gibco), 100 μM β-mercaptoethanol (Sigma), 25 ng/ml human recombinant FGF4 (hrFGF4) and 1 μg/ml heparin (both from Sigma). The medium was changed every 3 days and the blastocyst outgrowths were not disaggregated. After 15 days, XEN cells, observed in half the cultures, were passaged 1:1 onto new EMFIs in four-well plates. Three XEN cell lines, XEN1-2, XEN1-3 and XEN1-4, derived in this manner, were routinely cultured on EMFIs in medium without FGF4 and heparin or on gelatin (0.1% porcine skin gelatin, Sigma) supplemented with 70% EMFI-conditioned medium (EMFI-CM) (Tanabe et al., 1998). A third series of XEN lines was isolated from

Méthode 1
Méthode 2

Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts

Tilo Kunath^{1,2,*}, Danielle Arnaud³, Gary D. Uy⁴, Ikuhiro Okamoto⁵, Corinne Chureau³, Yojiro Yamanaka¹, Edith Heard⁵, Richard L. Gardner⁴, Philip Avner^{3,1} and Janet Rossant^{1,2,†}

Development 132, 1649-1661
Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/dev.01715



'Embryons-ETX'; un mélange de trois types de cellules

Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures

Berna Sozen^{1,2,3}, Gianluca Amadei^{1,2}, Andy Cox¹, Ran Wang¹, Ellen Na^{1,2}, Sylwia Czukiewska¹, Lia Chappell¹, Thierry Voet^{1,2}, Geert Michel¹, Naihe Jing^{1,2}, David M. Glover¹ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,2*}

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 20 | AUGUST 2018 | 979-989 | www.nature.com/naturecellbiology

ETS:

This is a random single cell seeding protocol on Matrigel.

*for glass bottom dishes (35mm) : 3000 ES + 3000 TS cells

*for 8-well ibidi u-plate: 1000 ES + 1000 TS cells.

ETX:

This is an AggreWell protocol. A well has 1200 microwells inside, so number of cells per cell type multiplied 1200 times. We mix 6000 ES, 19200 TS, 5400 XEN cells with the expectation of each microwell will have about 5 ES, 16 TS, 4 XEN cells. (So 1 ETX structure comes from 5 ES, 16 TS, 4 XEN cells).

$$Esc + TSc + XENc = Embryons ETX$$

Methodes:

ES and TS cell colonies were dissociated to single cells by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37 °C for 3 min. Cells were pelleted by centrifugation for 4 min at 1,000 r.p.m. and resuspended in MEF-conditioned ETX medium (C-ETX, as above). Cell suspension was pre-incubated at 37 °C in 5% CO₂ on gelatinized tissue-culture-grade plates for 30 min to remove MEFs until re-collection of ES and TS cell suspensions. Meanwhile, XEN cells were dissociated to single cells by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37 °C for 3 min, and pelleted by centrifugation for 4 min/1,000 r.p.m. and resuspended in C-ETX medium. A total of 7,200 ES cells per well, 19,200 TS cells per well and 5,400 XEN cells per well were counted using a haemocytometer. ES, TS and XEN cell suspensions were then mixed and repelleted. The cell mixture was resuspended in ETX medium (C-ETX medium) consisting of 70% MEF-conditioned DMEM with 12.5% FBS, 2 mM GlutaMax, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 0.02 M HEPES, plus ROCK inhibitor (Y27632; Stemgent, 5 nM), and added dropwise to the well. The AggreWell plate was centrifuged for 3 min at 100g, outside wells were filled with PBS to prevent evaporation, and plates were placed at 37 °C and 5% CO₂. On the following day (day 1), 1 ml of medium from each well was slowly removed and replaced with 1 ml of fresh medium without ROCK inhibitor. This step was performed a second time to fully remove the ROCK inhibitor. On day 2, 1 mL of C-ETX medium was replaced with 1 mL of fresh medium. On day 3, the media was changed to IVC1 (Cell Guidance Systems) by removing 1.2 mL of media and replacing it with 1.5 mL of IVC1 medium. On day 4, IVC1 was replaced with IVC2 by removing 1.2 mL of media and replacing it with 1.5 mL of IVC2 (Cell Guidance Systems). On days 5 and 6, 1 mL of IVC2 was replaced with 1 mL of fresh IVC2.

7'200 cellules ES
19'000 cellules TS
5'400 cellules XEN

Agrégats et séparation

'Embryons-ETX'; un mélange de trois types de cellules

Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures

Berna Sozen^{1,2,3}, Gianluca Amadei^{1,2}, Andy Cox¹, Ran Wang¹, Ellen Na^{1,2}, Sylwia Czukiewska¹, Lia Chappell¹, Thierry Voet^{1,2}, Geert Michel¹, Naihe Jing^{1,2}, David M. Glover¹ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,2*}

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 20 | AUGUST 2018 | 979-989 | www.nature.com/naturecellbiology

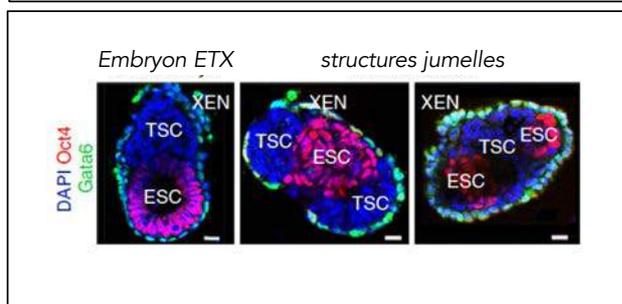
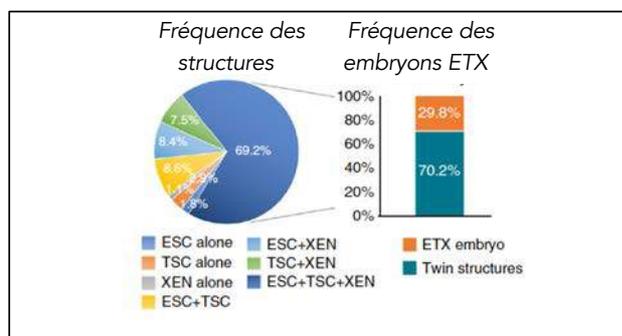
$$Esc + TSc + XENc = Embryons ETX$$

Methodes:

