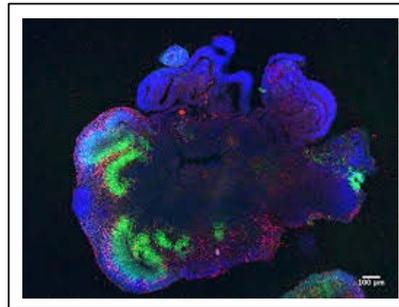
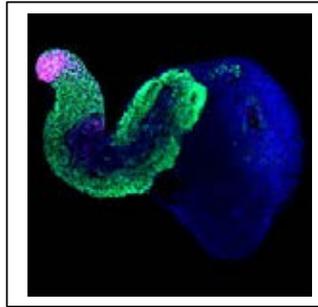


Denis Duboule

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



 @Duboule
 @CdF1530

Denis Duboule

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

Colloque 2019:

**Does regeneration recapitulate development?*

**La régénération récapitule-t-elle
le développement embryonnaire?*

15-16 mai 2019, 9h-18h
Amphithéâtre Guillaume Budé
(en commun avec le cours du Prof. Alain Prochiantz)

Denis Duboule

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

Denis.Duboule@college-de-france.fr

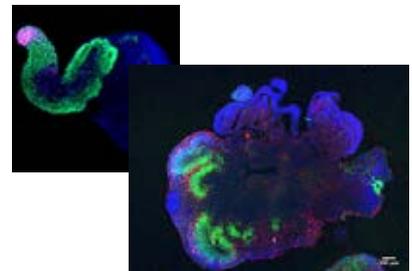
2018-2019

Organoïdes, embryoïdes: de cultures en trois dimensions aux modèles de développement et de pathologies



Cours 1
7 mai 2019

*Objectifs de ce cours
Programme du cours
Perspective historique
Caractéristiques principales*



Objectifs de ce cours 2019

*Ce cours a pour but général de vous familiariser avec l'études des organoïdes et des embryoïdes, de comprendre leur histoire matérielle et conceptuelle, ainsi que leur origine expérimentale et de les placer dans le contexte global de la recherche fondamentale actuelle en embryologie et en médecine.

*L'idée est de développer ces différents aspects en prenant comme support et comme exemples des travaux et publications parmi les plus actuels dans ce domaine de recherche, tout en gardant comme toile de fond les questions de la valeur heuristique de ces nouveaux modèles d'étude et de leurs applications possibles pour résoudre certains des défis d'importance qui se présentent à notre société dans le domaine biomédical.

Programme du cours

Introduction:	<ul style="list-style-type: none"> *Penser en trois dimensions *Définitions et bref historique
Caractéristiques principales:	<ul style="list-style-type: none"> *Types cellulaires *Architecture *Auto-organisation
Fabrication, ingénierie:	<ul style="list-style-type: none"> *Systèmes de cultures *Origines des cellules, tissus *Cellules souches ES et iPS
Organoïdes humains:	<ul style="list-style-type: none"> *Potentiel, utilisation clinique..
Organoïdes:	<ul style="list-style-type: none"> *Intestinaux *Cérébraux ('mini-brains') *Hépatiques *(Rétine ici et là..)
Cultures d'embryons:	<ul style="list-style-type: none"> *Blastoïdes *Embryoïdes (ETS, ETX, humains) *Gastruloïdes

Organoïdes

Introduction I:

Penser en trois dimensions

**Le développement embryonnaire est un processus complexe qui se déroule en trois (quatre) dimensions.*

**De nombreuses décisions concernant la différenciation des cellules et la formation des tissus et des organes (organogenèse) dépendent de l'architecture 3D de l'embryon (signaux, intégration..).*

**Ces phénomènes ne peuvent pas être reproduits en cultures de cellules 'classiques'*

**L'embryon mammifère lui-même est trop complexe pour en étudier les détails (accès, quantité, manipulation..) (paradoxe du réductionnisme embryologique: lignées cellulaires etc.. mais perte des architectures nécessaires à leurs développements...)*

**Mais aussi: les cultures de cellules 'classiques' ne permettent pas de criblages chimiques efficaces (drogues, médicaments... Wang et al., 1998; Weaver et al., 2002)*

