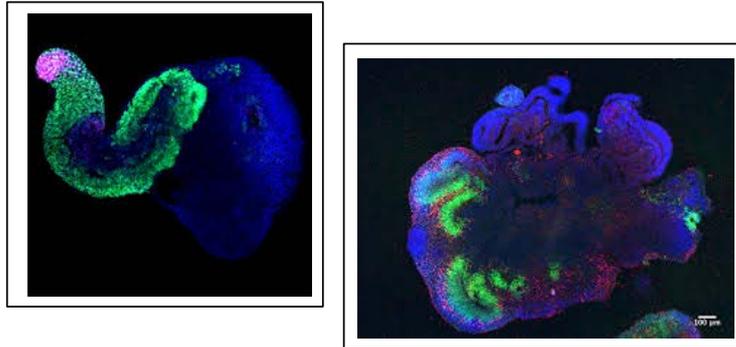


Denis Duboule

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 4
28 mai 2019

Résumé de l'épisode précédent
Organoïdes intestinaux, utilisations médicales
Organoïdes cérébraux (mini-cerveaux)
(origine, fabrication, recherche fondamentale, recherche médicale..)

*Rappel sur les cellules ES et iPS

*Organoïdes humains, différents types et utilisations

*Exemple: organoïdes de rétine

*Organoïdes intestinaux (cellules souches $Lgr5^{+/-}$?)

*Organoïdes dérivés de pathologies

*Epithélium de Barret...

Organoïdes intestinaux; recherches et applications

'Mini-gut': Outils de recherche, mais également diagnostiques et thérapeutiques

Sato and Clevers, Science, 2013

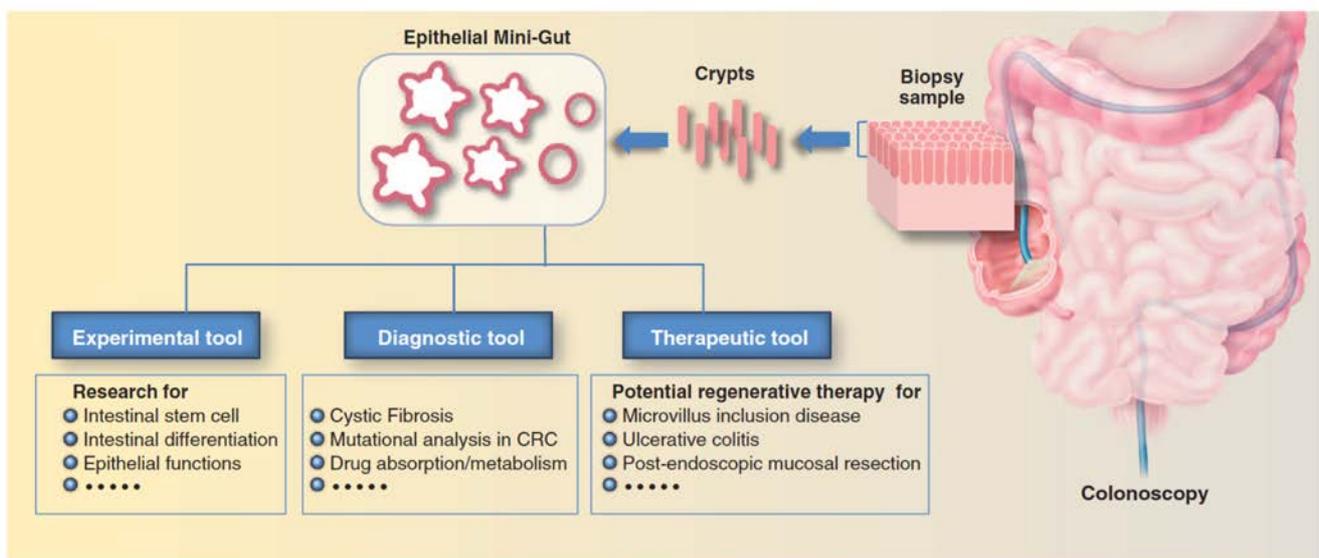


Fig. 4. Basic and clinical applications of an epithelial mini-gut. An epithelial mini-gut is efficiently established from a single (3 to 5 mm²) endoscopic biopsy sample. EDTA chelation releases ~3000 crypts from a biopsy sample. An epithelial mini-gut grows logarithmically and expands 1000-fold within a month. Three applications of epithelial mini-guts are as follows: (i) As an experimental tool. Genetic manipulation, gene expression analysis, live imaging,

and other standard biological analyses can be employed for normal and patient-derived epithelial mini-guts. (ii) As a diagnostic tool. Patient-derived epithelial mini-guts recapitulate in vivo intestinal epithelial functions and genetic signatures. Efficient expansion of pure epithelial cells provides a high-quality source for deep sequencing or functional assays. (iii) As a therapeutic tool. Epithelial mini-gut transplantation may become a feasible regenerative therapy.

Organoïdes intestinaux normaux ou pathologiques

Outils de recherche, mais également diagnostiques et thérapeutiques

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.

Cultures de cryptes dérivées du colon

*Souris: addition de Wnt3A au milieu utilisé pour cultiver les cryptes de l'intestin permet une pousse illimitée dans le temps.

*Humain: addition nécessaire de nicotinamide et de molécules inhibitrices de Alk et de p38 pour faire pousser des cryptes de colon.

*Ces conditions permettent également de dériver et de maintenir des cultures de cancers du colon (adénomes de souris et adénocarcinomes humain et de l'épithélium métaplasique de l'oesophage de Barrett (œsophage avec un épithélium intestinal..). Les cellules de cancers du colon ne nécessitent pas de traitement avec la R-spondin ou Noggin

Organoïdes intestinaux normaux ou pathologiques

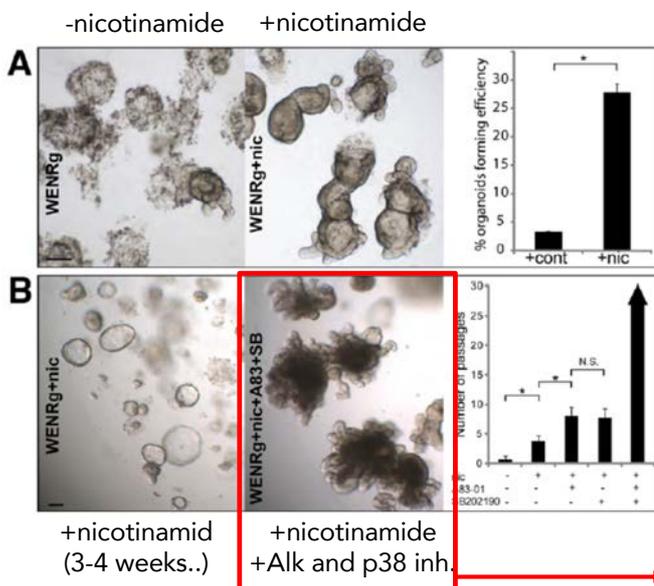
Outils de recherche, mais également diagnostiques et thérapeutiques

Figure 2

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.



*Nicotinamide: Vitamine B, anti-inflammatoire..?

*Alk: Tyrosine kinase impliquées dans de nombreux cancers.

*p38: MAP kinase (MAPK) impliquée dans la différenciation, apoptose en réponse au stress etc..

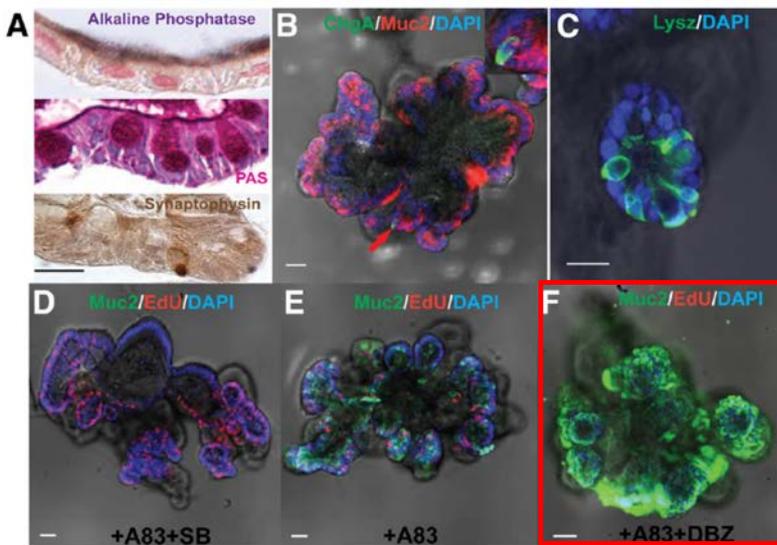
Etudes, diagnostique, thérapies....

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.

entérocytes (top) cellules caliciformes (goblet) cellules de Paneth



*Différenciation des types cellulaires en absence de nicotinamide et p38 inh.