ES and TS cell colonies were dissociated to single cells by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37 °C for 3 min. Cells were pelleted by centrifugation for 4 min at 1,000 r.p.m. and resuspended in MEF-conditioned ETX medium (C-ETX, as above). Cell suspension was pre-incubated at 37 °C in 5% CO₂ on gelatinized tissue-culture-grade plates for 30 min to remove MEFs until re-collection of ES and TS cell suspensions. Meanwhile, XEN cells were dissociated to single cells by incubation with 0.05% trypsin-EDTA at 37 °C for 3 min, and pelleted by centrifugation for 4 min/1,000 r.p.m. and resuspended in C-ETX medium. A total of 7,200 ES cells per well, 19,200 TS cells per well and 5,400 XEN cells per well were counted using a haemocytometer. ES, TS and XEN cell suspensions were then mixed and repelleted. The cell mixture was resuspended in ETX medium (C-ETX medium) consisting of 70% MEF-conditioned DMEM with 12.5% FBS, 2 mM GlutaMax, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 0.02 M HEPES, plus ROCK inhibitor (Y27632; Stemgent, 5 nM), and added dropwise to the well. The AggreWell plate was centrifuged for 3 min at 100g, outside wells were filled with PBS to prevent evaporation, and plates were placed at 37 °C and 5% CO₂. On the following day (day 1), 1 ml of medium from each well was slowly removed and replaced with 1 ml of fresh medium without ROCK inhibitor. This step was performed a second time to fully remove the ROCK inhibitor. On day 2, 1 mL of C-ETX medium was replaced with 1 mL of fresh medium. On day 3, the media was changed to IVC1 (Cell Guidance Systems) by removing 1.2 mL of media and replacing it with 1.5 mL of IVC1 medium. On day 4, IVC1 was replaced with IVC2 by removing 1.2 mL of media and replacing it with 1.5 mL of IVC2 (Cell Guidance Systems). On days 5 and 6, 1 mL of IVC2 was replaced with 1 mL of fresh IVC2.

7'200 cellules ES
19'000 cellules TS
5'400 cellules XEN

Agrégats et séparation

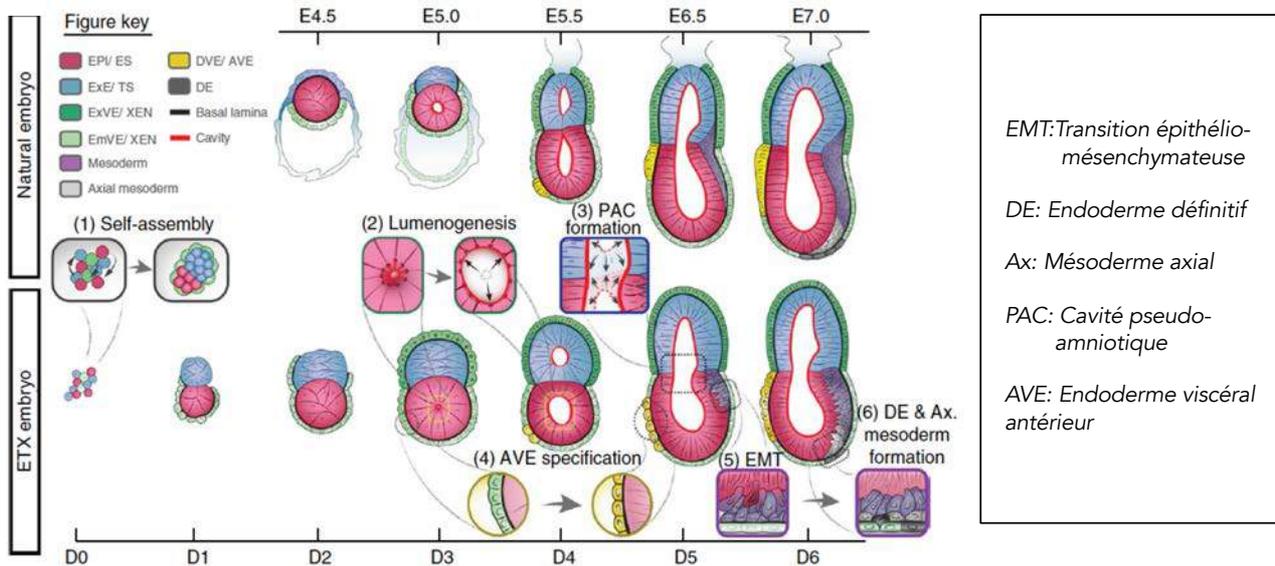


Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures

Berna Sozen^{1,2,3}, Gianluca Amadei^{1,2}, Andy Cox¹, Ran Wang¹, Ellen Na^{1,2}, Sylwia Czukiewska¹, Lia Chappell¹, Thierry Voet^{1,2}, Geert Michel¹, Naihe Jing^{1,2}, David M. Glover¹ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,2}

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 20 | AUGUST 2018 | 979-989 | www.nature.com/naturecellbiology

L'embryon-ETX est capable d'EMT et de produire du mésoderme axial



Quid de l'embryon humain?

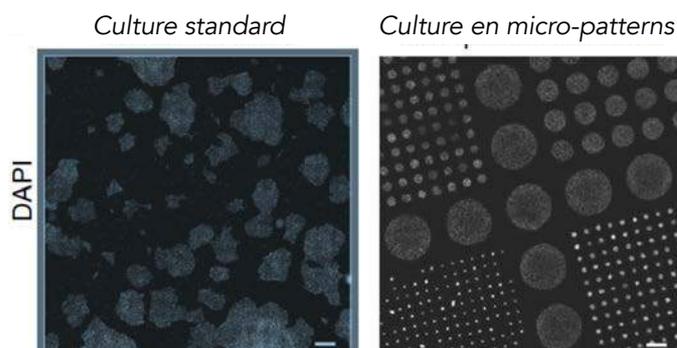
ARTICLES

A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells

Aryeh Warmflash¹⁻³, Benoit Sorre¹⁻³, Fred Etoc^{1,2}, Eric D Siggia¹ & Ali H Brivanlou²

NATURE METHODS | VOL.11 NO.8 | AUGUST 2014 | 847

- *Les cellules ES humaines (hESCs) peuvent être différenciées in vitro (voies BMP/Wnt)
- *Mais, différenciation très hétérogène, agrégats avec des types cellulaires différents (et donc résultats contestés)
- *Tentative de pousser des agrégats de cellules en environnement 'micro-patterned' donc avec des contraintes extérieures qui poussent à l'organisation