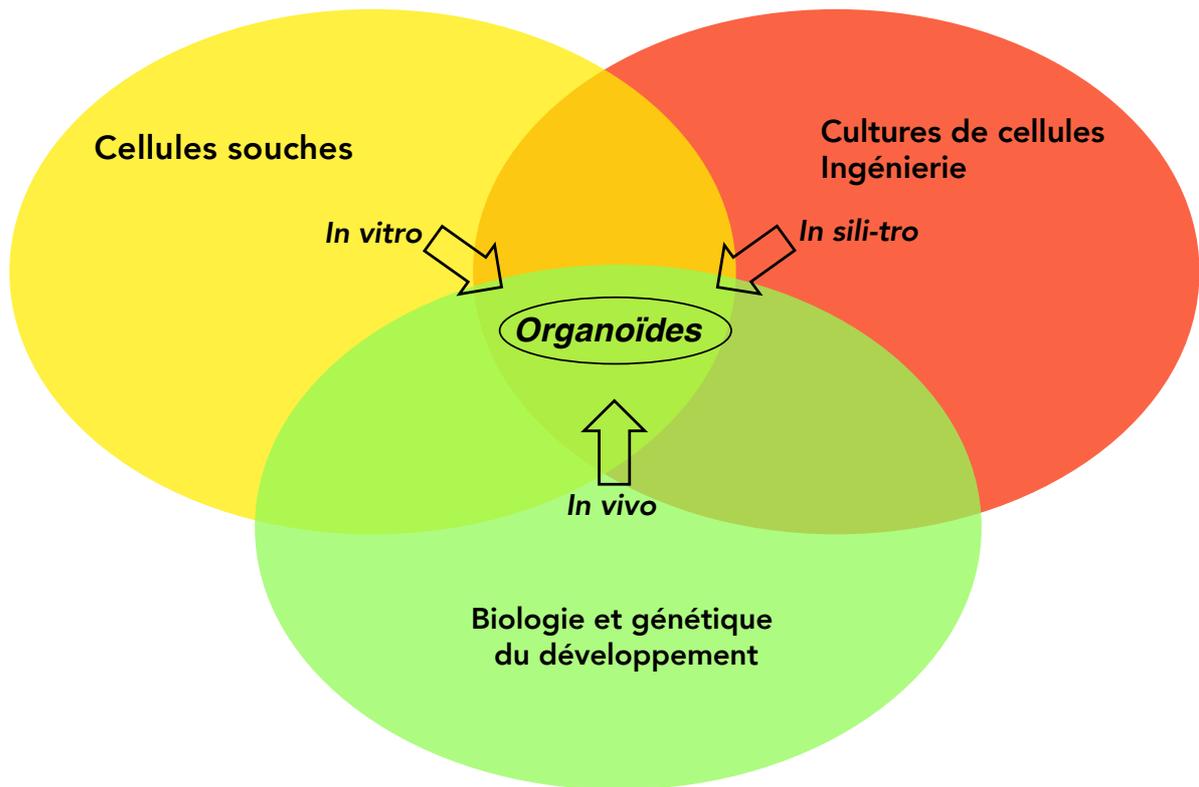
**D'où la nécessité de développer des systèmes de développement in vitro incluant une troisième (voire quatrième) dimension.*

'3D culture models' apparaissent vers la fin des années 1980 (Barcellos-Hoff et al. 1989; Petersen et al., 1992). Morceaux de tissus isolés par digestion et cultivés en gels 3D pour produire de pseudo-organes.

**Nécessité de développer des protocoles adéquats qui émergent grâce aux progrès conjoints de trois disciplines...*

Organoïdes: A l'interface de trois disciplines

Convergence vers la fin des années 1970, fin des années 1980



Modified from Matthias Lutolf, EPFL

Organoïdes: un pont entre l'in vitro et l'in vivo



Albrecht Dürer 1471-1528



Mus musculus 2018-2019

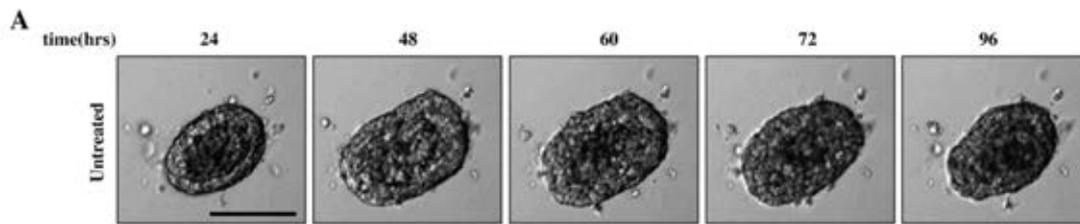
In vivo
traditionnel

Organoïdes

In vitro
traditionnel

Débuts des cultures en 3D. Explants de glande mammaire

Simian et al., 2001, *Development*, 128 and Fata et al., (2007) *Dev. Biol.* 306.



Méthodes

Isolation of primary mammary organoids

The 4th inguinal mammary glands were removed from 10 to 14 weeks old virgin Balb/c mice and minced with two parallel razor blades (approved by the Animal Welfare and Research Committee (AWRC) at Lawrence Berkeley Labs; animal protocol #0522). At this age the expansion of the ductal tree within the fat pad is complete and no terminal end buds exist. Minced tissue (4–8 glands) was

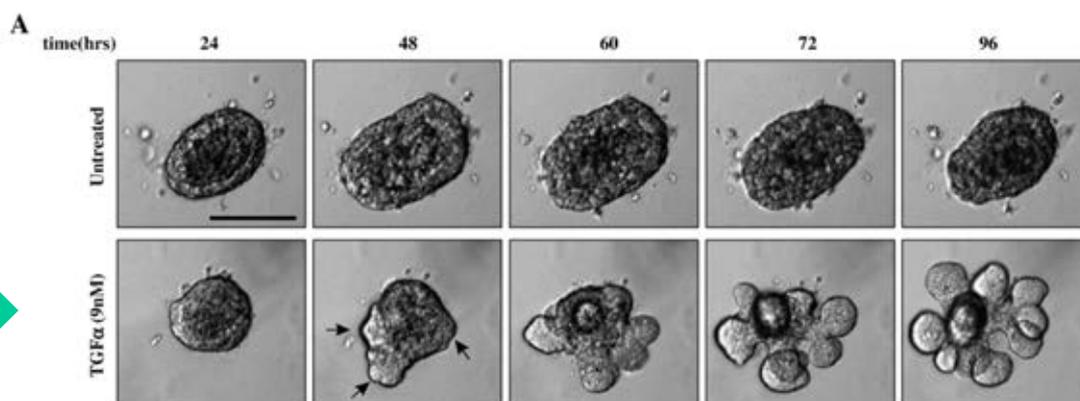
Résultats

TGF α induces branching morphogenesis in primary mammary organoids cultured within a 3D ECM gel