*Alk: Tyrosine kinase impliquées dans de nombreux cancers (inh: A83)

*p38: MAP kinase (MAPK) impliquée dans la différenciation, apoptose en réponse au stress etc.. (inh: SB)

*DBZ: dibenzazepine, un inhibiteur de la signalisation Notch stoppe la prolifération et induit la différenciation de cellules caliciformes

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.

L'œsophage de Barrett

États précancéreux de l'œsophage

L'œsophage de Barrett est l'état précancéreux de l'œsophage le plus fréquent. Les cellules normales qui tapissent l'œsophage sont remplacées par des cellules qui ressemblent à celles du revêtement de l'intestin ou de l'estomac. Le processus par lequel les cellules normales se transforment en cellules anormales est appelé **métaplasie intestinale**. La métaplasie intestinale apparaît habituellement dans la partie inférieure de l'œsophage, près de l'endroit où il se joint à l'estomac (jonction œsophago-gastrique, ou OG).

<https://www.cancer.ca> (société canadienne du cancer)

*



Figure 1 Languettes de muqueuse de Barrett (en rouge foncé) observées lors d'une endoscopie de routine chez un patient souffrant d'un reflux chronique

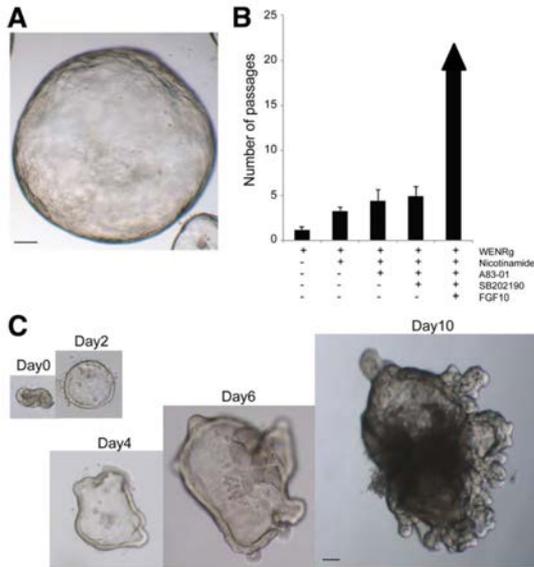
<https://www.revmed.ch/RMS/2005/RMS-31/30614>

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.

L'œsophage de Barrett



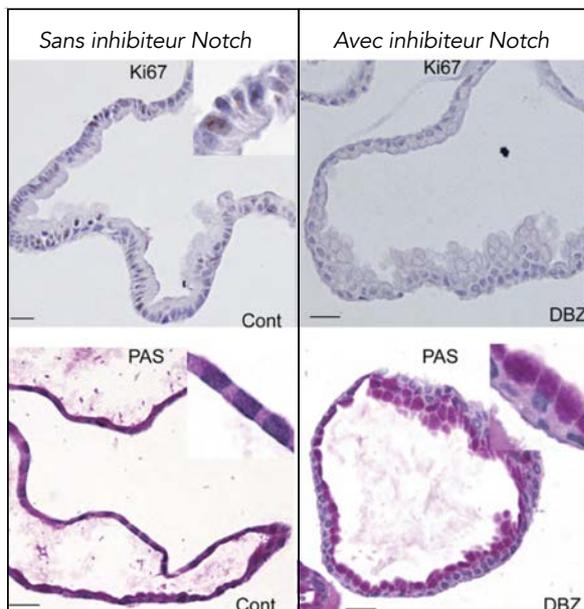
- A. Epithélium isolé (7 jours)
- B. Addition de Fgf10. Effet sur le nombre de passages
- C. Organoïde d'œsophage de Barrett

Gastroenterology, 2011 Nov;141(5):1762-72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050. Epub 2011 Sep 2.

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium.

Sato T¹, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H.

L'œsophage de Barrett



Section histologique d'organoïde sans Nicotinamide et avec p38 inh., pendant 4 jours avec (droite) ou sans (gauche) l'inhibiteur de Notch DBZ

- *Cellules en prolifération (en haut, bleu)
- *Cellules caliciformes (goblet, en bas, rouge)

*Les cellules arrêtent de proliférer et se différencient

Organoïdes

Etat des lieux:

Organoïdes de cerveaux

*Origine

*Utilisation en recherche fondamentale

*Utilisation en recherche médicale

Organoïdes cérébraux (fabrication)

ARTICLE

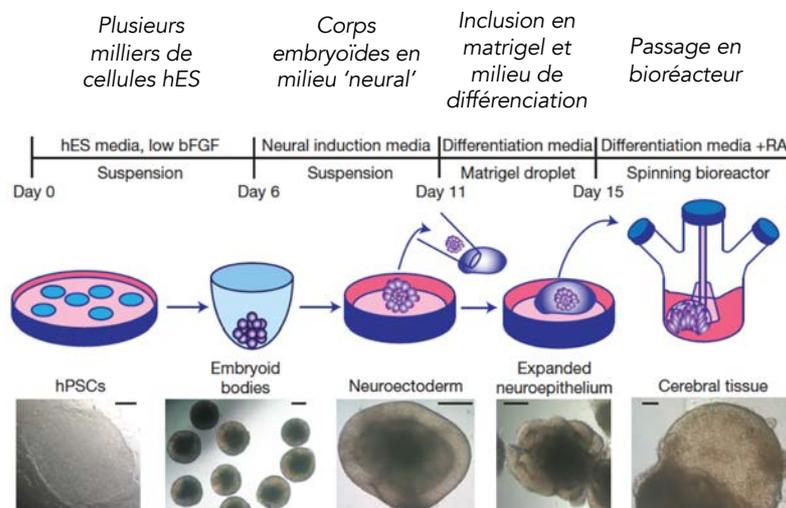
Nature (2013)

doi:10.1038/nature12517

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Madeline A. Lancaster¹, Magdalena Renner¹, Carol-Anne Martin², Daniel Wenzel¹, Louise S. Bicknell², Matthew E. Hurles³, Tessa Homfray⁴, Josef M. Penninger¹, Andrew P. Jackson² & Juergen A. Knoblich¹

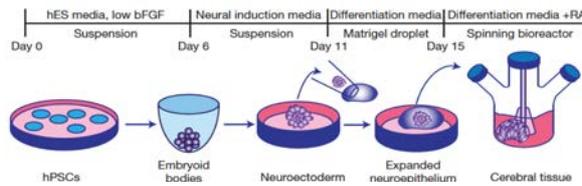
Matrigel: mélange gélatineux de protéines extraites de cellules tumorales de souris (ostéosarcome) qui maintient les cellules souches en état indifférencié. Il s'agit d'un ersatz de matrice de membrane basale



ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Maxime A. Lancaster¹, Magdalena Botten¹, Carol Anne Martin¹, David Worral¹, Louise S. Becknell¹, Matthew E. Hurke¹, Tessa Hrabiec¹, Ines M. Pettinger¹, Andrew P. Jackson¹ & Jürgen A. Knoblich¹



METHODS SUMMARY

For cerebral organoid differentiation, pluripotent stem cells were dissociated from mouse embryonic fibroblasts by dispase treatment followed by trypsinization to generate single cells. In total, 4,500 cells were plated in each well of an ultra-low binding 96-well plate (Corning) in human ES media with low concentration basic fibroblast growth factor (4 ng ml^{-1}) and $50 \mu\text{M}$ Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor⁴⁹ (Calbiochem). Embryoid bodies were fed every other day for 6 days then transferred to low-adhesion 24-well plates (Corning) in neural induction media containing Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)/F12, 1:100 N2 supplement (Invitrogen), Glutamax (Invitrogen), minimum essential media-nonessential amino acids (MEM-NEAA) and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ heparin⁵⁰ (Sigma). The neuroepithelial tissues were fed every other day for 5 days. On day 11, tissues were transferred to droplets of Matrigel (BD Biosciences) by pipetting into cold Matrigel on a sheet of Parafilm with small 3 mm dimples. These droplets were allowed to gel at 37°C , removed from the Parafilm and grown in differentiation media containing a 1:1 mixture of DMEM/F12 and Neurobasal containing 1:200 N2 supplement (Invitrogen), 1:100 B27 supplement without vitamin A (Invitrogen), $3.5 \mu\text{l l}^{-1}$ 2-mercaptoethanol, 1:4,000 insulin (Sigma), 1:100 Glutamax (Invitrogen), 1:200 MEM-NEAA. After 4 days of stationary growth, the droplets were transferred to a spinning bioreactor containing differentiation media as above, except B27 supplement with vitamin A (Invitrogen) was used.