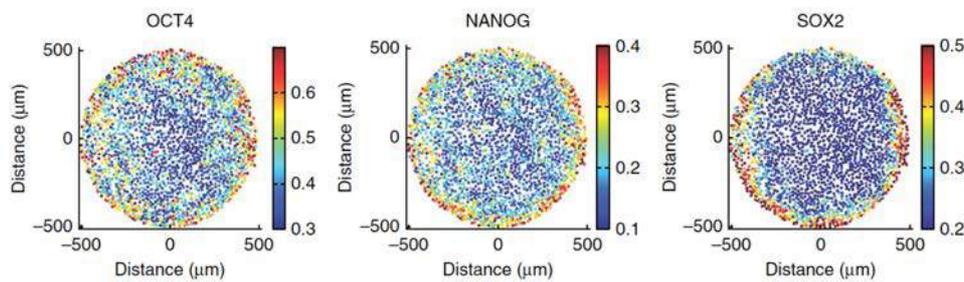
ARTICLES

A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells

Aryeh Warmflash^{1,3}, Benoit Sorre^{1,3}, Fred Etoc^{1,2}, Eric D Siggia¹ & Ali H Brivanlou²

NATURE METHODS | VOL.11 NO.8 | AUGUST 2014 | 847

- *Les cultures en micro-patterns donnent des agrégats mieux organisés et avec une plus grande fréquence et une plus grande constance
- *Utilisation de capture par microscope (chaque cellule) pour étudier l'organisation spatiale de ces agrégats
- *Les cultures de hESCs maintiennent les facteurs de pluripotence (OCT4, NANOG, SOX2) qui sont exprimés plus fortement vers la périphérie des agrégats.



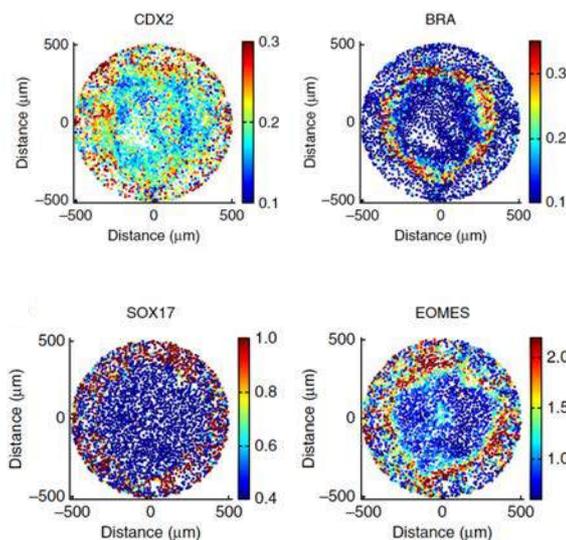
ARTICLES

A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells

Aryeh Warmflash^{1,3}, Benoit Sorre^{1,3}, Fred Etoc^{1,2}, Eric D Siggia¹ & Ali H Brivanlou²

NATURE METHODS | VOL.11 NO.8 | AUGUST 2014 | 847

- *Traitement des culture avec BMP4 (50ng/ml) conduit à une différenciation marquée en 24h avec des signes d'auto-organisation entre types cellulaires
- *Cultures en micro-pattern o/n, 42h de traitement avec BMP4 et analyse de l'expression:



CDX2: TE-like

BRA (T): Mésoderme

SOX17: Endoderme définitif

EOMES: mésendoderme

La présence et l'exclusion des marqueurs définissent des zones distinctes

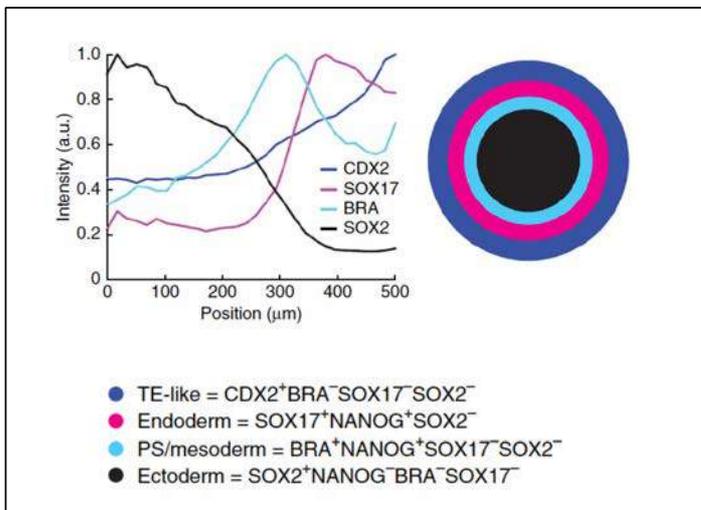
A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells

Aryeh Warmflash^{1,2}, Benoit Sorre^{1,2}, Fred Etoc^{1,2}, Eric D Siggia¹ & Ali H Brivanlou²

NATURE METHODS | VOL.11 NO.8 | AUGUST 2014 | 847

*Traitement des culture avec BMP4 (50ng/ml) conduit à une différenciation marquée en 24h avec des signes d'auto-organisation entre types cellulaires

*Cultures en micro-pattern o/n, 42h de traitement avec BMP4 et analyse de l'expression:



CDX2: TE-like

BRA (T): Mésoderme

SOX2: TE-like

EOMES: mésendoderme

La présence et l'exclusion des marqueurs définissent des zones distinctes

Développement de l'embryon 'post-gastrulation'

© 2017. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2017) 144, 3894-3906 doi:10.1242/dev.150391



STEM CELLS AND REGENERATION

RESEARCH ARTICLE

Anteroposterior polarity and elongation in the absence of extra-embryonic tissues and of spatially localised signalling in gastruloids: mammalian embryonic organoids

David A. Turner^{1,*}, Mehmet Girgin², Luz Alonso-Crisostomo¹, Vikas Trivedi¹, Peter Baillie-Johnson^{1,3}, Cherise R. Glodowski¹, Penelope C. Hayward¹, Jérôme Collignon⁴, Carsten Gustavsen⁵, Palle Serup⁶, Benjamin Stevenon¹, Matthias P. Lutolf² and Alfonso Martínez Arias^{1,*}

*mESc cultivées en milieu +LIF/2i

*Transférées en milieu N2B27 (neurobasal) et agrégat de cellules ES (app. 300-500 cellules) formant une boule

*Après 48h, traitement au Chiron (agoniste de la voie Wnt) pour 24h

protocolexchange | nature research

Method Article

Generating Gastruloids from Mouse Embryonic Stem Cells

Denis Duboule* Alfonso Martínez Arias* Mehmet Girgin David Andrew Turner Peter Baillie-Johnson Anne-Catherine Cossy Leonardo Beccari Naomi Moris Matthias Lutolf