To examine mammary morphogenesis, we developed an organotypic 3D culture system consisting of primary mammary organoids (which contain both the epithelium and the myoepithelium, but not the adipogenic stroma) within a 3D laminin-rich extracellular matrix (3D IrECM; Matrigel). The

Débuts des cultures en 3D. Explants de glande mammaire

Simian et al., 2001, *Development*, 128 and Fata et al., (2007) *Dev. Biol.* 306.



*Sans traitement: Pas de morphogénèse

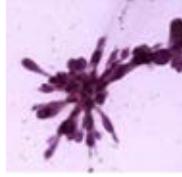
*Traitement avec du TGF α (9nM): Déclenchement d'une morphogénèse par bourgeonnement (similaire à la situation in vivo) (TGF α est exprimé dans l'épithélium mammaire et agit par l'intermédiaire des MAP Kinases ERK-1 et ERK-2)

Tissus adultes

Intestins
Sato et al., 2009



Glande mammaire
Linnemann et al., 2015

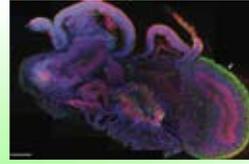


Estomac
Barker, Huch et al., 2010

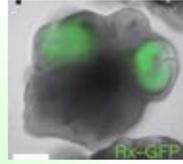


Tissus foetaux

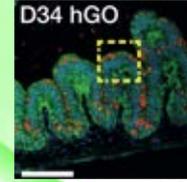
Cerveau
Lancaster et al., 2013



'optic cup'
Eiraku et al., 2011

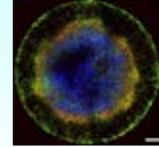


Estomac
McCracken et al., 2014

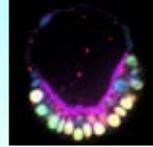


Développement précoce

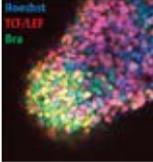
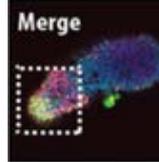
Embryon humain
Warmflash et al., 2014



Amnios
Shao et al., 2017



Gastruloïdes
van den Brink et al., 2014



Courtesy Matthias Lutolf, EPFL

Organoïdes

Introduction II:

Définition et bref historique

Définition(s) actuelle(s) du mot 'organoïde' (Simian and Bissell, 2016)



Dans les années 1950 et 60 le terme organoïde fait allusion soit à des structures sub-cellulaires, soit à des tumeurs soit à des agrégats cellulaires.

Ensuite:...les définitions varient selon les auteurs:

*..organoïd fait allusion à des explants primaires de tissus épithéliaux ..()..Aussi à des clones cellulaires dérivés de cellules souches épithéliales (sans cellules mésenchymateuses ..() .. ou aussi de co-cultures (épith-mésenchyme) de cellules dérivées de cellules ES ou iPS. (Shamir and Ewald, 2014)

*..organoïd..contenant plusieurs types cellulaires (Lancaster and Knoblich, 2014)

*..organoïd ..une structure en 3D dérivée de cellules souches et de types cellulaires spécifiques à un organe particulier, capable d'auto-organisation (Clevers, 2016)

*..organoïd.. Un cluster de cellules en 3D dérivé soit de tissu primaire, de cellules ES ou iPS, capable d'auto-organisation et de 'self-renewal' avec des fonctionnalités similaires au tissu d'origine (Fatehullah et al. (2016)

Publications avec 'organoïdes' dans le titre (organ..)