4'500 cellules hES

Fgf + ROCK inhibiteur (Rho-Kinase)

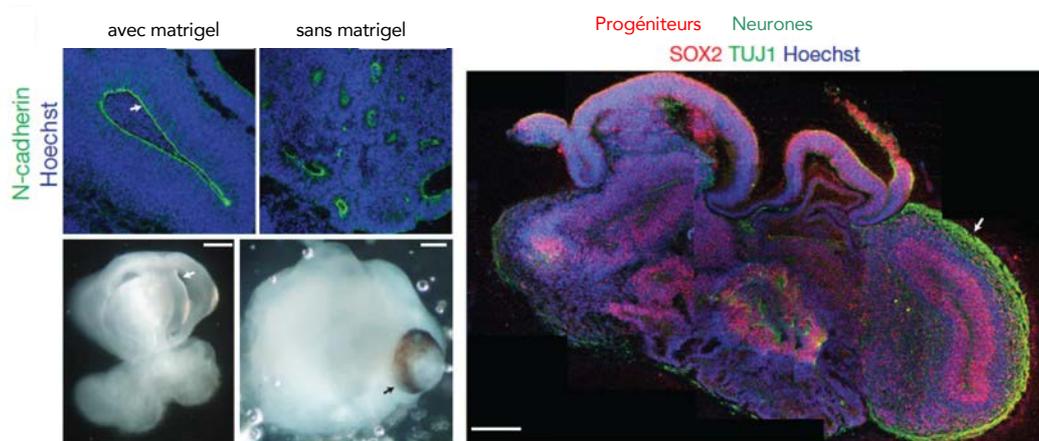
Heparine (co-facteur Fgf (promoteur..))

Insuline ?

ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)



Echelle: 200 microns

*Formation de tissu neuro-épithélial avec des cavités fluides et une localisation apicale typique de cadherine N

*Une morphologie complexe avec des régions hétérogènes contenant des cellules progénitrices et des neurones

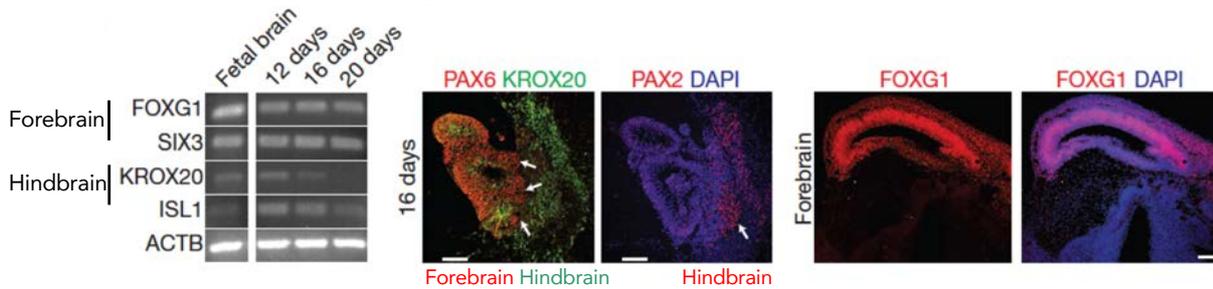
*Structures montrant des ventricules ainsi que la formation de cellules épithéliales pigmentées de rétine

Organoïdes cérébraux (organisation et types cellulaires)

ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)



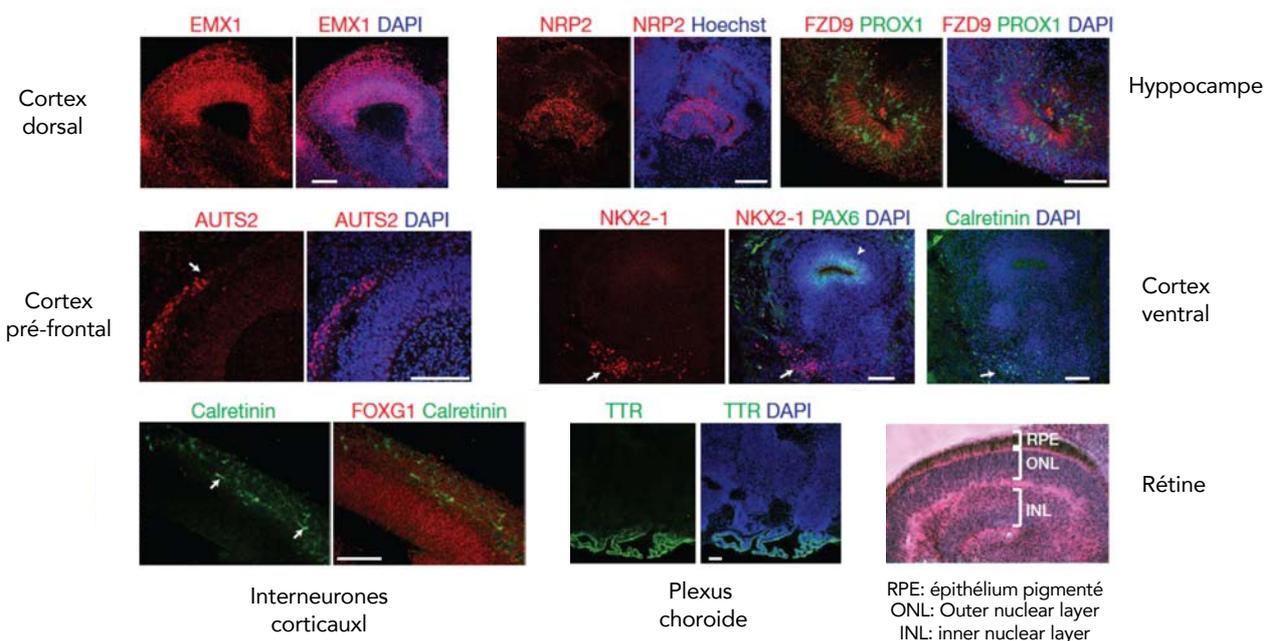
*Différentes régions du cerveau sont représentées avec des architectures distinctes, régions qui sont toujours identifiées par l'expression de gènes marqueurs..

Organoïdes cérébraux (organisation et types cellulaires)

ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

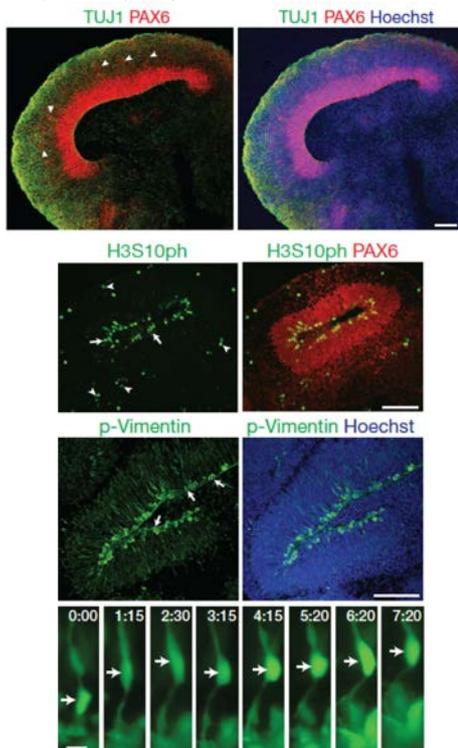
Lancaster et al., Nature (2013)



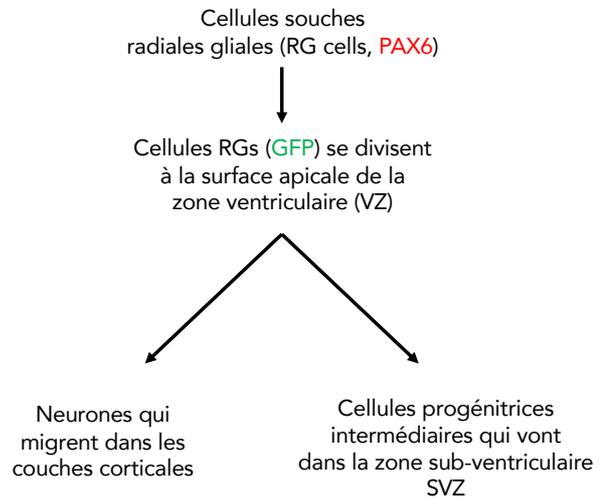
ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)



Production et migration des neurones corticaux (TUJ1)

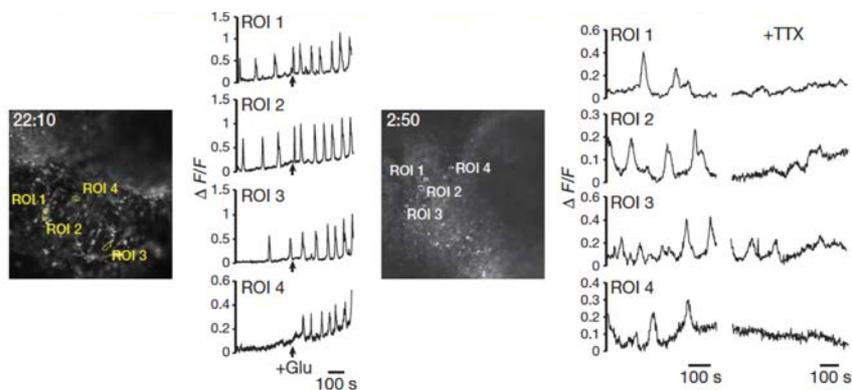


ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)