Share the most recent version:

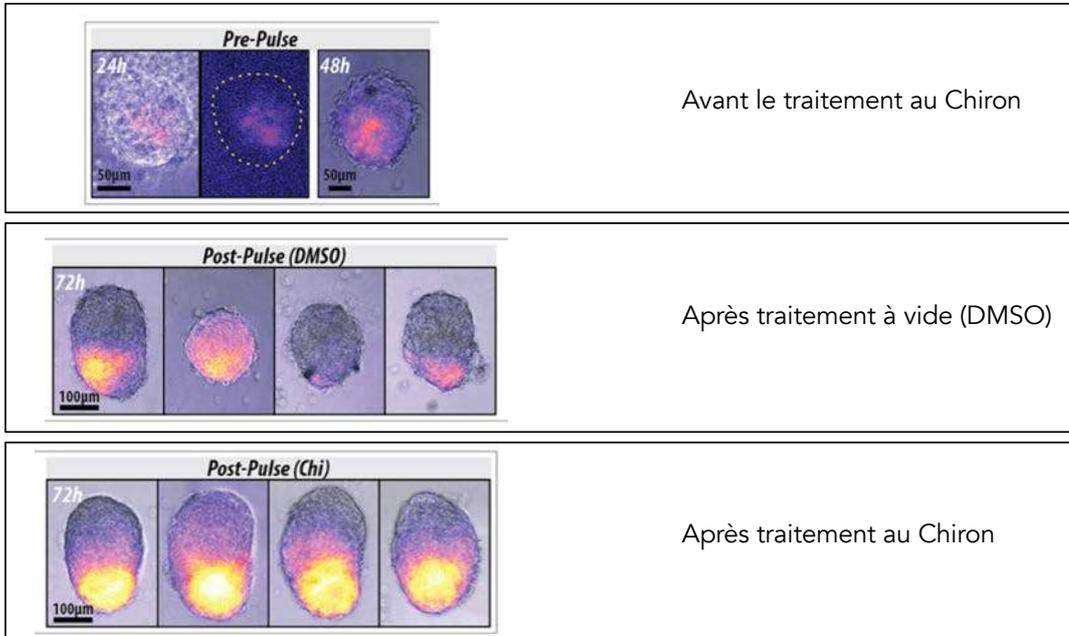
CITE

Développement de l'embryon 'post-gastrulation'

Anteroposterior polarity and elongation in the absence of extra-embryonic tissues and of spatially localised signalling in gastruloids: mammalian embryonic organoids

David A. Turner^{1,*}, Mehmet Girgin², Luz Alonso-Crisostomo¹, Vikas Trivedi¹, Peter Baillie-Johnson^{1,3}, Cherise R. Glodowski¹, Penelope C. Hayward¹, Jérôme Collignon⁴, Carsten Gustavsen⁵, Palle Serup⁶, Benjamin Steventon¹, Matthias P. Lutolf⁶ and Alfonso Martinez Arias^{1,*}

Cellules ES souris: BRA:GFP

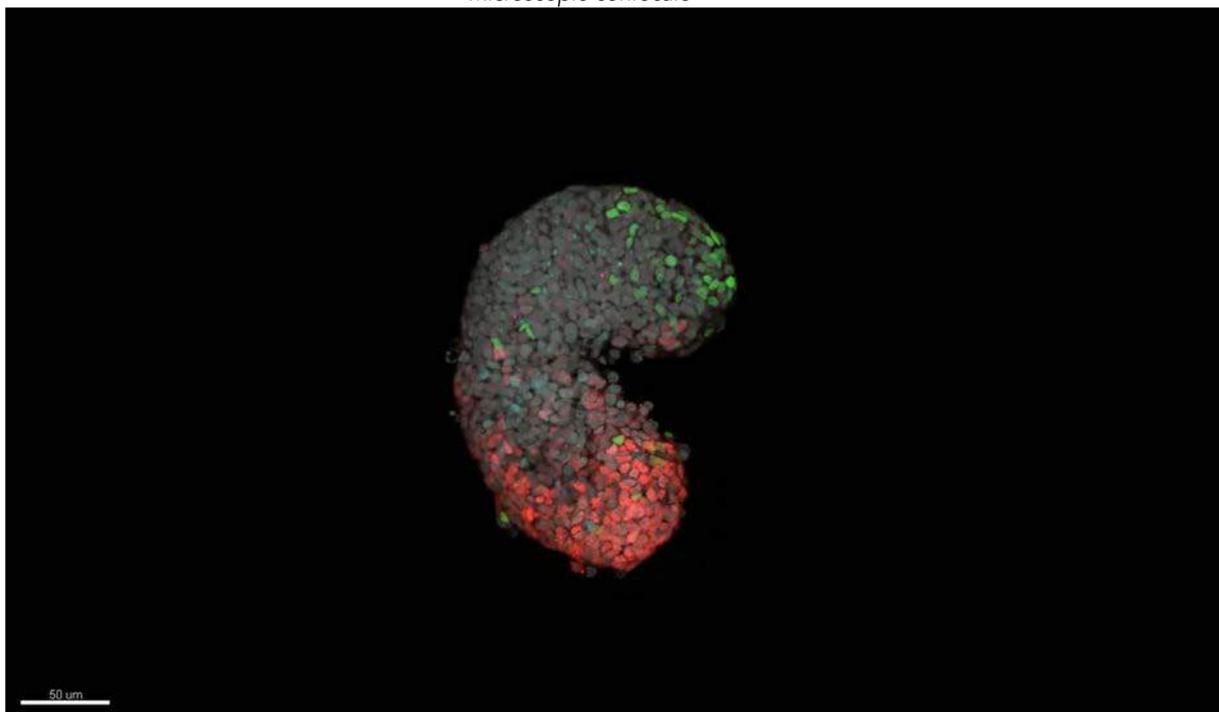


Développement de l'embryon 'post-gastrulation'