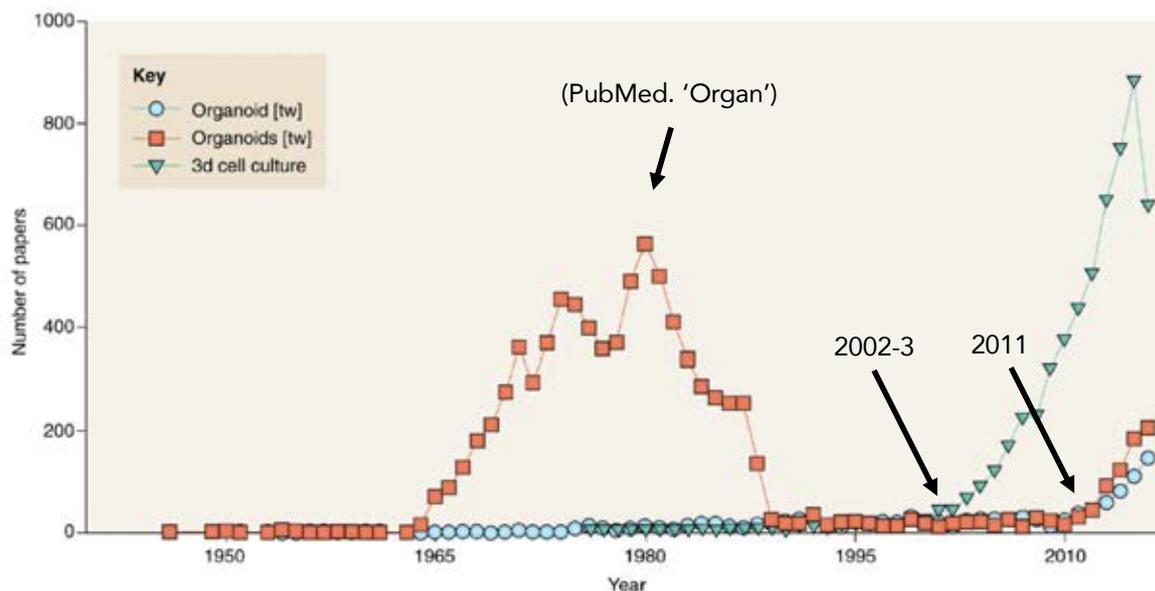
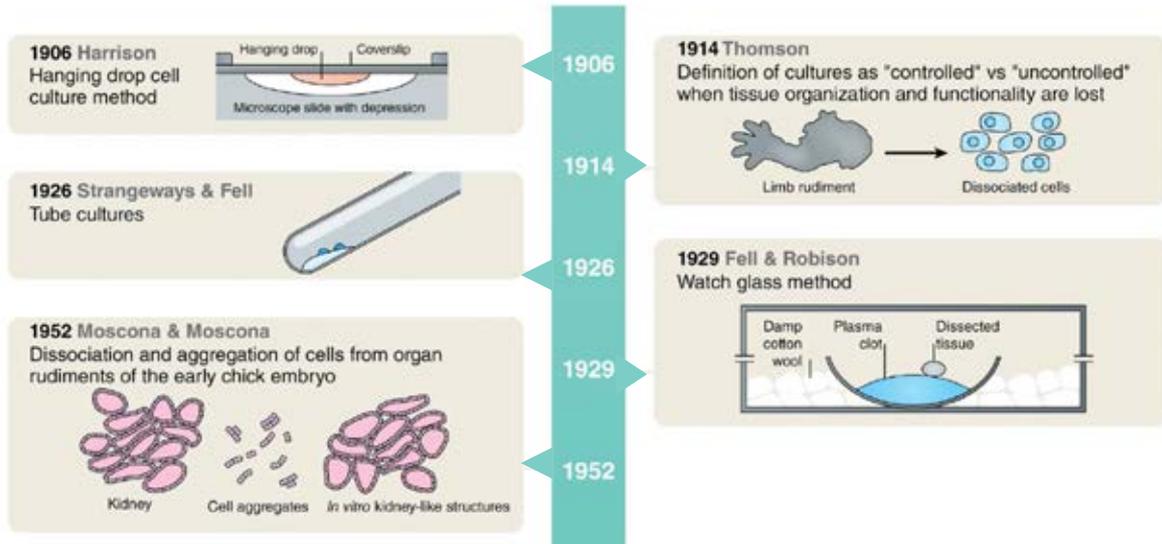


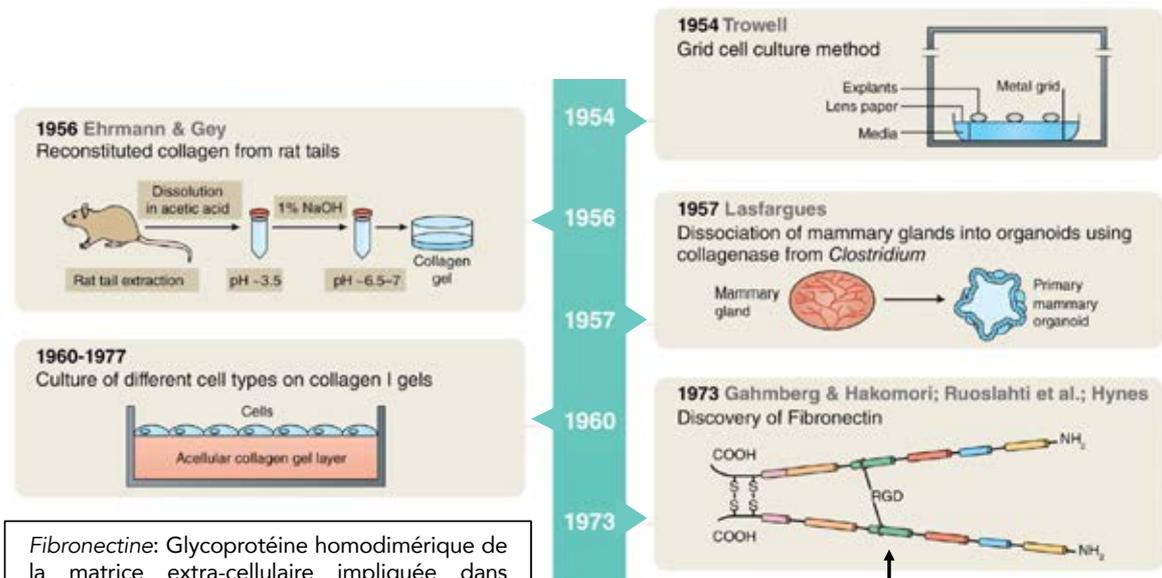
Figure 1. Number of publications per year on organoids and 3D cell cultures according to PubMed. The number of publications per year is graphed for the following PubMed searches: "organoids [tw]" is shown in red squares, "organoid [tw]" is shown in blue circles, and "3D cell culture" is shown in green triangles. Figure courtesy of Neil Smith.