Maturation des neurones corticaux



- *'Calcium dye imaging' pour détecter les oscillations calciques (Ca^{2+})
- *Détection de pics de calcium spontanés au niveau de cellules individuelles
- *L'addition de glutamate augmente la fréquence (suggérant une activité de réception glutamatergique)
- *Pics bloqués par la tetrodotoxine (donc dépendant de l'activité neuronale)

Published online: March 10, 2017

Article



THE
EMBO
JOURNAL

Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids

Magdalena Renner^{1,†}, Madeline A Lancaster^{1,2,†}, Shan Bian¹, Heejin Choi³, Taeyun Ku³, Angela Peer¹, Kwanghun Chung^{3,4,5,6,7} & Juergen A Knoblich^{1,†}

Abstract

Cerebral organoids recapitulate human brain development at a considerable level of detail, even in the absence of externally added signaling factors. The patterning events driving this self-organization are currently unknown. Here, we examine the developmental and differentiative capacity of cerebral organoids. Focusing on forebrain regions, we demonstrate the presence of a variety of discrete ventral and dorsal regions. Clearing and subsequent 3D reconstruction of entire organoids reveal that many of these regions are interconnected, suggesting that the entire range of dorso-ventral identities can be generated within continuous neuroepithelia. Consistent with this, we demonstrate the presence of forebrain organizing centers that express secreted growth factors, which may be involved in dorso-ventral patterning within organoids. Furthermore, we demonstrate the timed generation of neurons with mature morphologies, as well as the subsequent generation of astrocytes and oligodendrocytes. Our work provides the methodology and quality criteria for phenotypic analysis of brain organoids and shows that the spatial and temporal patterning events governing human brain development can be recapitulated *in vitro*.

Published online: March 10, 2017

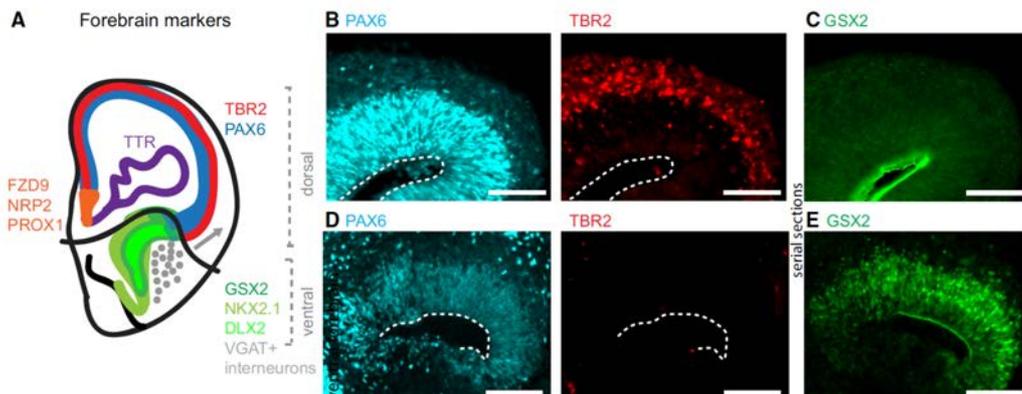
Article



THE
EMBO
JOURNAL

Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids

Magdalena Renner^{1,†}, Madeline A Lancaster^{1,2,†}, Shan Bian¹, Heejin Choi³, Taeyun Ku³, Angela Peer¹, Kwanghun Chung^{3,4,5,6,7} & Juergen A Knoblich^{1,†}



- A: Gènes marqueurs de régions du cerveau antérieur.
 B, C: La région dorsale montre Pax6 (radial glial progéniteurs dans la ZV) et TBR2 (progéniteurs intermédiaires dans la sous-ZV) mais négatif pour GSX2.
 D, E: Les régions LGE et CGE (latérales et ventrales 'ganglioniques éminences') sont TBR2 négatives mais GSX2 positives

Organoïdes cérébraux (organisateurs de la polarité DV)

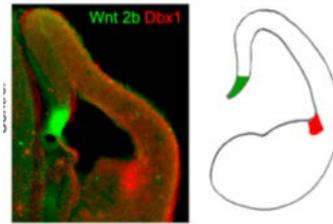
Published online: March 01, 2017

Article

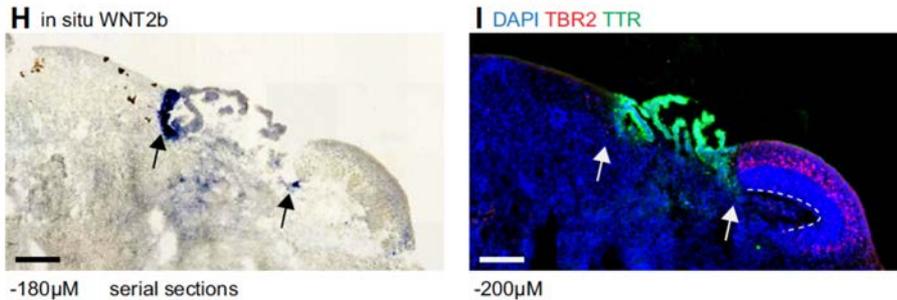


Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids

Magdalena Renner^{1,2}, Madeline A Lancaster^{1,2,3}, Shan Bian¹, Hejin Cho^{1,2}, Taeyun Ku², Angela Peer¹, Kwanghun Chung^{1,2,3,4,5,6,7} & Juergen A Knoblich^{1,2}



Subramanian et al., 2009, *Seminars in Cell and Dev. Biol.* 20(6):712-18



*Wnt2a est un marqueur de l'ourlet cortical' (cortical hem) une des régions organisatrices de l'axe dorso-ventral du cerveau antérieur.

*Dans les organoïdes, Wnt2a est exprimé exactement entre le plexus choroïde (TTR) et la partie dorsale du cerveau antérieur (TBR2) (i.e. au bon endroit...)

Auto-organisation → centre de signalisation → polarité....

Organoïdes cérébraux (problème de fréquence et reproductibilité..)

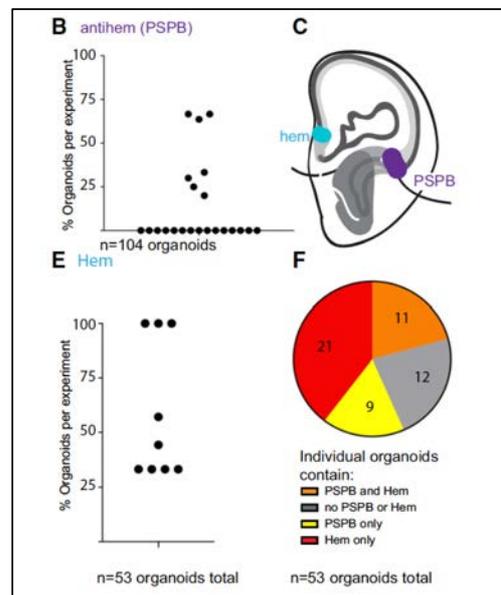
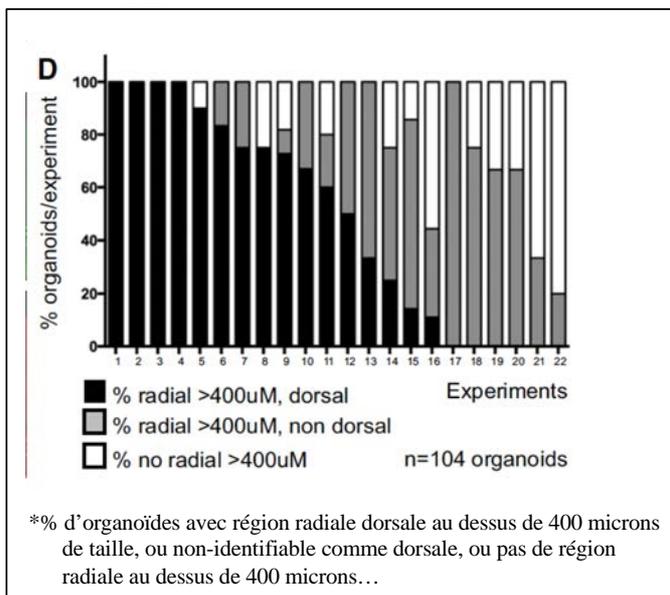
Published online: March 01, 2017

Article



Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids

Magdalena Renner^{1,2}, Madeline A Lancaster^{1,2,3}, Shan Bian¹, Hejin Cho^{1,2}, Taeyun Ku², Angela Peer¹, Kwanghun Chung^{1,2,3,4,5,6,7} & Juergen A Knoblich^{1,2}



*Donc nécessité d'une standardisation du protocole (SOP; standard operating procedure)

Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

Nat Biotechnol. 2017 July ; 35(7): 659–666. doi:10.1038/nbt.3906.

Abstract

Three-dimensional cell culture models have either relied on the self-organizing properties of mammalian cells^{1–6} or used bioengineered constructs to arrange cells in an organ-like configuration^{7,8}. While self-organizing organoids excel at recapitulating early developmental events, bioengineered constructs reproducibly generate desired tissue architectures. Here, we combine these two approaches to reproducibly generate human forebrain tissue while maintaining its self-organizing capacity. We use poly(lactide-co-glycolide) copolymer (PLGA) fiber microfilaments as a floating scaffold to generate elongated embryoid bodies. Microfilament-engineered cerebral organoids (enCORs) display enhanced neuroectoderm formation and improved cortical development. Furthermore, reconstitution of the basement membrane leads to characteristic cortical tissue architecture, including formation of a polarized cortical plate and radial units. Thus, enCORs model the distinctive radial organization of the cerebral cortex and allow for the study of neuronal migration. Our data demonstrate that combining 3D cell culture with bioengineering can increase reproducibility and improve tissue architecture.

Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

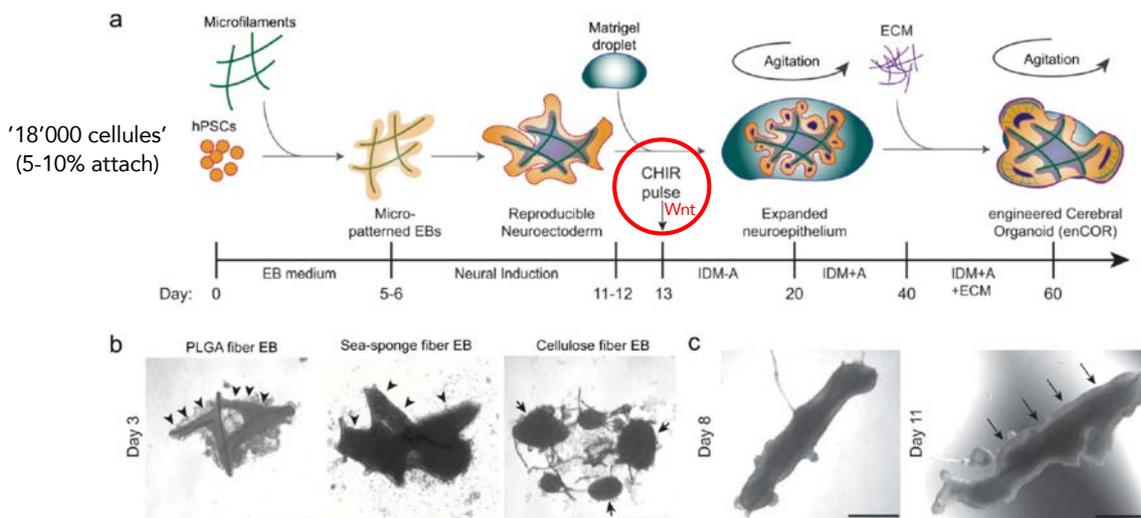
Standard Operating Procedure (SOP) ? enCORs (engineered cereb. organoïdes)

'Floating Scaffold'

*Fibres tressées poly(lactide-co-glycolide) copolymer (PLGA)

*Spongin (éponges, collagen-type..)

Presque que du neuro-ectoderme
Pas ou peu de mésoderme ou endoderme



Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

Standard Operating Procedure (SOP) ? enCORs (engineered cereb. organoïdes)

Augmentation principalement de la qualité des séries (batches), plutôt que de la variabilité interne. En partant de sphères, 25-30% des batches dans le meilleur des cas sont informatifs. Avec les enCORs, 75-80% des séries sont analysables.

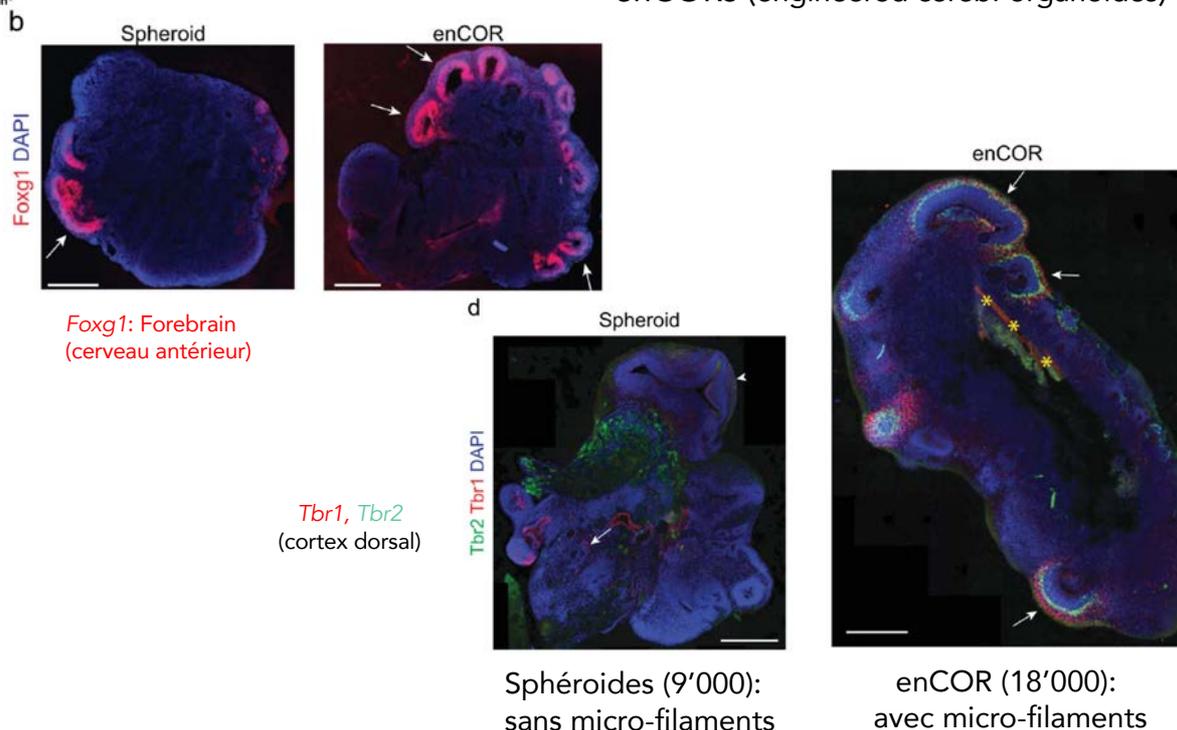
Chiffres de Madeline Lancaster

The combination of microfilament and CHIR pulse resulted in more consistent formation of large brain lobules (Figure 2a) that stained positive for the forebrain marker *Foxg1* (Figure 2b) compared with spheroids. In addition, we observed reduced frequency of *Otx2+* midbrain and *En2+* cerebellar/hindbrain regions (Supplementary Fig. 4e). Quantification of these identities revealed more reproducible formation of forebrain in enCORs rather than other brain regions (Figure 2c). Consistent with this, enCORs displayed both dorsal and ventral forebrain regions (Supplementary Fig. 4f) with more frequent large *Tbr1* and *Tbr2* positive dorsal cortical regions (Figure 2d). Furthermore, enCORs displayed regions consistent with choroid plexus and hippocampus identity (Supplementary Fig. 4g, h). Thus,

Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

Standard Operating Procedure (SOP) ? enCORs (engineered cereb. organoïdes)



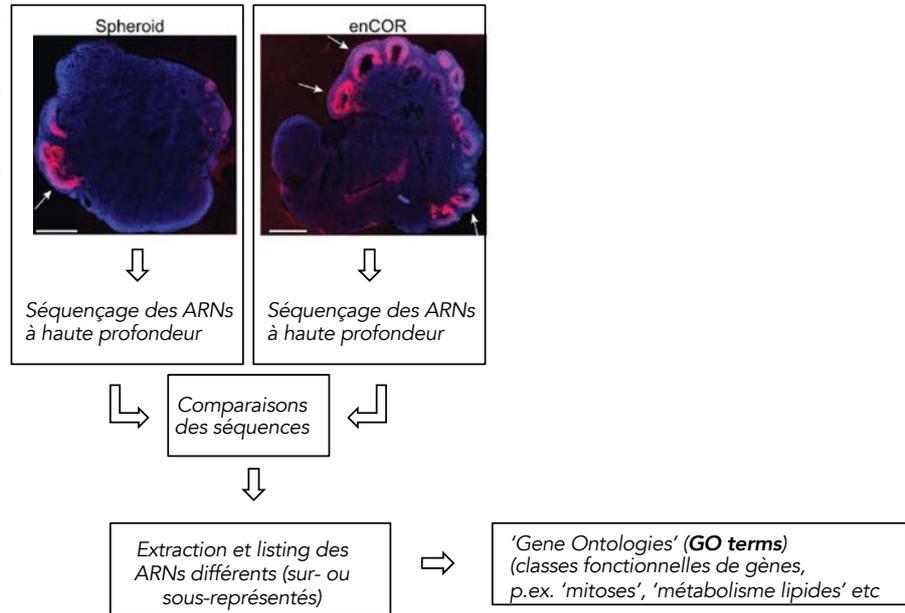
Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

enCORs (engineered cereb. organoïdes)

Quantification des différences entre 'sphères' et 'enCORs'

*Analyses à jour 20



Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

enCORs (engineered cereb. organoïdes)

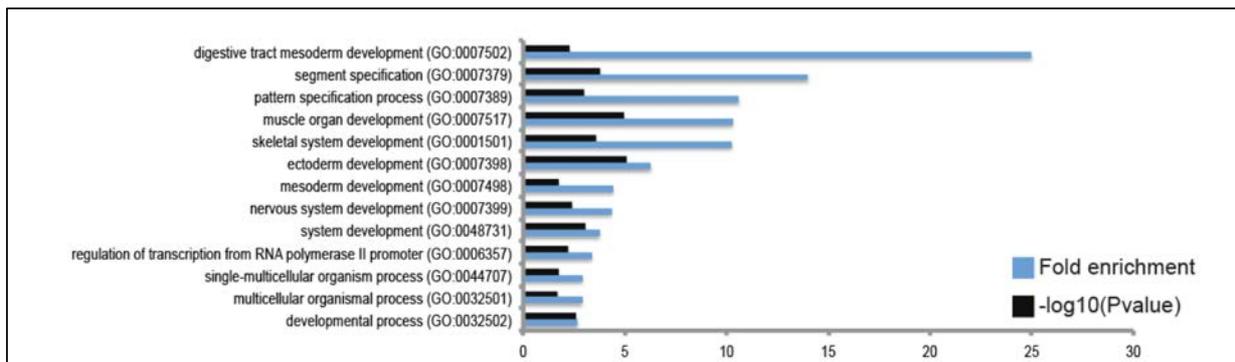
Quantification des différences entre 'sphères' et 'enCORs'

*Analyses à jour 20

*Séquençage des ARNs (RNA-seq; transcriptomes)

*Liste des ARNs sous-représentés dans les enCORs vs sphères ou sureprésentés dans les sphères vs enCORs

*Etablir leurs 'ontologies' (GO list, familles de fonctions..)

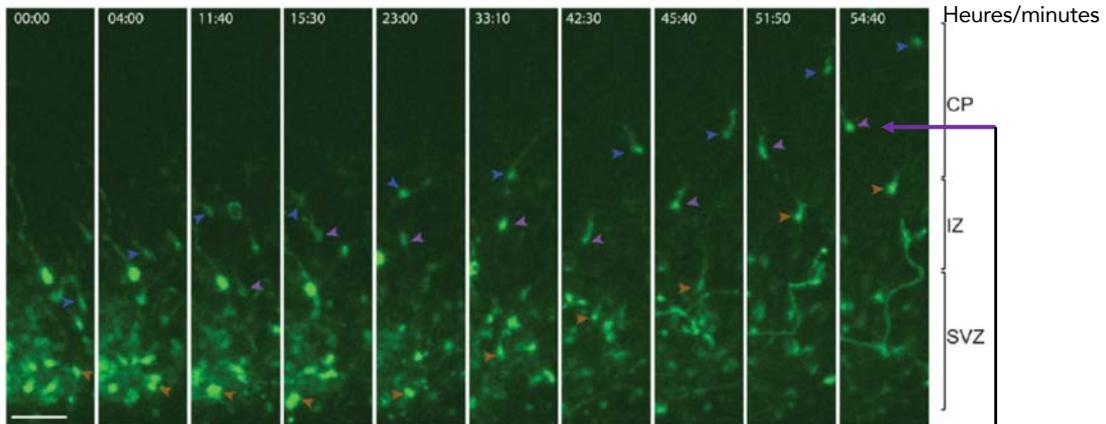


Conclusion: A ce stade, il y a beaucoup plus de cellules non-neurales dans les (futurs) mini-cerveaux dérivés de sphères que dans ceux dérivant des enCORs

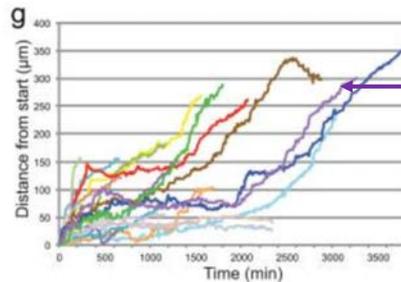
Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids

Madeline A. Lancaster^{1,2}, Nina S. Corsini¹, Simone Wolfinger¹, E. Hilary Gustafson¹, Alex Phillips², Thomas R. Burkard^{1,3}, Tomoki Otani⁴, Frederick J. Livesey⁴, and Juergen A. Knoblich¹

enCORs (engineered cereb. organoïdes)



- *Migration radiale de plusieurs neurones
- *'Stalling' (arrêt -transitoire- flèche pourpre)
- *Morphologie multipolaire (flèche bleue)



Organoïdes

Organoïdes de cerveaux humains

Utilisation comme modèles de pathologies

*Microcéphalie

*Tumeurs du cerveau

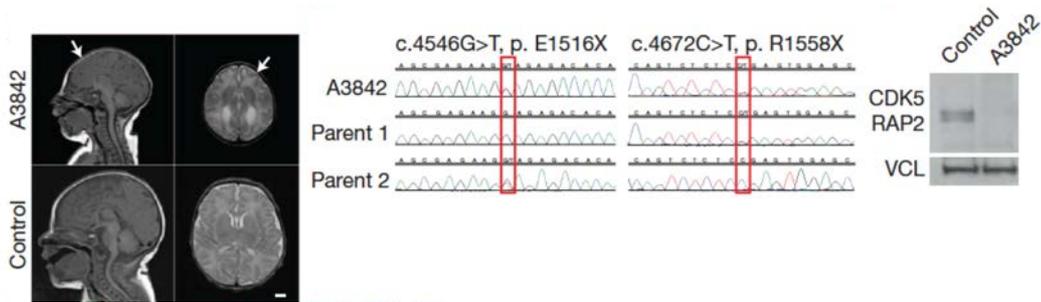
Organoïdes cérébraux (organoïdes mutants)

ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)

Organoïdes cérébraux comme un modèle d'une microcéphalie humaine



*Un patient mutant trans-hétérozygote dans le gène CDK5RAP2 (protéine associée au centrosome pendant la mitose)
Héritage de deux mutations 'non-sens' différentes chez les parents, donc pas de protéine chez le patient

Le centrosome est un centre organisateur des microtubules. Il est donc responsable de la formation du fuseau mitotique microtubulaire lors de la division cellulaire, sur lequel se déplacent les chromosomes.

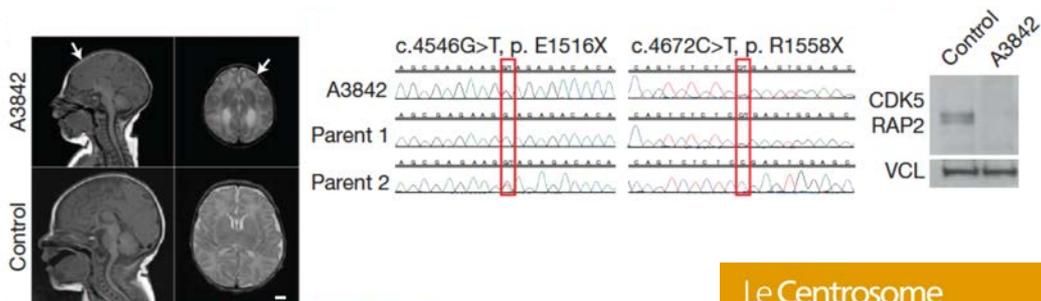
Organoïdes cérébraux (organoïdes mutants)

ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

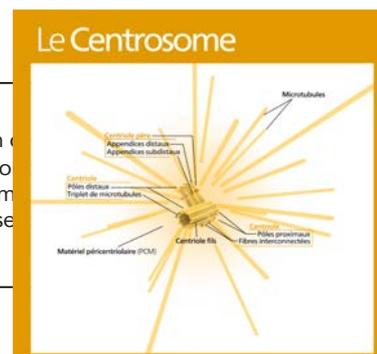
Lancaster et al., Nature (2013)

Organoïdes cérébraux comme un modèle d'une microcéphalie humaine



*Un patient mutant trans-hétérozygote dans le gène CDK5RAP2 (protéine associée au centrosome pendant la mitose)
Héritage de deux mutations 'non-sens' différentes chez les parents, donc pas de protéine chez le patient

Le centrosome est un centre organisateur des microtubules. Il est donc responsable de la formation du fuseau mitotique microtubulaire lors de la division cellulaire, sur lequel se déplacent les chromosomes.



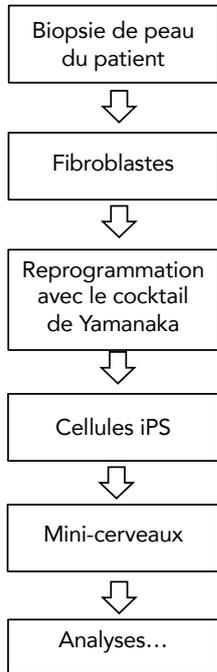
Organoïdes cérébraux (organoïdes mutants)

ARTICLE

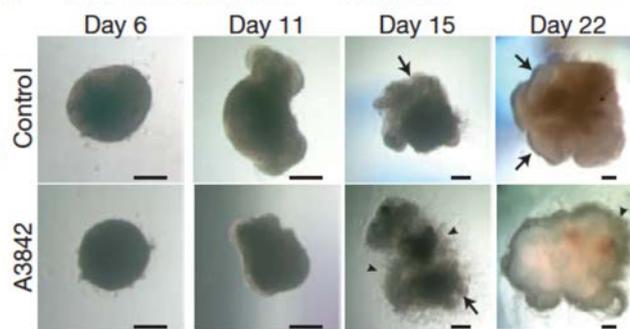
Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)

Organoïdes cérébraux comme un modèle d'une microcéphalie humaine



*Production d'organoïde cérébraux à partir de fibroblastes après biopsie de peau du patient et reprogrammation 'classique' (facteurs de Yamanaka) pour produire des cellules iPS, puis agrégation de ces cellules iPS etc..

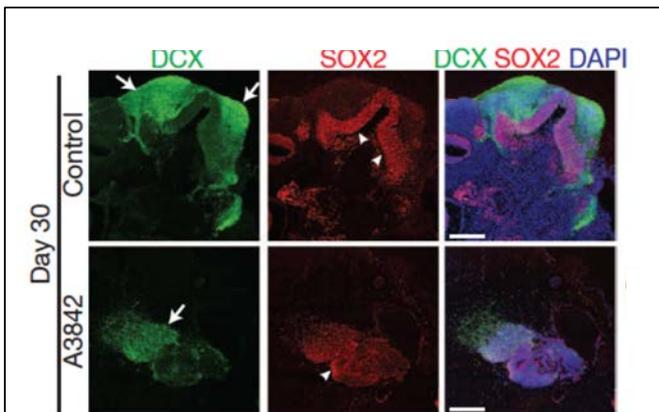


Organoïdes cérébraux (compréhension de la pathologie)

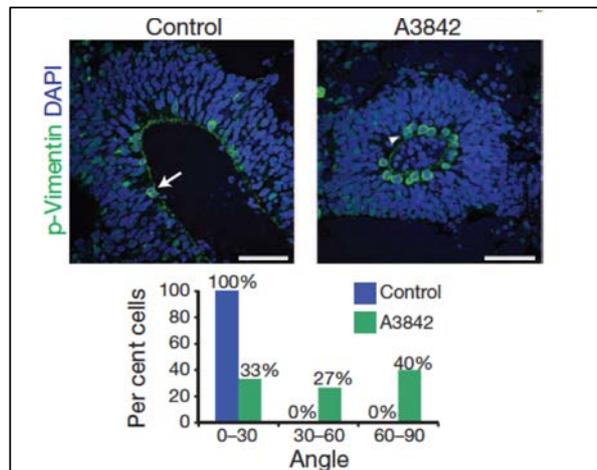
ARTICLE

Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

Lancaster et al., Nature (2013)



*A 30 jours, Les organoïdes 'mutants' ont moins de progéniteurs (SOX2) et de neurones (DCX). A 22 jours, cependant, ils ont moins de progéniteurs mais plus de neurones, suggérant une différenciation trop précoce



*L'examen des RGs normales en mitoses révèle une mitose horizontale en anaphase (0-30 degrés) alors que le mutant montre beaucoup de divisions obliques ou verticales (RGs: Radial Glial stem cells; Vimentin+)

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

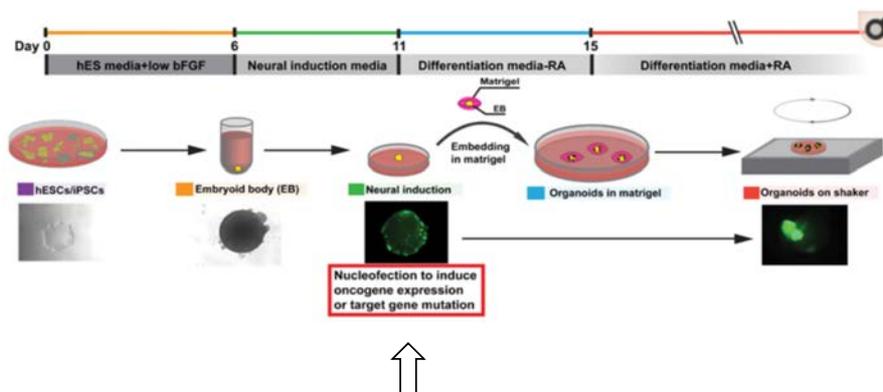
Shan Bian¹, Marko Repic^{1,5}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani³, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}

Abstract

Brain tumors are among the most lethal and devastating cancers. Their study is limited by genetic heterogeneity and the incompleteness of available laboratory models. Three-dimensional organoid culture models offer innovative possibilities for the modeling of human disease. Here we establish a 3D in vitro model called a neoplastic cerebral organoid (neoCOR), in which we recapitulate brain tumorigenesis by introducing oncogenic mutations in cerebral organoids via transposon- and CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. By screening clinically relevant mutations identified in cancer genome projects, we defined mutation combinations that result in glioblastoma-like and central nervous system primitive neuroectodermal tumor (CNS-PNET)-like neoplasms. We demonstrate that neoCORs are suitable for use in investigations of aspects of tumor biology such as invasiveness, and for evaluation of drug effects in the context of specific DNA aberrations. NeoCORs will provide a valuable complement to the current basic and preclinical models used to study brain tumor biology.

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

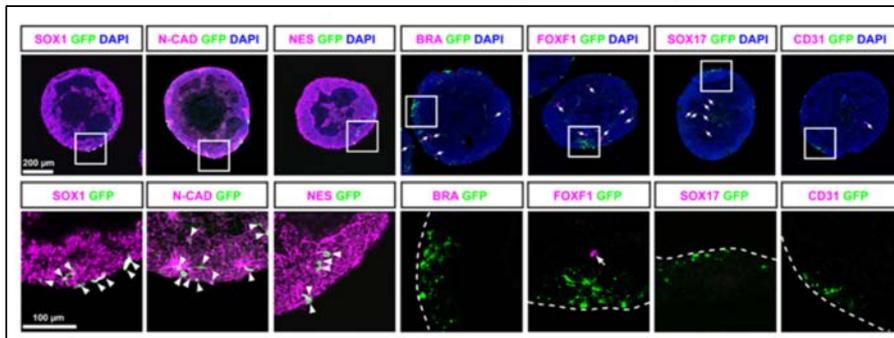
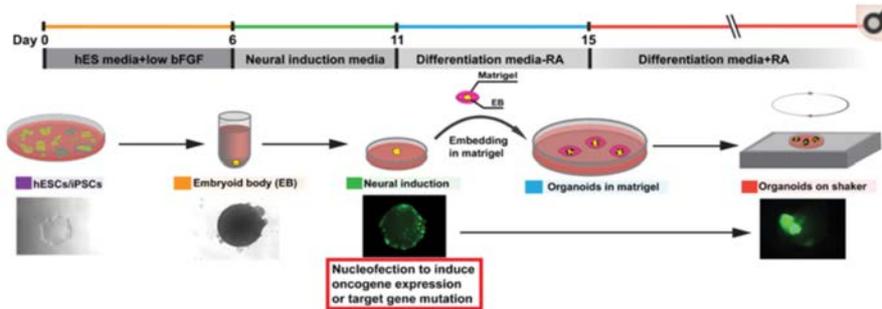
Shan Bian¹, Marko Repic^{1,5}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani³, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}



Protocole classique mais incluant une étape d'introduction de matériel génétique par nucléofection (...électroporation). Les futurs cellules souches sont souvent à la périphérie à ce stade là. Introduction d'oncogènes, activables ou pas, de plasmides CRISPR etc.. pour pertes ou gains de fonctions au choix Aussi lignée par GFP activable etc)

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

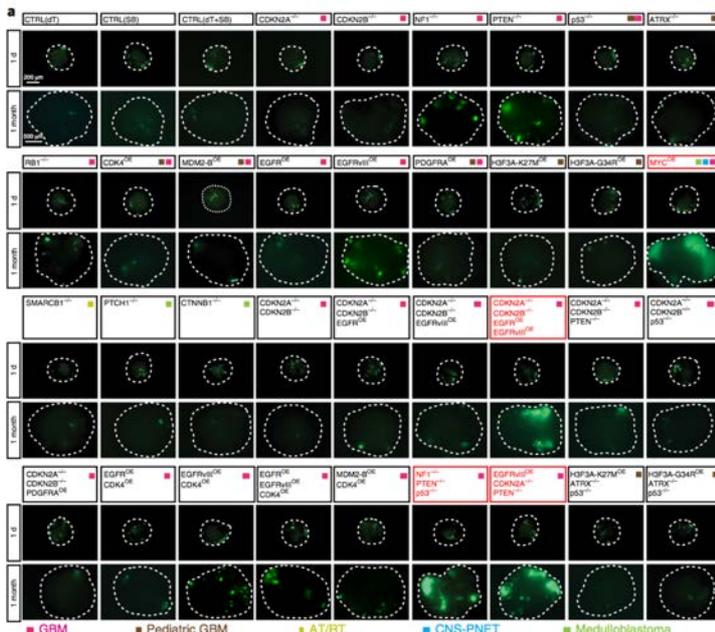
Shan Bian¹, Marko Repic^{1,3}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani¹, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}



Toutes les cellules marquées à la GFP sont également marquées par des gènes spécifiques aux cellules prog. neurales. Aucune de ces cellules n'est marquée avec un gène mésodermique ou endodermique

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

Shan Bian¹, Marko Repic^{1,3}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani¹, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}



*Cellules hES modifiées avec une batterie de mutations (CRISPR) et des gains de fonctions simples ou en combinaison, connus pour être associés à des cancers variés

*Criblage avec un marqueur de prolifération (pCAG-GFP) après un jour et 1 mois

*Quantification de la fluorescence pour trouver les organoïdes à haute croissance...

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

Shan Bian¹, Marko Repic^{1,2}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani¹, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}



*4 conditions montrant une croissance tumorale, dont 3 avec des mutations associées aux glioblastomes (GBM) et une à Myc (oncogène)

EGFR et cancers

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

Shan Bian¹, Marko Repic^{1,2}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani¹, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krauditsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}

*EGF: Epidermal Growth Factor et les récepteurs à ce facteur de croissance (EGFR) sont découverts par Stanley Cohen et Rita Levi-Montalcini (prix Nobel 1986).

*Ces récepteurs sont membres de la famille des récepteurs transmembranaires tyrosine kinase ErbB. 4 récepteurs, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) et Her4 (ErbB4).

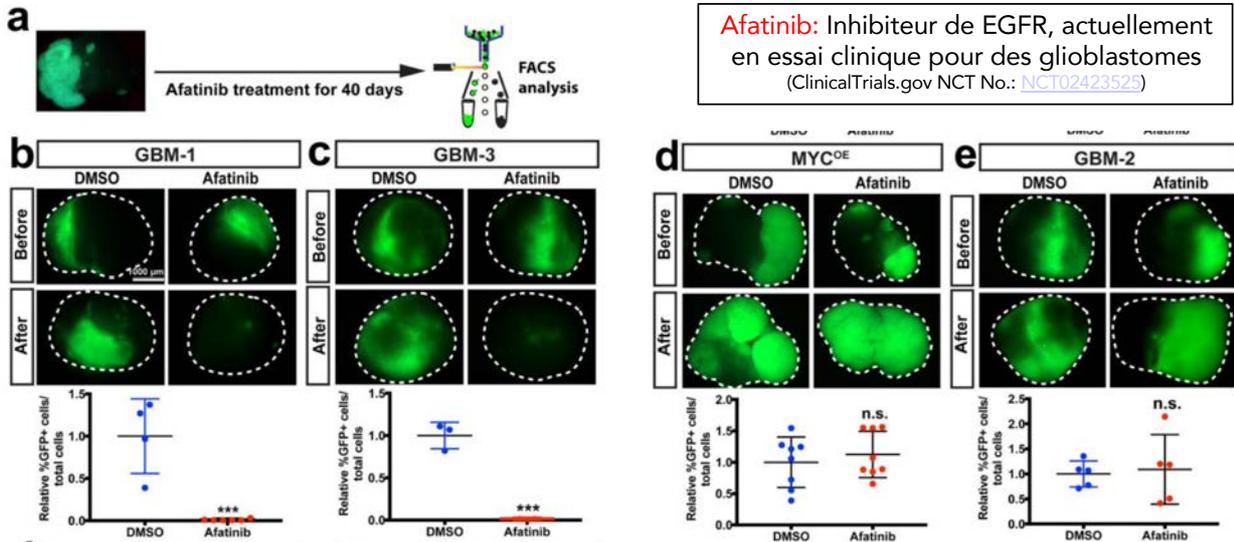
*Plusieurs mutations dans le gène codant pour EGFR sont associées à des cancers (adénocarcinomes du poumon, head and neck tumeurs, glioblastomes...).

*Mutations, amplifications ou dérégulations de EGFR sont observées dans 30% des cas de tumeurs épithéliales

(*ErbB2 (Her2); amplification ou surexpression dans de nombreux cancers du sein (anticorps monoclonaux 'Herceptin').

Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation

Shan Bian¹, Marko Repic^{1,2}, Zhenming Guo^{1,2}, Anoop Kavirayani¹, Thomas Burkard^{1,4}, Joshua A. Bagley¹, Christian Krautitsch¹ and Jürgen A. Knoblich^{1*}



Afatinib: Inhibiteur de EGFR, actuellement en essai clinique pour des glioblastomes (ClinicalTrials.gov NCT No.: [NCT02423525](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02423525))

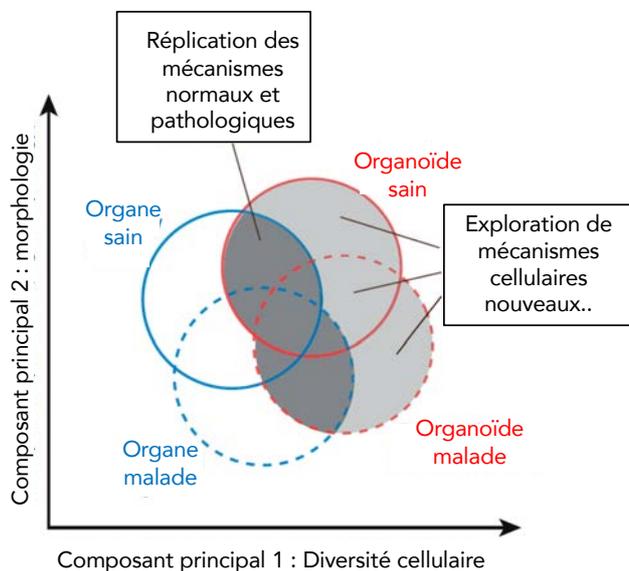
Le traitement par l'Afatinib réduit considérablement les cellules GFP (marqueur de la croissance mais uniquement pour les modèles de GBM1 et GBM3, donc impliquant le EGFR. Les modèles GBM2 et Myc ne répondent pas.

Les organoïdes cérébraux ne sont pas des cerveaux..

SPOTLIGHT

Exploring landscapes of brain morphogenesis with organoids

Denis Jabaudon^{1,2,*} and Madeline Lancaster^{3,*}



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

Les organoïdes cérébraux ne sont pas des cerveaux..

...mais ils peuvent soulever des problèmes 'éthiques'..



At the moment, minibrains are far from anything approaching moral personhood in a dish and the technology may never come close. But the rapid pace of progress on organoids has led scientists and ethicists to call for a public ethical discussion that can move in tandem with the research.

"The scientists often look at this tiny little piece, 2 millimetres cubed, and to think that represents the potential for say, consciousness, or some larger construct - as a scientist, you think of course that is not really a human brain," said Rusty Gage, president of the Salk Institute for Biological Studies. "On the other hand, I've been in this long enough to know it's not just the facts, it's the perception of it and how the public sees it."

"If, at the sunset of life, the brain is what you examine to know if someone has died, at the beginning of life is there a point where you might say, 'Look, the brain is at the beginning of life?'" said Insoo Hyun, a bioethicist at Case Western Reserve University. "Many people don't understand where the science is now, and where it could go in the future - including, I think, the researchers."

Les organoïdes cérébraux ne sont pas des cerveaux..

...mais ils peuvent soulever des problèmes 'éthiques'..