■ BRA (T) mésoderme

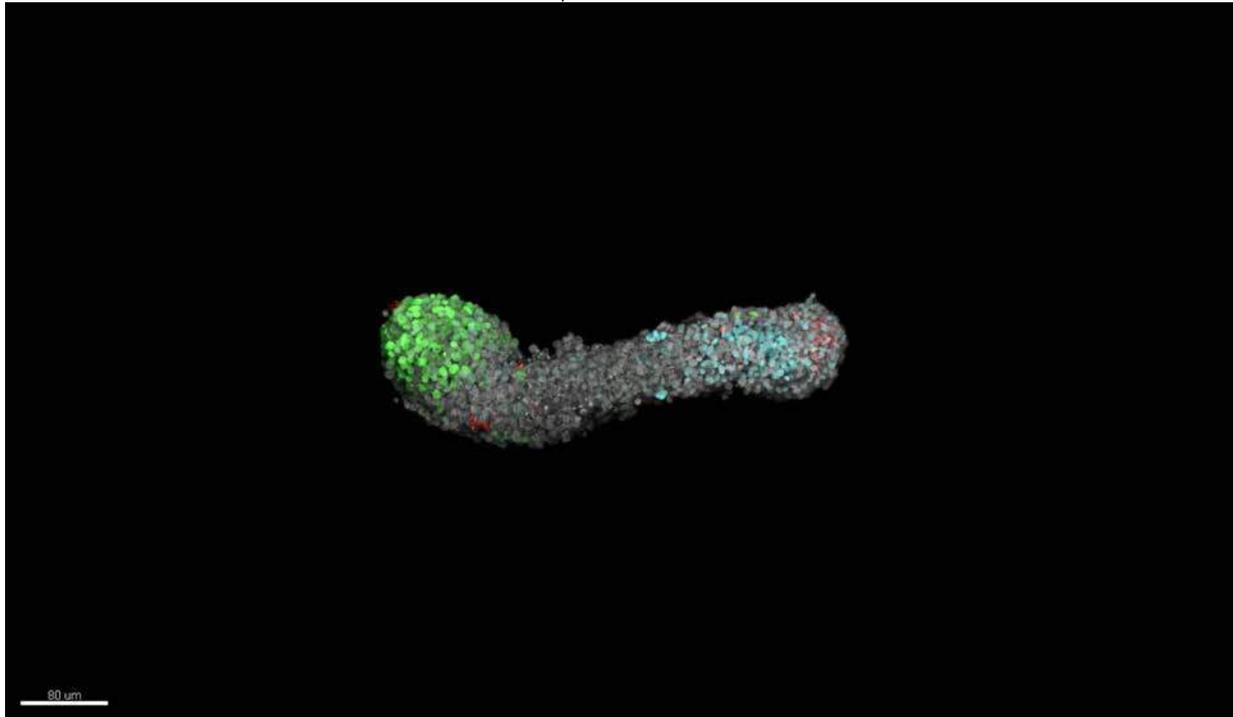
■ GATA6 (futures cellules cardiaques?)

Microscopie confocale



Développement de l'embryon 'post-gastrulation'

■ BRA (T) mésoderme ■ Progéniteurs neurones ■ GATA6 (futures cellules cardiaques?)
Microscopie confocale



Beccari, Moris, Girgin et al., Nature 2018

Développement du 'Gastruloïde'

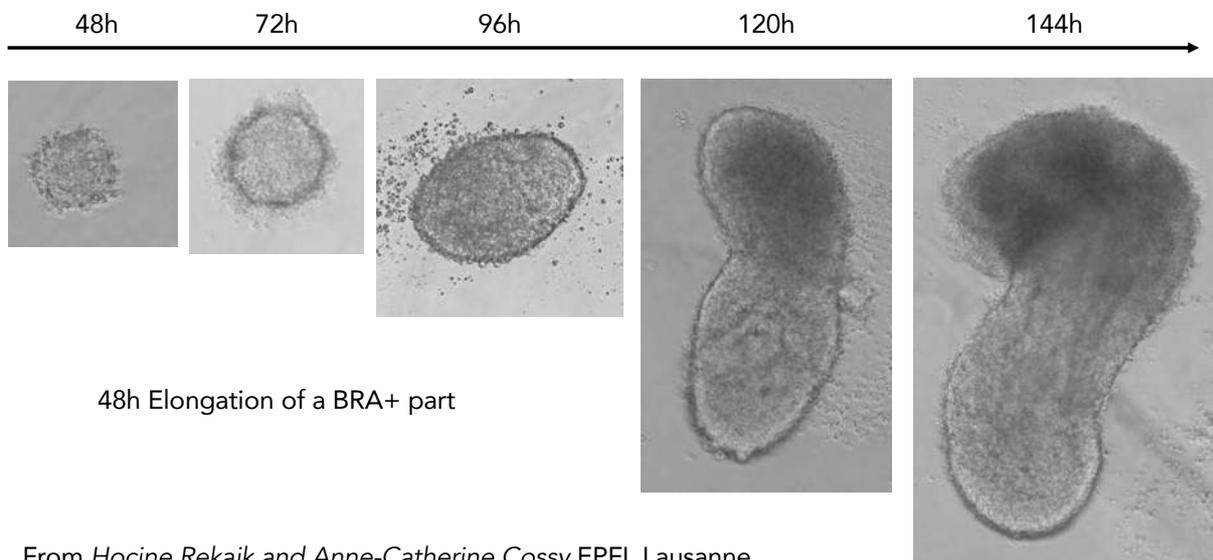
LETTER

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0578-0>

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids

Leonardo Beccari^{1,6}, Naomi Moris^{2,6}, Mehmet Girgin^{3,6}, David A. Turner², Peter Baillie-Johnson^{2,5}, Anne-Catherine Cossy⁴, Matthias P. Lutolf⁴, Denis Duboule^{1,4,7*} & Alfonso Martinez Arias^{2,7*}