Organoïdes: un bref historique (Simian and Bissell, 2016)



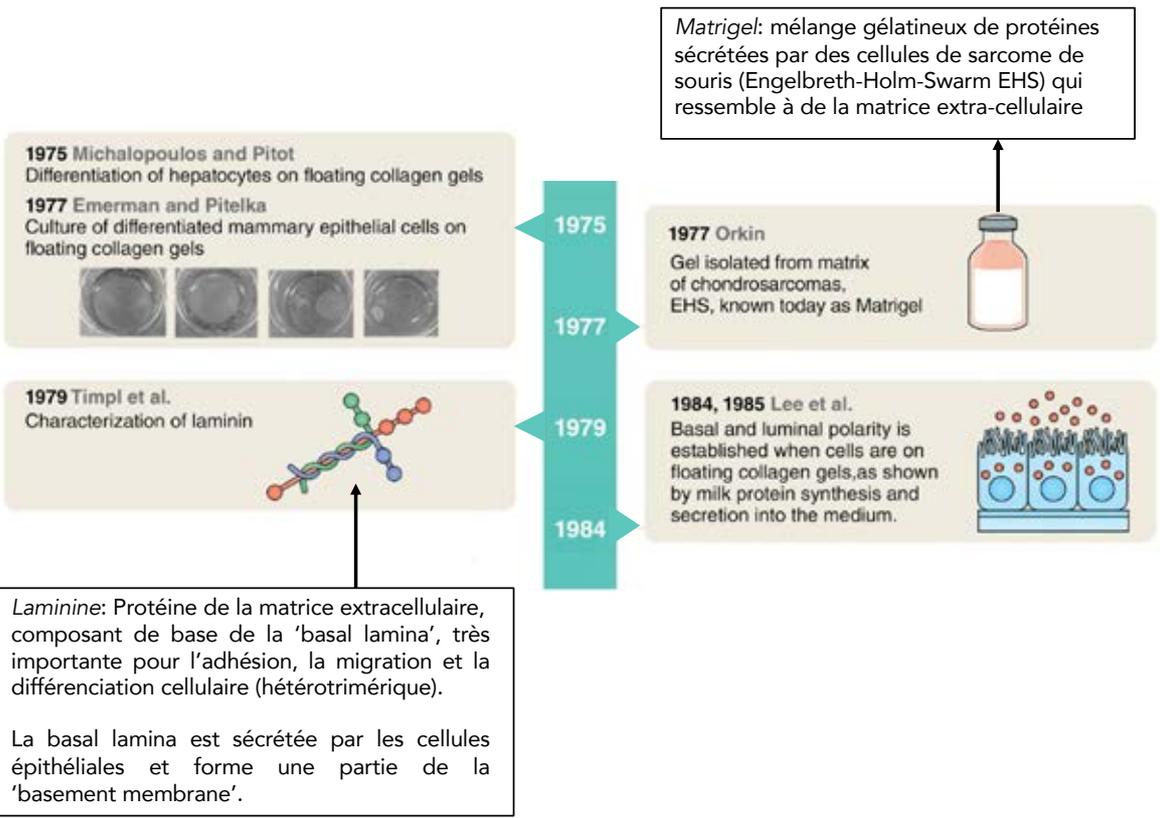
Les expériences montrant les capacités d'auto-organisation ou d'auto-réorganisation sont nombreuses dans l'histoire de la biologie du développement
Par ex. J. Holtfreter (1955), A. Gierer (1972)

Organoïdes: un bref historique (Simian and Bissell, 2016)

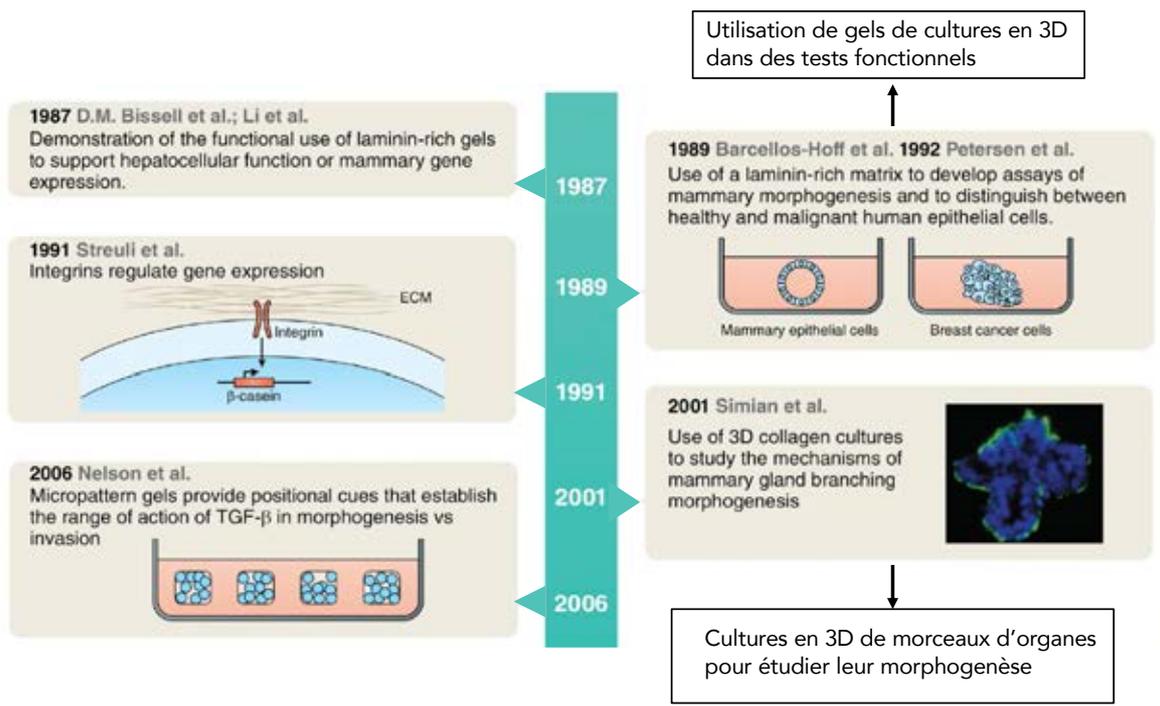


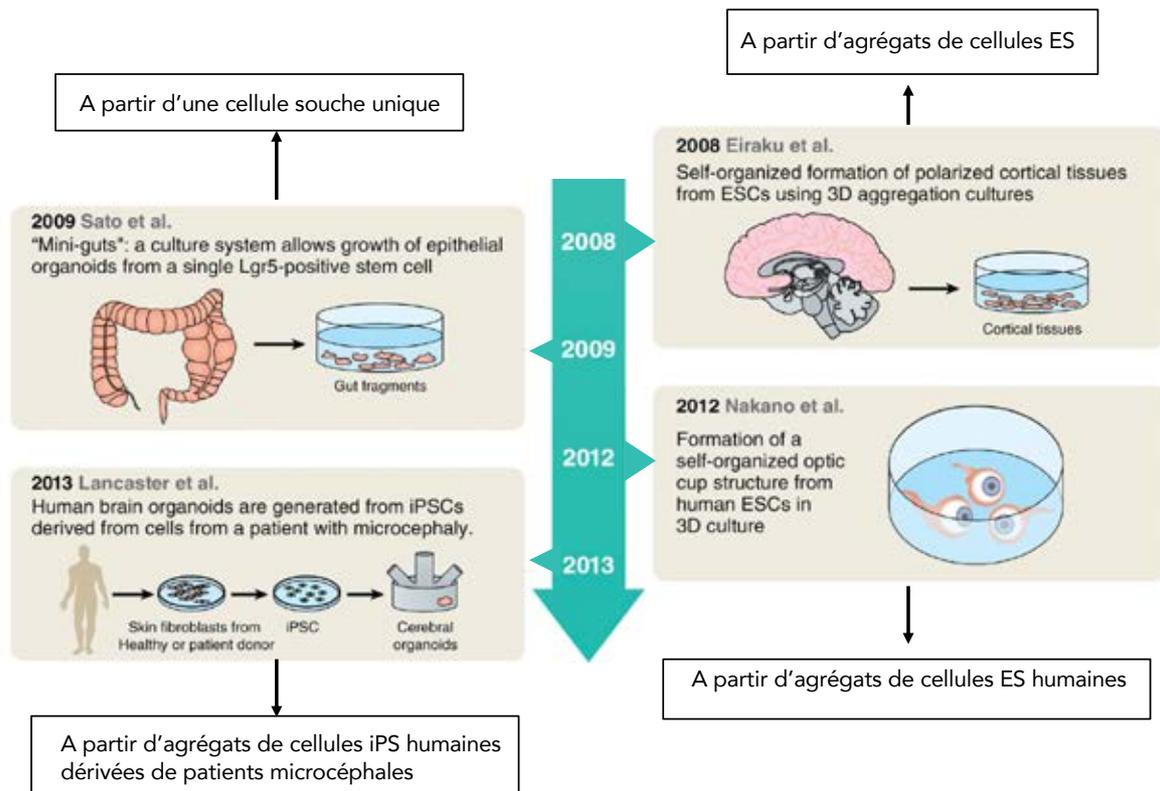
Fibronectine: Glycoprotéine homodimérique de la matrice extra-cellulaire impliquée dans l'adhésion des cellules (migrations cellulaires).
Parmi les récepteurs à la fibronectine sont les *intégrines*, capables de mécano-transduction (effets sur le cytosquelette..).

Organoïdes: un bref historique (Simian and Bissell, 2016)



Organoïdes: un bref historique (Simian and Bissell, 2016)





Organoïdes

Introduction III:

Caractéristiques principales

*Présence concomitante de types cellulaires multiples, appartenant à des tissus particuliers

*Organisation spatiale de ces différents types cellulaires

*Architecture générale de ces ébauches de tissus

Comparaison entre organoïdes et modèles traditionnels *in vitro*

Modèles traditionnels

*Composition cellulaire généralement monotypique

*Pas ou peu d'architecture cellulaire d'origine

*Capacité limitée à récapituler des fonctions spécifiques au tissu

Organoïdes

*Coexistence de multiples types cellulaires

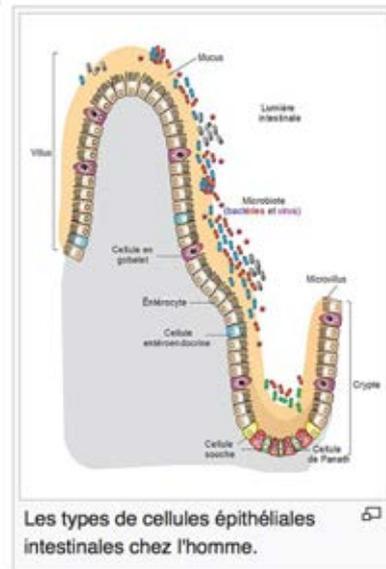
*Architecture proche de celle du tissu d'origine