11 OCTOBER 2018 | VOL 562 | NATURE | 273



From Hocine Rekaik and Anne-Catherine Cossy EPFL Lausanne

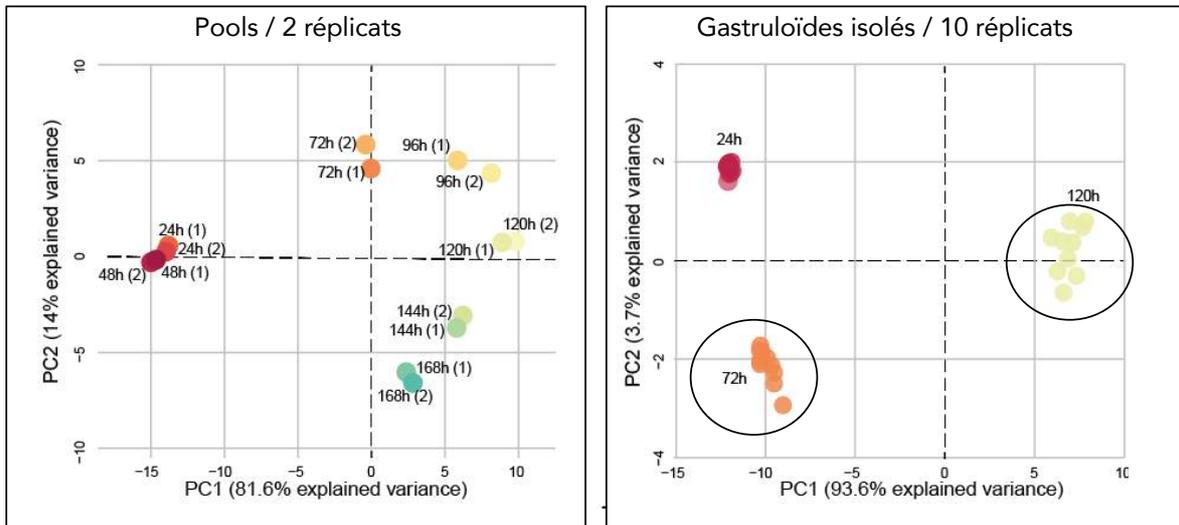
Gastruloïdes; reproductibilité des cultures

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïdes

Beccari et al., Nature 2018

Séquences des ARNs de gastruloïdes en pools ou isolés

*Analyse en composantes principales (PCA)



Les cultures de gastruloïdes sont relativement homogènes

Développement du 'Gastruloïde'

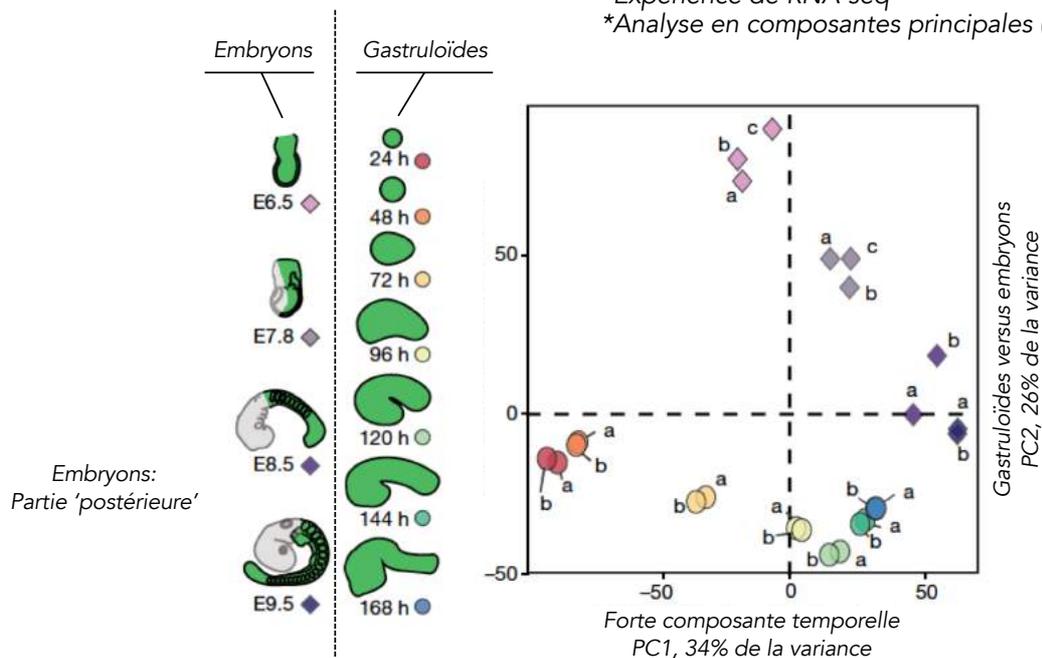
Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïdes

Beccari et al., Nature 2018

Ressemblance avec l'embryon normal

*Expérience de RNA-seq

*Analyse en composantes principales (PCA)



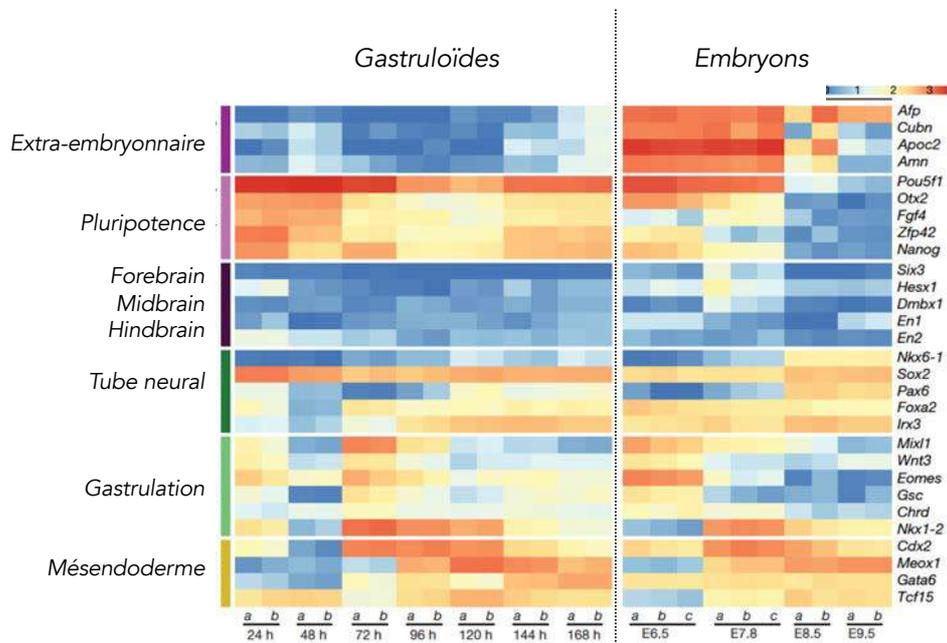
*Bon clustering sur PC1 (temps): corrélation entre la progression des profils d'expression des gastruloïdes et le développement embryonnaire. * Convergence des programmes de transcription aux stades tardifs

Gastruloïdes; activation des programmes génétiques

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïds
Beccari et al., Nature 2018

Dynamique des programmes génétiques comparable entre les gastruloïdes et les embryons

*Pas de programme 'extra-embryonnaire'



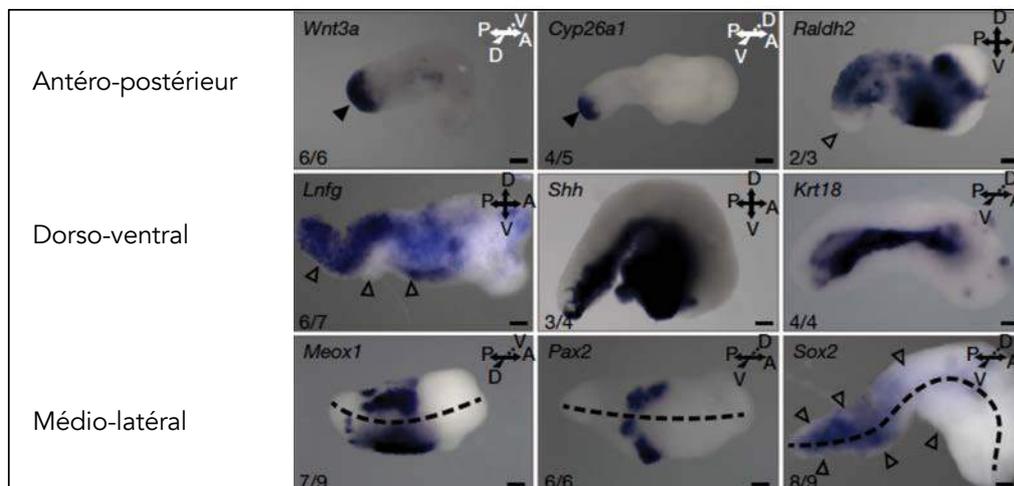
Polarisation axiale des gastruloïdes

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïds
Beccari et al., Nature 2018

Utilisation de gènes marqueurs des trois axes principaux
Un exemple pour chacun des axes:

Gastruloïdes à 144h

Axes:



*Les gastruloïdes sont polarisés selon les trois axes principaux (auto-organisation)

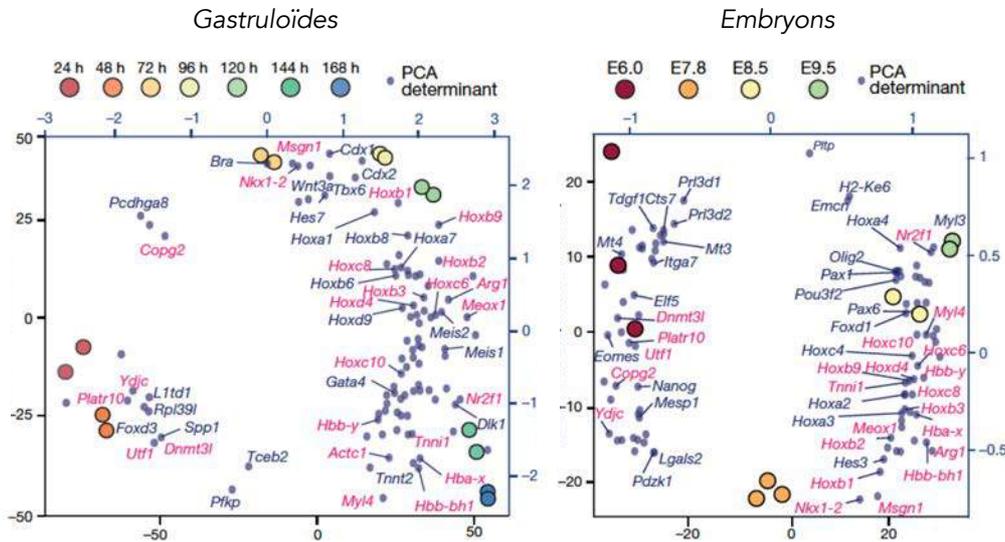
Gastruloïdes; activation des programmes génétiques

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïdes

Beccari et al., Nature 2018

Dynamique des programmes génétiques comparable entre les gastruloïdes et les embryons

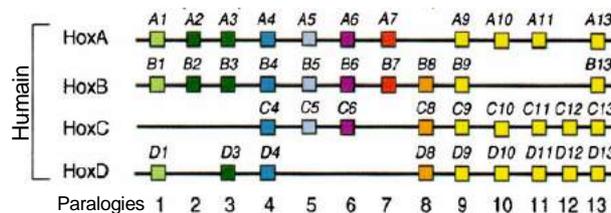
*Analyse des 100 principaux déterminants (gènes) de la PCA (les 100 gènes qui varient le plus)



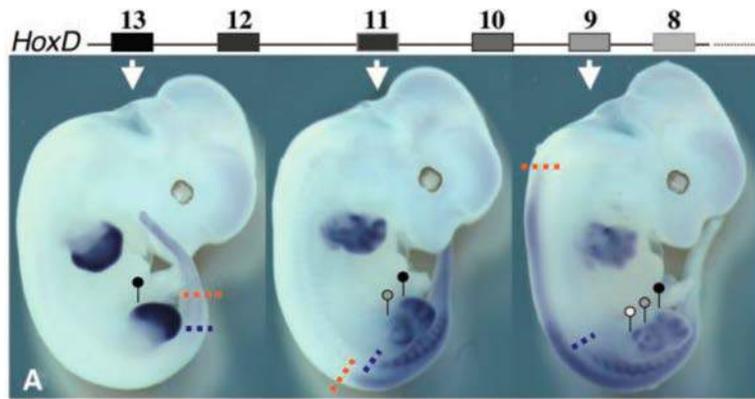
Les gènes en rouge (25) sont identifiés séparément dans les deux analyses d'ARNs et illustrent donc le fait que les extensions de l'axe chez les gastruloïdes mobilisent des gènes identiques à ceux utilisés par les embryons. **Beaucoup de gènes de la famille Hox!**

39 gènes Hox chez les mammifères

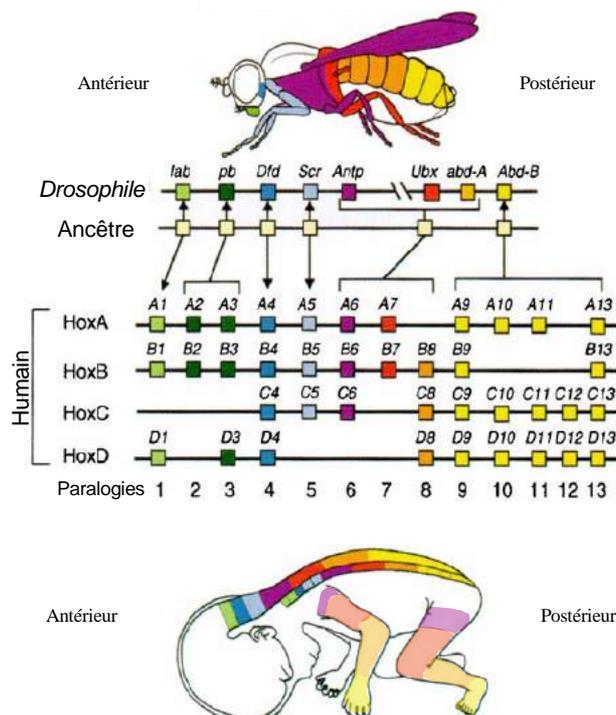
- *4 clusters issus de duplications génomiques
- *13 groupes de **paralogie**
- *Seulement 3 groupes 'complets' (4, 9 et 13)
- *Vraisemblablement A/B et C/D..

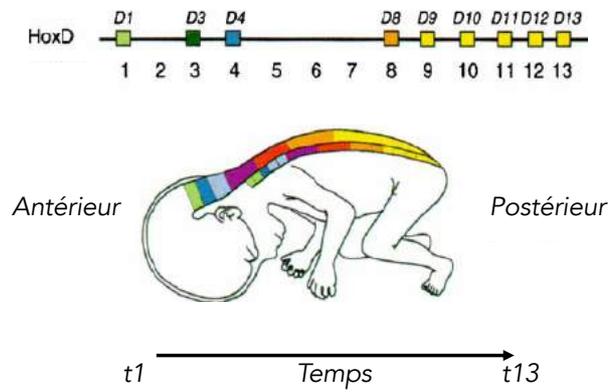


*Les domaines d'expression sont de plus en plus postérieurs en progressant le long du cluster



Modifié de Krnita and Duboule, Science (2003)





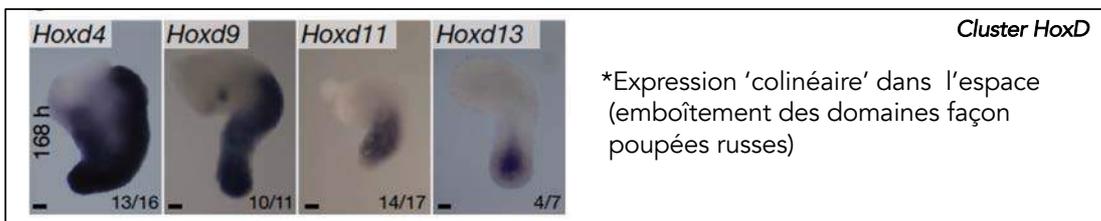
Modifié de: <https://www.researchgate.net>

Colinéarité d'expression Hox chez les gastruloïdes

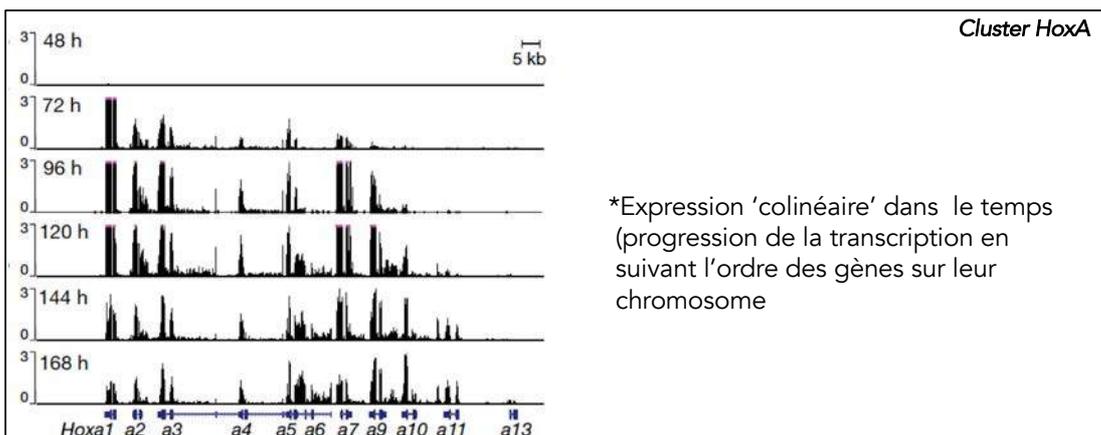
Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloïdes

Beccari et al., Nature 2018

L'axe antéro-postérieur est organisé par les gènes Hox qui sont activés dans le temps et dans l'espace comme chez l'embryon



*Expression 'colinéaire' dans l'espace (emboîtement des domaines façon poupées russes)



*Expression 'colinéaire' dans le temps (progression de la transcription en suivant l'ordre des gènes sur leur chromosome)

Hoxd9-mCherry

Hocine Rekaik, EPFL Lausanne

96 h AA

Gastruloïdes à partir de cellules iPS



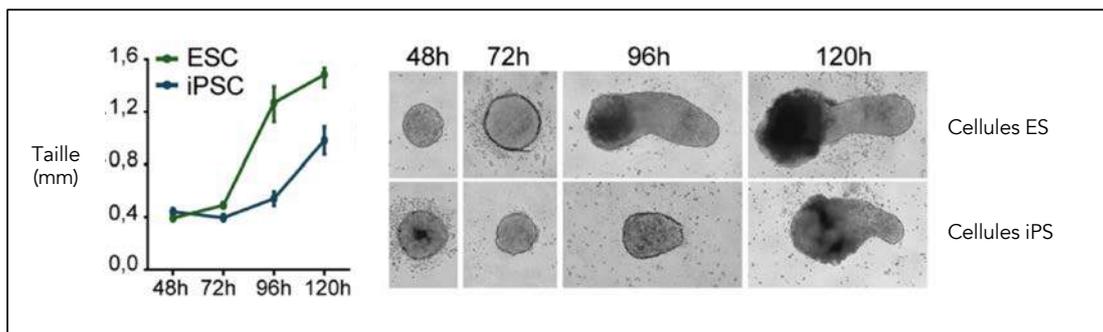
Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids

Beccari et al., Nature 2018

Des gastruloïdes peuvent être produits à partir de cellules iPS. Cependant:

- *Toutes les lignées ne sont pas compétente (peu le sont)
- *Les gastruloïdes obtenus ne sont pas aussi bien développés que lorsqu'ils dérivent de cellules ES

Problème technique ou intrinsèque?



Collège de France
Chaire: *Evolution des Génomes et du Développement*

Denis.Duboule@college-de-france.fr

Le cours 2019-2020 aura lieu
les 12, 19, 26 mai
et 2 juin 2020, 14h



 @Duboule