*Capacités de mise en œuvres de fonctions spécifiques au tissu

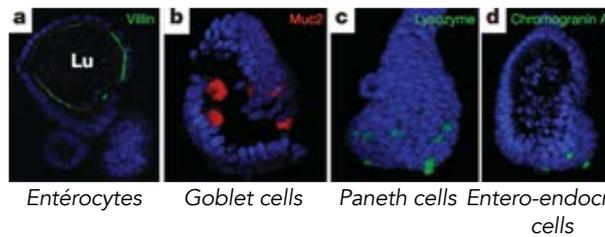
Organoïdes: Caractéristiques principales

Coexistence de multiples types cellulaires

- *Cellules souches (au fond des cryptes)
(assurent la maintenance de l'intestin..)
- *Entérocytes
(absorption des lipides, sécrétion d'enzymes..)
- *Cellules entéro-endocrines
(sécrétion des hormones de digestion ou de satiété..)
- *Cellules en gobelets
(production du mucus, protection contre le microbiote..)
- *Cellules de Paneth (au fond des cryptes)
(sécrétion de peptides anti-microbiens..)



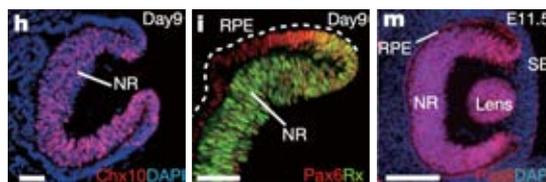
https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_de_Paneth



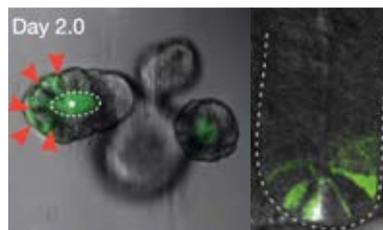
Sato et al., 2009, Nature

Organoïdes: Caractéristiques principales

Une architecture proche des systèmes *in vivo*



Formation d'une neuro-rétine (NR) et d'un épithélium pigmentaire (RPE)
Rétine 'complète' (Y. Sasaki)



Cellules souche LGR5:GFP
Formation de cryptes

Sato et al., 2009, Nature

Récapitulation de la fonction du tissu initial

CP: Cortical plate
SVZ: sub-ventricular zone

Organoïde de glande mammaire

Jamieson, et al., 2017, Development

3D images en microscopie confocale, avec ou sans prolactine (Prl)

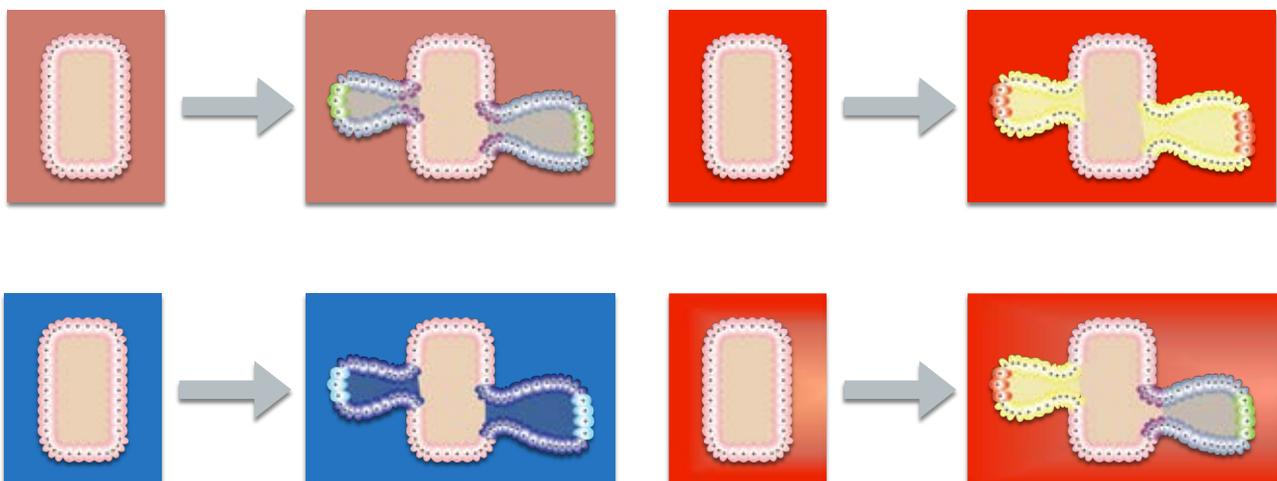
Vert: lait; rouge: F-actin

Organoïde de cerveau humain

Lancaster et al., 2013, Nature
Mouvement des cellules souches gliales marquées GFP
Live imaging/ temps: heures:minutes

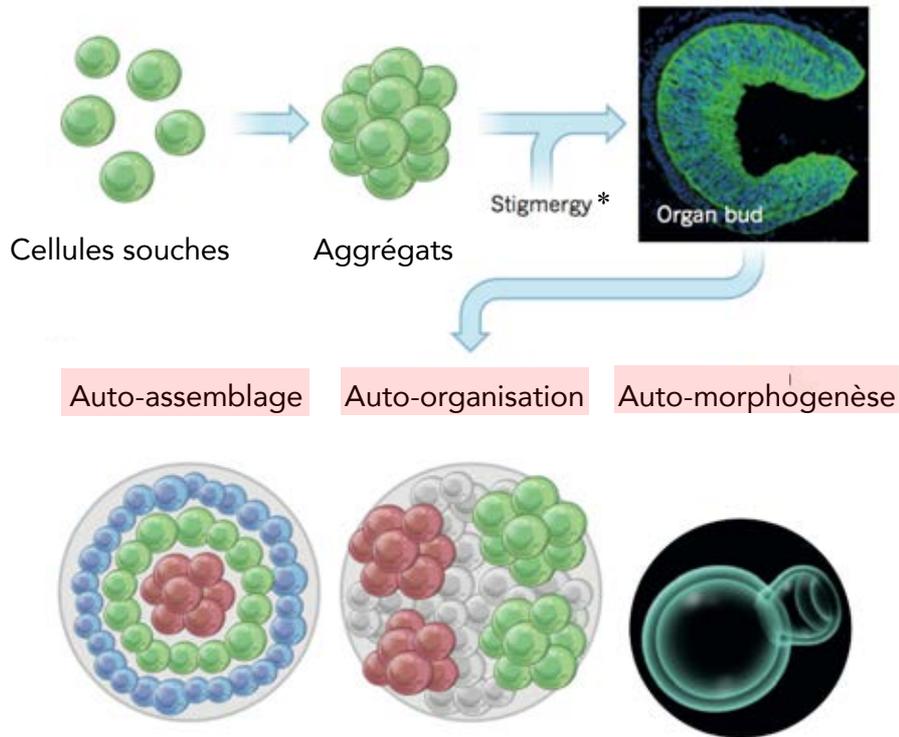
Lancaster et al., 2017, Nat. Biotechnol.
Mouvement de neurones marqués GFP
Live imaging/ temps: heures:minutes

Capacité d'auto-organisation: Capacité d'un système cellulaire qui à l'origine, ne présente aucune trace d'organisation d'aucune sorte, de se réarranger spatialement sous l'effets de mécanismes autonomes, émanant du système lui-même, même si exposé à un environnement homogène.



Organoïdes: Caractéristiques principales

Capacité d'auto-organisation

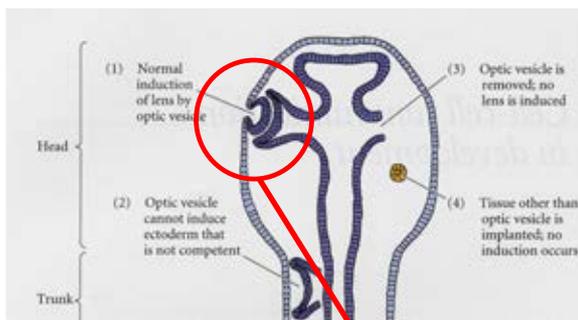


* Stigmery: mécanisme de coordination indirecte entre différents agents de l'environnement

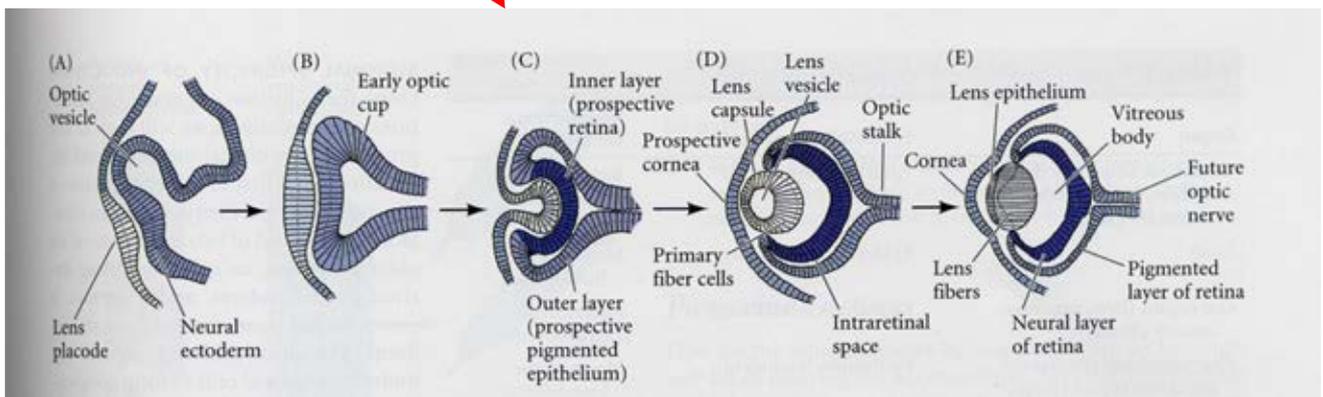
Yoshiki Sasai, 2013, Nature

Développement embryonnaire et auto-organisation

Capacité d'auto-organisation



Inductions réciproques pendant Le développement de l'oeil



'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell