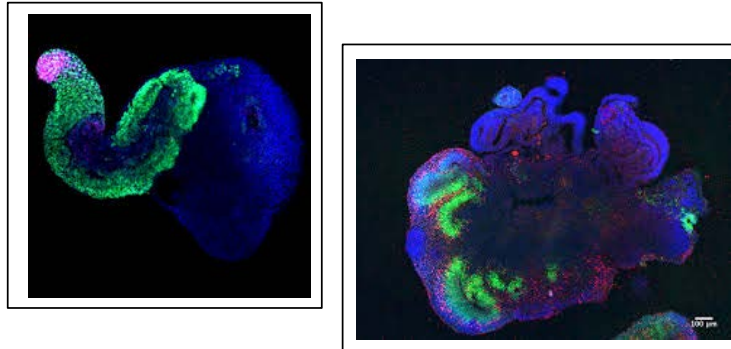




Denis Duboule

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



 @Duboule
 @CdF1530



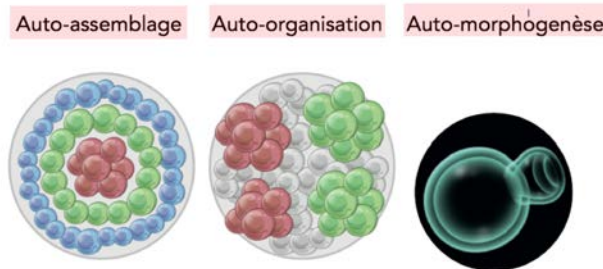
Collège de France
Chaire: *Evolution des Génomes et du Développement*
Denis.Duboule@college-de-france.fr

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

Cours
14 mai 2019

Résumé de l'épisode précédent
Auto-assemblage et auto-organisation
La fabrication des organoïdes
Origine des cellules et signaux exogènes
Cellules ES et iPS

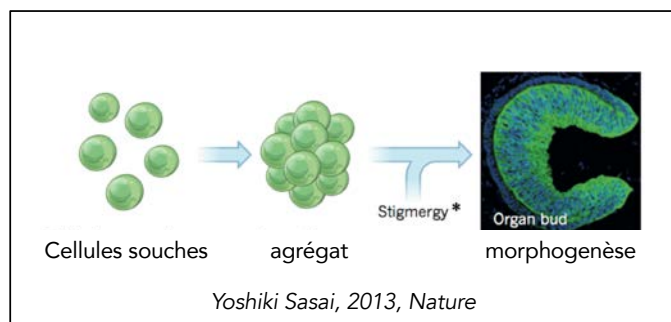
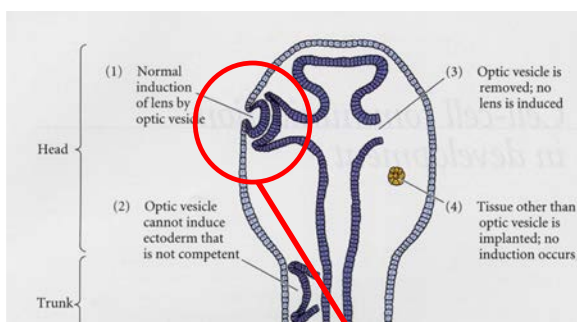
- *Origine historique des cultures en 3D et étapes principales
- *Organoïdes émergent par convergence de disciplines différentes
- *Définitions (variables) mais quelques fondamentaux...
- *...différents **types cellulaires**, avec une **architecture** et certaines **capacités fonctionnelles**.
- *Propriété d'**auto-organisation** (plusieurs niveaux) qui nous renvoie à certains des principes essentiels de la biologie du développement



Yoshiki Sasai, 2013, Nature

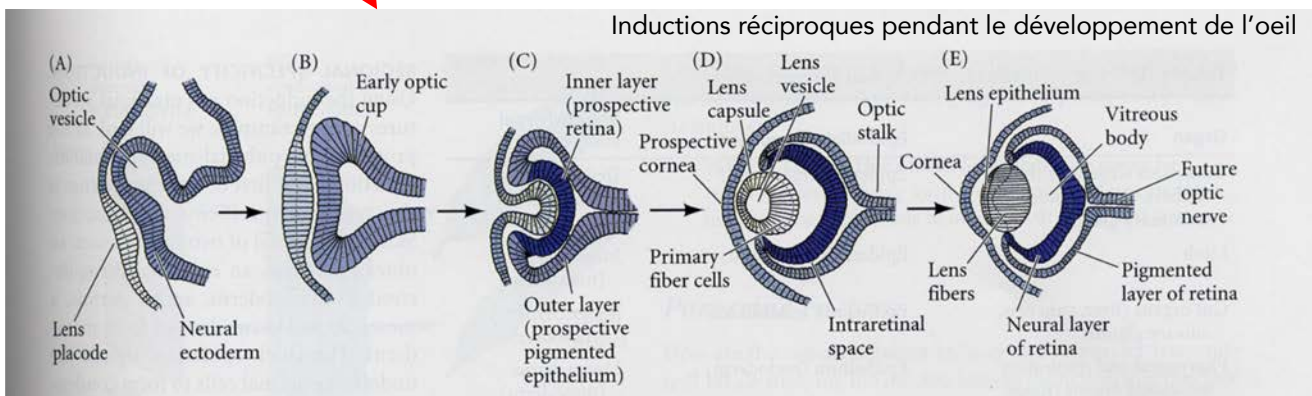
Développement embryonnaire et auto-organisation

Capacité d'auto-organisation



Yoshiki Sasai, 2013, Nature

Inductions réciproques pendant le développement de l'oeil



'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

Capacité d'auto-organisation

Cette capacité est connue depuis longtemps dans différents systèmes, notamment par des expériences de réagrégation.

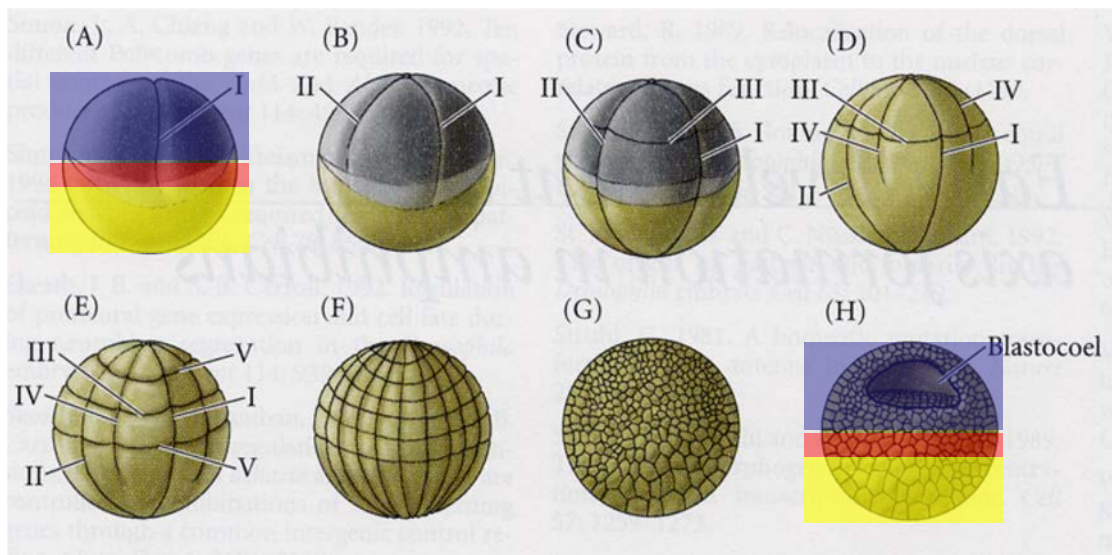
*Expériences de réagrégation chez les amphibiens
(Holtfreter, 1955)

*Expériences de réagrégation chez l'hydre d'eau douce
(Gierer, 1972)

Développement de l'embryon (amphibien)

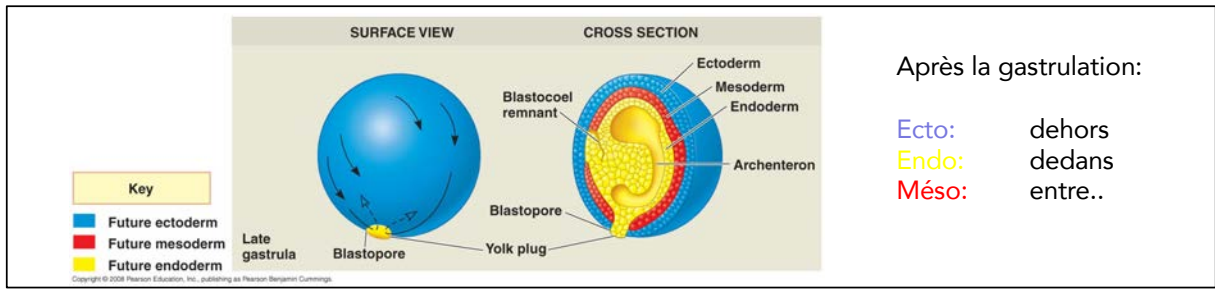
*Le développement est un processus hétérogène, passant par des phases différentes

*1) Phase de production (clivages); 2) phase d'organisation (gastrulation); phase; 3) phase d'organogenèse et de croissance



Les feuilletts embryonnaires

Derivés des trois 'feuilletts embryonnaires' (code de couleurs universel)

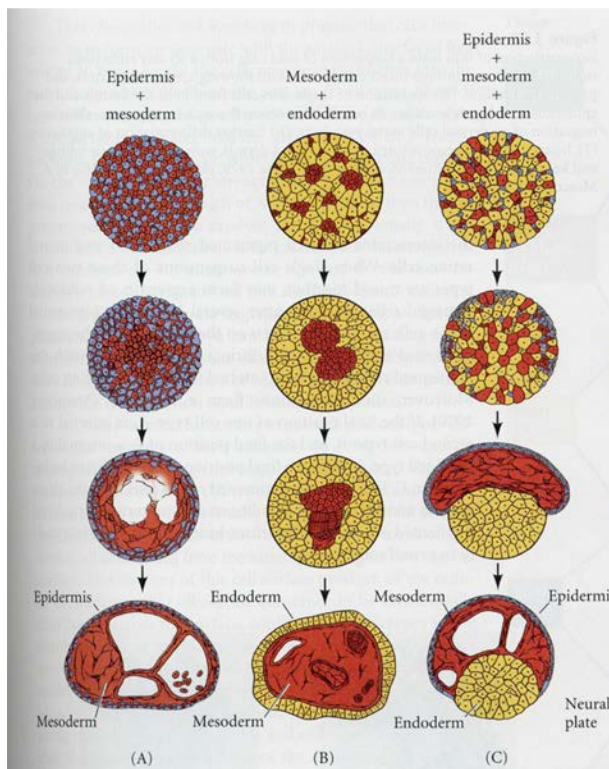


| ECTODERM | MESODERM | ENDODERM |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Epidermis of skin and its derivatives (including sweat glands, hair follicles) • Epithelial lining of mouth and anus • Cornea and lens of eye • Nervous system • Sensory receptors in epidermis • Adrenal medulla • Tooth enamel • Epithelium of pineal and pituitary glands | <ul style="list-style-type: none"> • Notochord • Skeletal system • Muscular system • Muscular layer of stomach and intestine • Excretory system • Circulatory and lymphatic systems • Reproductive system (except germ cells) • Dermis of skin • Lining of body cavity • Adrenal cortex | <ul style="list-style-type: none"> • Epithelial lining of digestive tract • Epithelial lining of respiratory system • Lining of urethra, urinary bladder, and reproductive system • Liver • Pancreas • Thymus • Thyroid and parathyroid glands |

A l'intérieur se trouvent les glandes et le tube digestif (endo) entourés par le squelette et les muscles (meso) qui sont eux-mêmes entourés et protégés par une couche externe (ecto) qui produit également le système nerveux

'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

Les réagrégations de Holtfreter (1955)



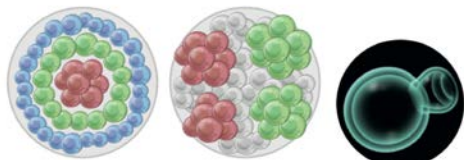
Réagrégations de cellules de blastula d'amphibiens dérivées des trois feuilletts germinatifs

Auto-assemblage?

Auto-organisation?

Auto-morphogénèse?

Auto-assemblage Auto-organisation Auto-morphogénèse



'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

Capacité d'auto-organisation

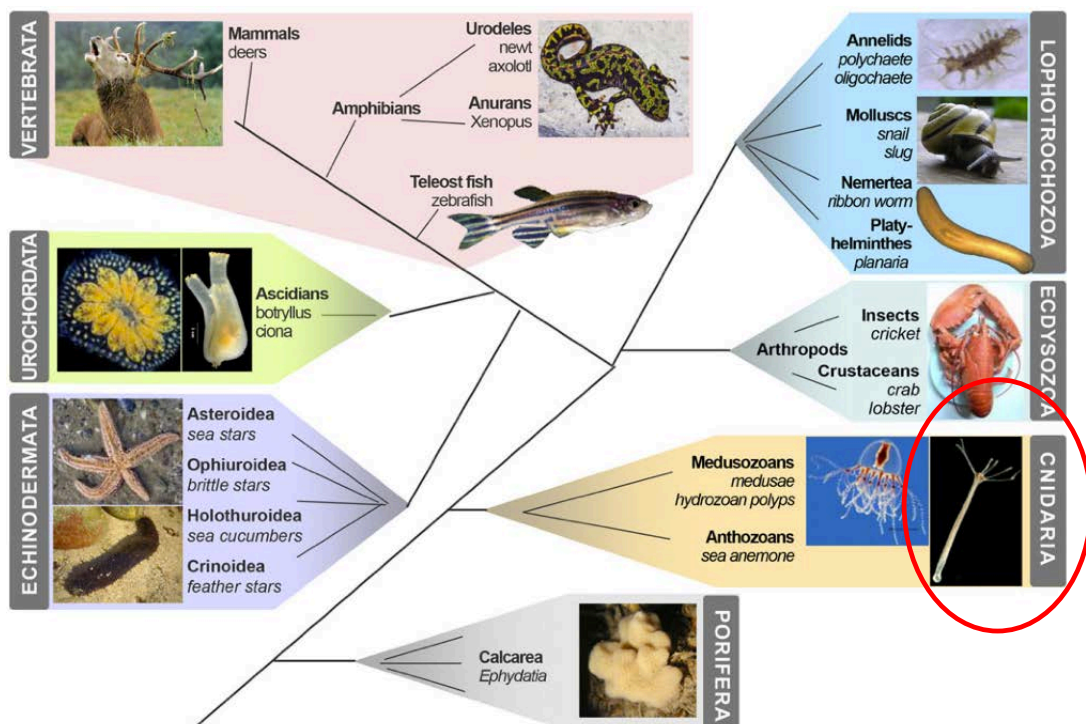
Cette capacité est connue depuis longtemps dans différents systèmes, notamment par des expériences de réagrégation.

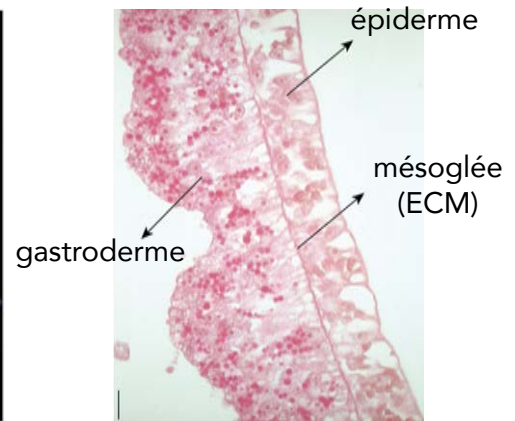
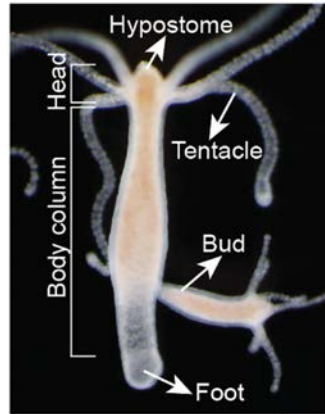
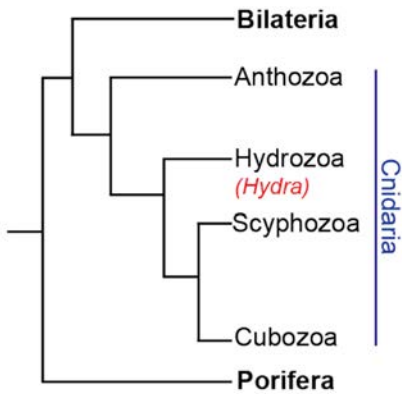
*Expériences de réagrégation chez les amphibiens
(Hofreiter, 1955)

*Expériences de réagrégation chez l'hydre d'eau douce
(Gierer, 1972)

L'hydre et les expériences de Gierer (1972)

L'hydre d'eau douce



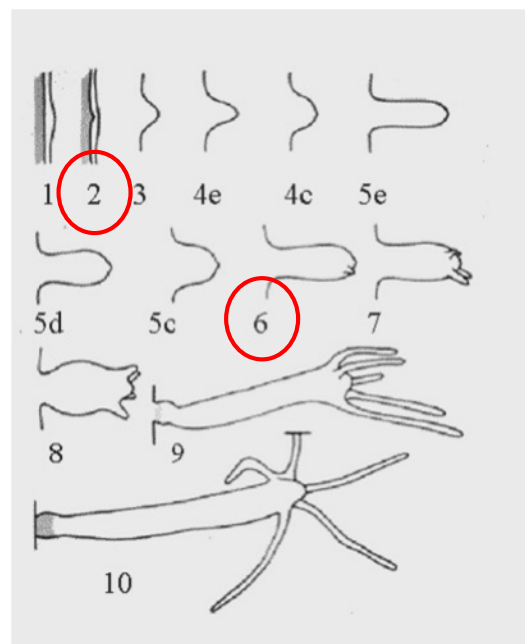


- *Espèce très commune, dans l'eau douce
- *Phase de polype seulement, pas de méduse
- *50'000 à 100'000 cellules/animal
- *0.5 à 2 cm de longueur

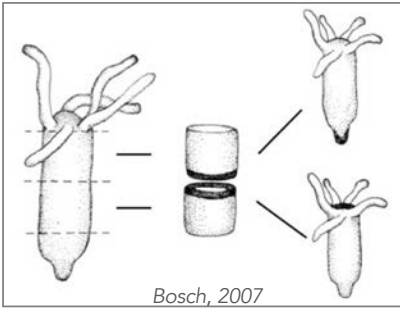
Courtesy Brigitte Galliot, Université de Genève

En conditions de laboratoire, les hydres se 'reproduisent' principalement par bourgeonnement

- *24 heures du stade 2 au stade 6
- *Les bourgeons sont mûrs et prêts à se détacher après 2 jours
- *Les animaux bien nourris bourgeonnent à peu près deux fois par semaine



L'hydre d'eau douce



L'hydre peut régénérer toutes les parties de son organisme, à n'importe quel niveau

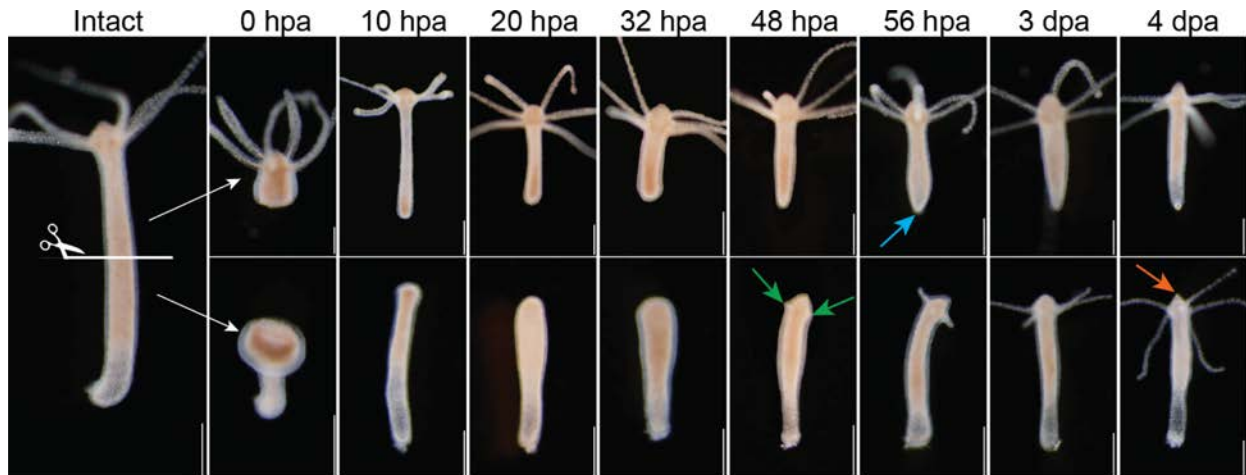


Trembley (1744; régénération)

'Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce - Réaumur - à bras en forme de cornes'

Pallas (1766; Hydre)

Serpent à sept têtes



Courtesy Brigitte Galliot, Université de Genève

L'hydre et les expériences de Gierer (1972)

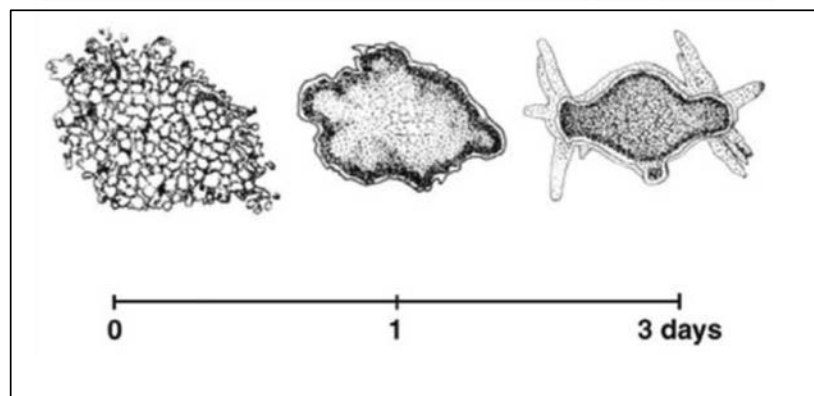
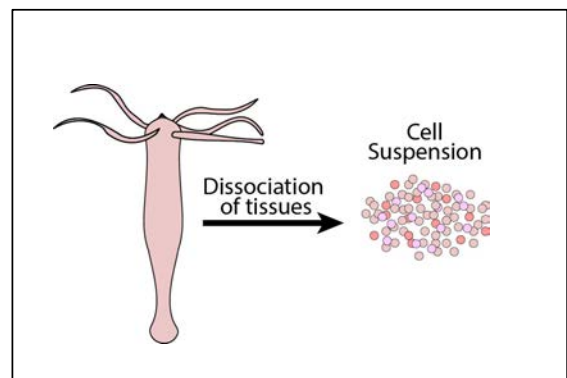
Regeneration of Hydra from Reaggregated Cells

A. GIERER, S. BERKING, H. BODE*, C. N. DAVID, K. FLICK, G. HANSMANN, H. SCHALLER & E. TRENKNER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, 74 Tübingen, Spemannstrasse 35

NATURE NEW BIOLOGY VOL. 239 SEPTEMBER 27 1972

*Réagrégation des cellules après dissociation en cellules uniques en suspension



Regeneration of Hydra from Reaggregated Cells

A. GIERER, S. BERKING, H. BODE*, C. N. DAVID, K. FLICK, G. HANSMANN, H. SCHALLER & E. TRENKNER

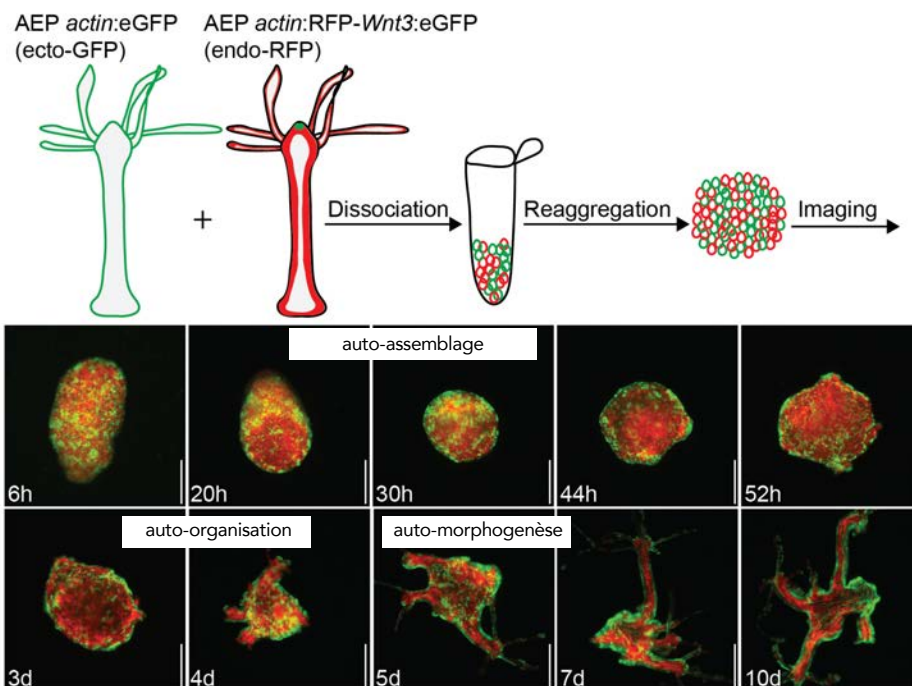
Max-Planck-Institut für Virusforschung, 74 Tübingen, Spemannstrasse 35

NATURE NEW BIOLOGY VOL. 239 SEPTEMBER 27 1972

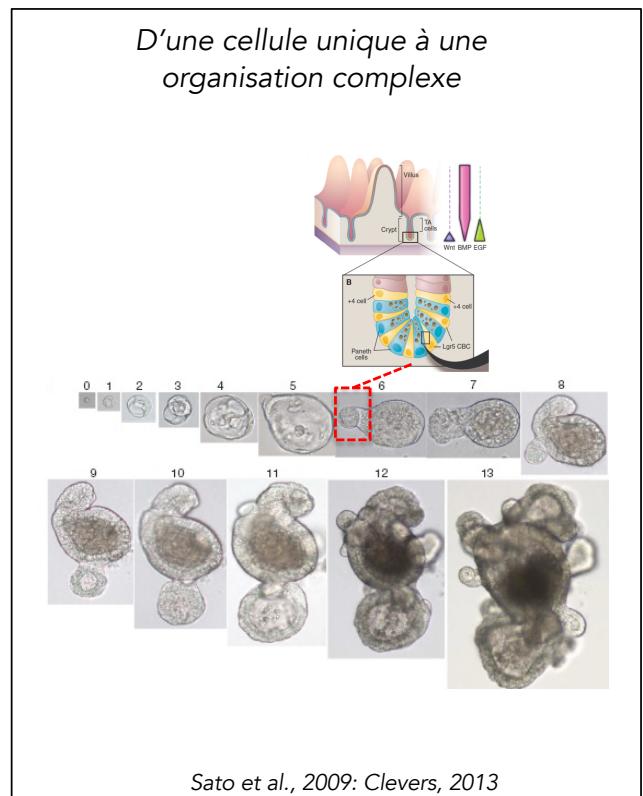
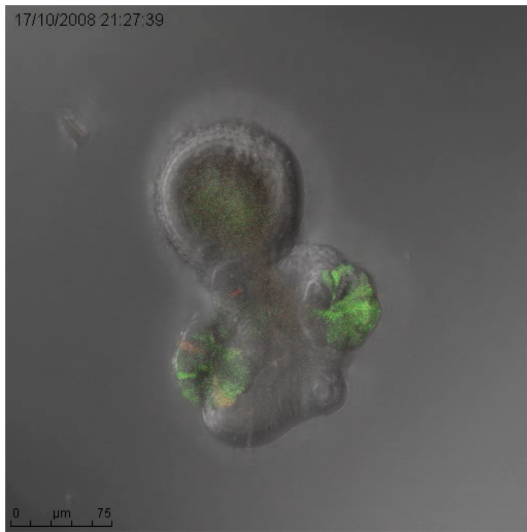
<https://www.youtube.com/watch?v=1DGIIIEISQMA>

L'hydre d'eau douce

Expériences de réagréations avec marquages des cellules (Hydres marquées)



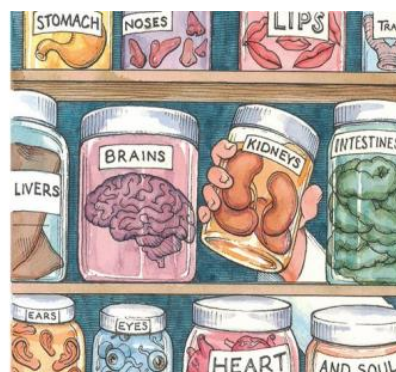
Capacité d'auto-organisation



Organoïdes

Fabrication des organoïdes:

Types de cultures in vitro



Types principaux de cultures

Paramètres variables:

*Protéines ECM

*Composition de l'ECM

*Rigidité de l'ECM

*Gradients liquides

*Input: Cellules souches, tissu

*Composition de l'ECM

*Organisation et rigidité de l'ECM

*Cellules stromales

*Gradients intra-gels et liquides

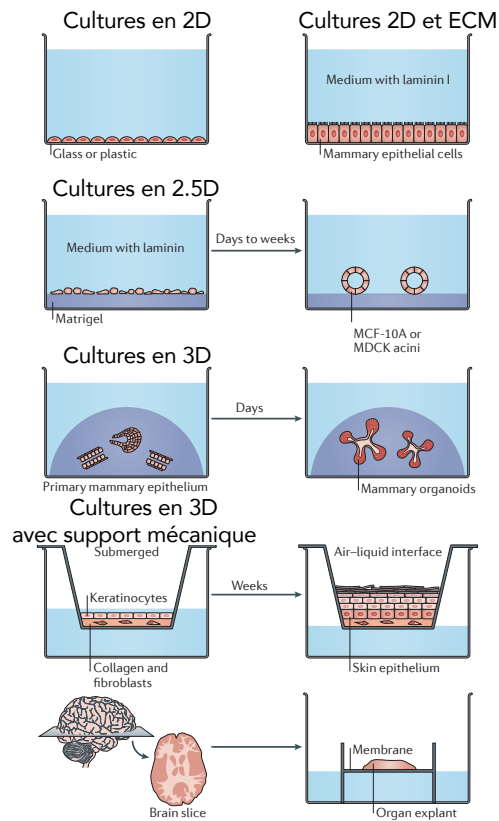
*Organisation tissulaire stratifiée

*Composition de l'ECM

*Cellules stromales (séparées?)

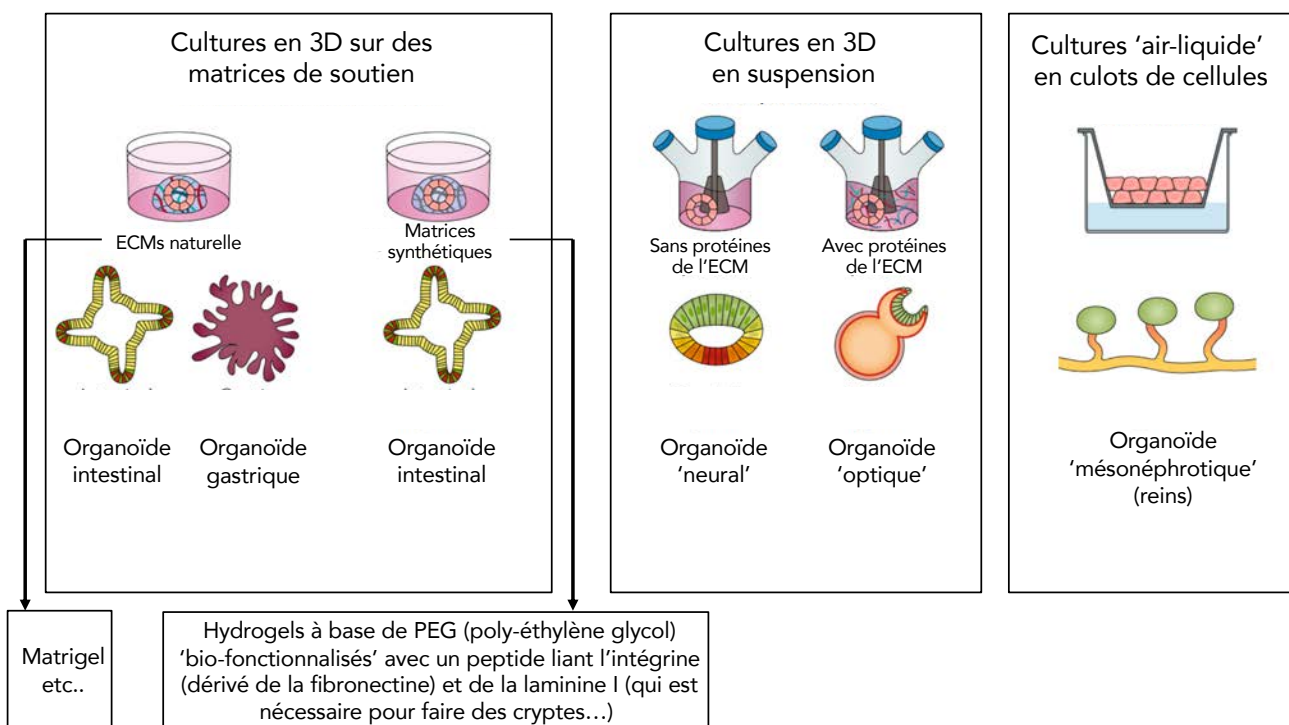
*Interface air-liquide

*Culture en immersion



Shamir and Ewald, 2014, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.

Caractéristiques physiques de l'environnement de culture



D'autres organoïdes (poumons, colon, foie..) ne requiert pas de laminine I, Un paramètre essentiel semblant être la densité/rigidité de l'hydrogel

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

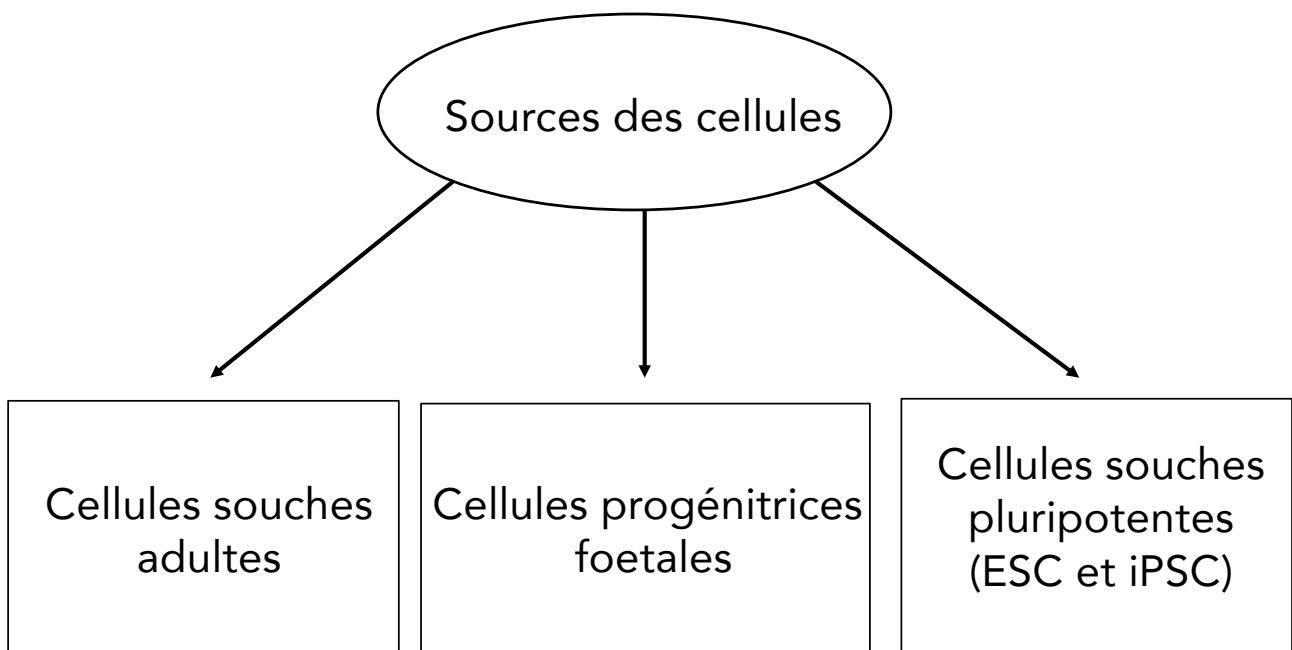
Organoïdes

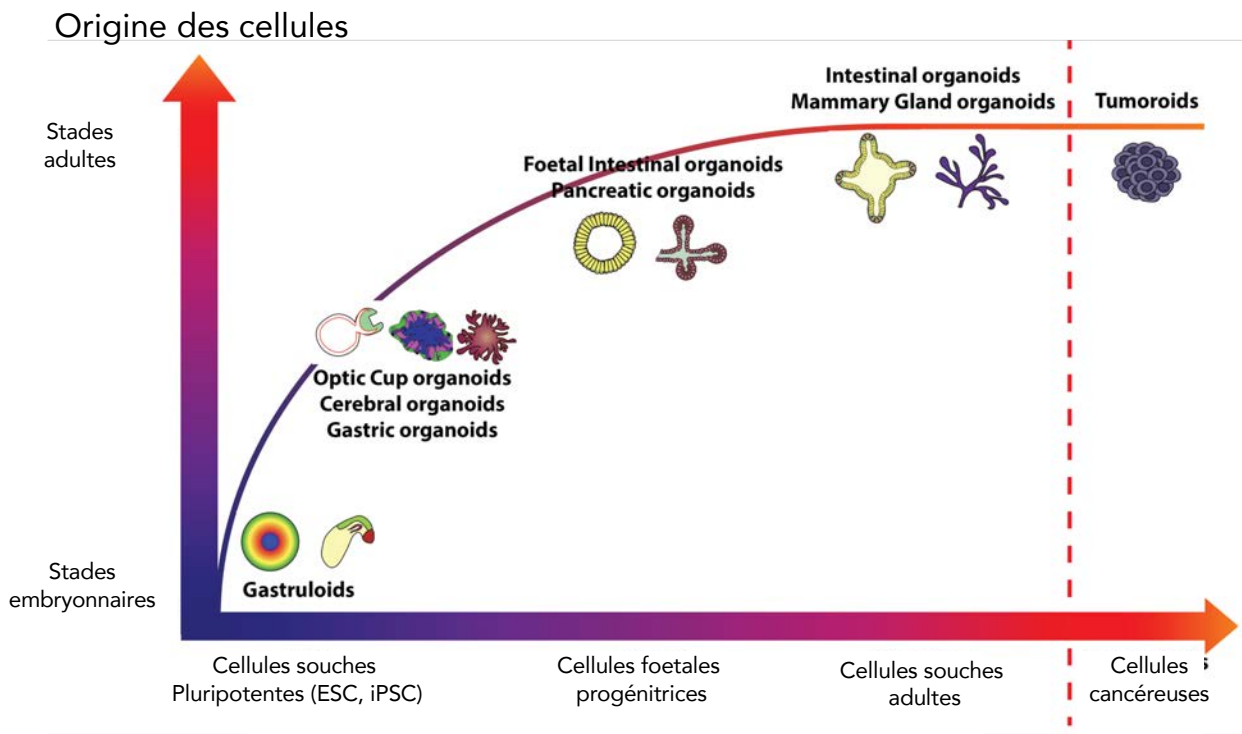
Secrets de fabrication:

*Origines des cellules, signaux
endogènes et exogènes*

Organoïdes: Origine cellulaire et production

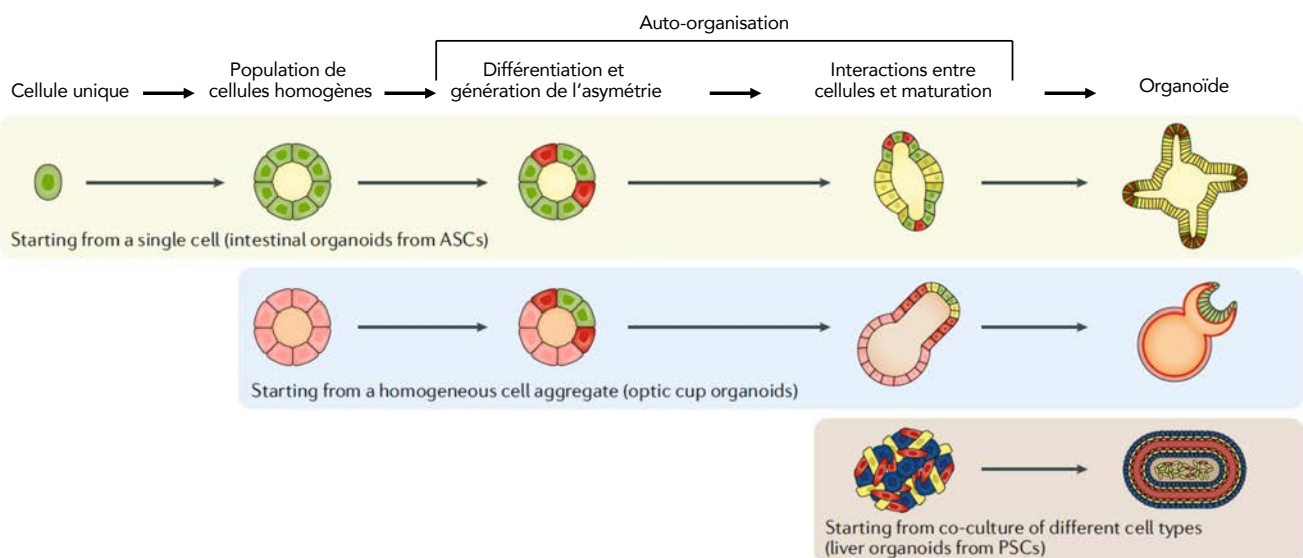
Origine des cellules





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

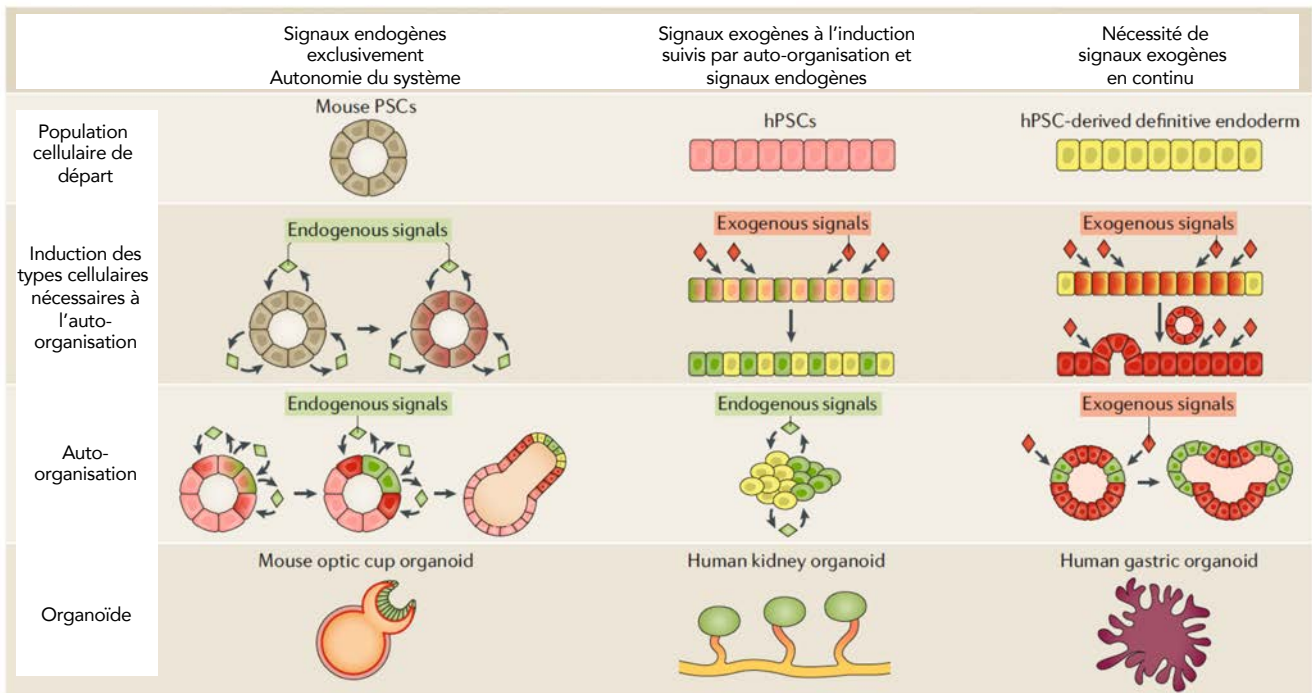
Caractéristiques physiques de l'environnement de culture
Conditions et états cellulaires à l'initiation



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

Organoïdes: Origine cellulaire et production

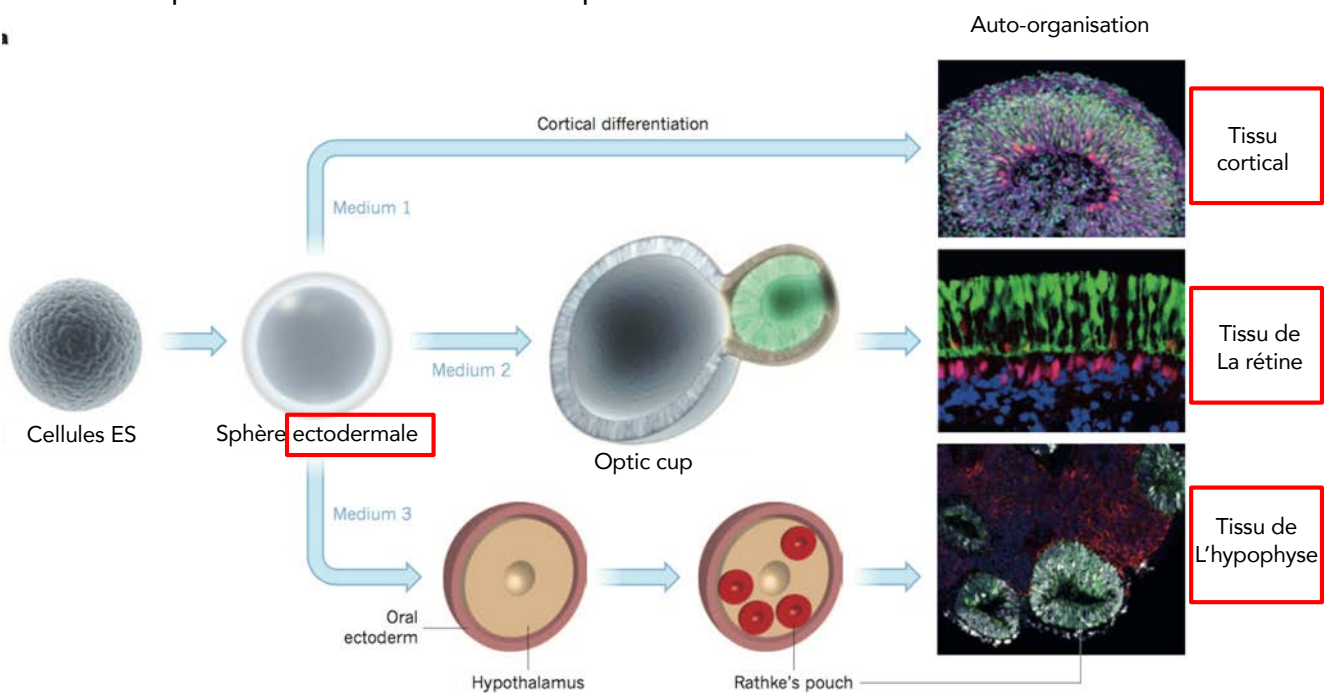
Caractéristiques physiques de l'environnement de culture
Signaux endogènes et exogènes



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

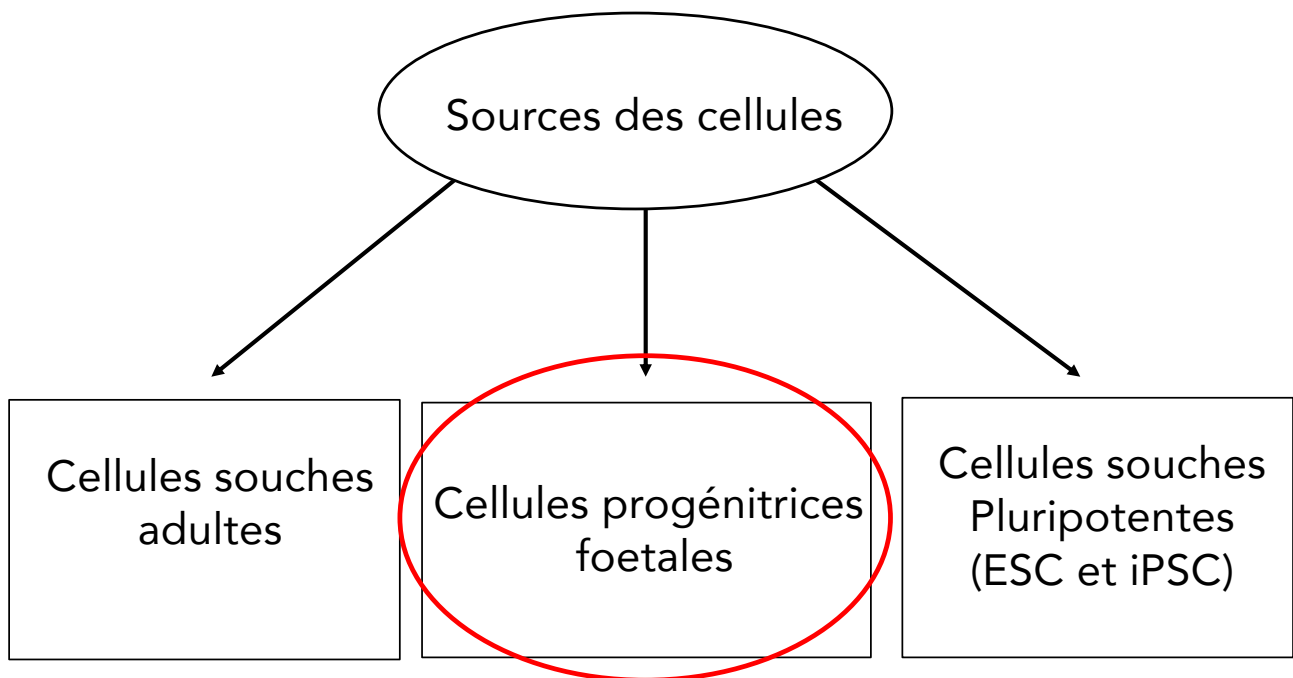
Organoïdes: Origine cellulaire et production

Importance de l'environnement de culture...
....et importance des cellules de départ...



Yoshiki Sasai, 2013, Nature

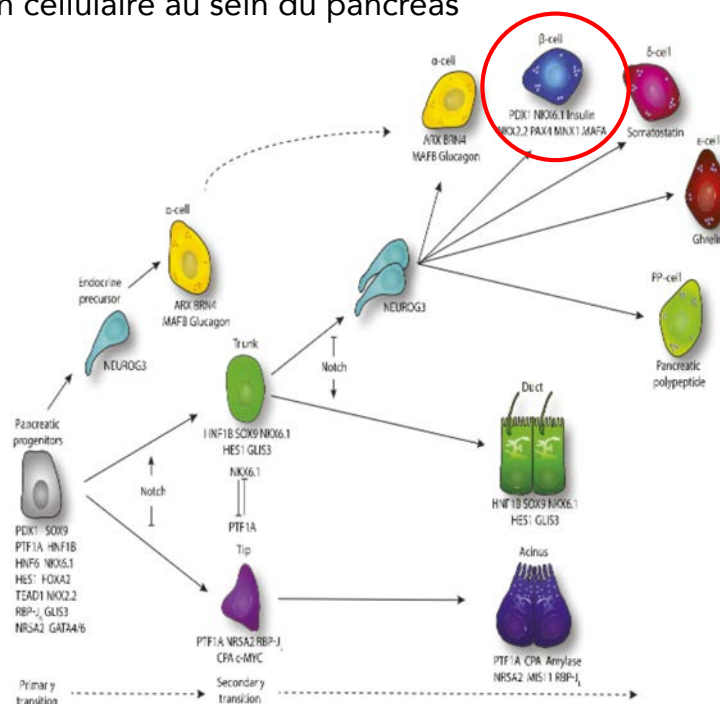
Origine des cellules



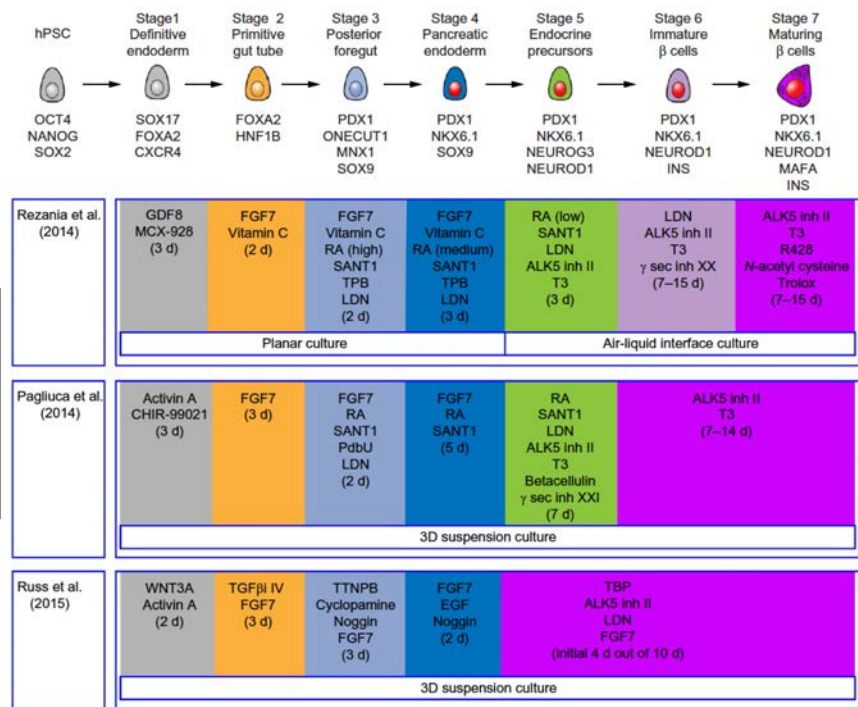
Organoïdes: Cellules progénitrices foetales

Exemple des organoïdes de pancréas (produits à partir de cellules foetales)

*Différenciation cellulaire au sein du pancréas



*Différents protocoles peuvent conduire à des résultats similaires

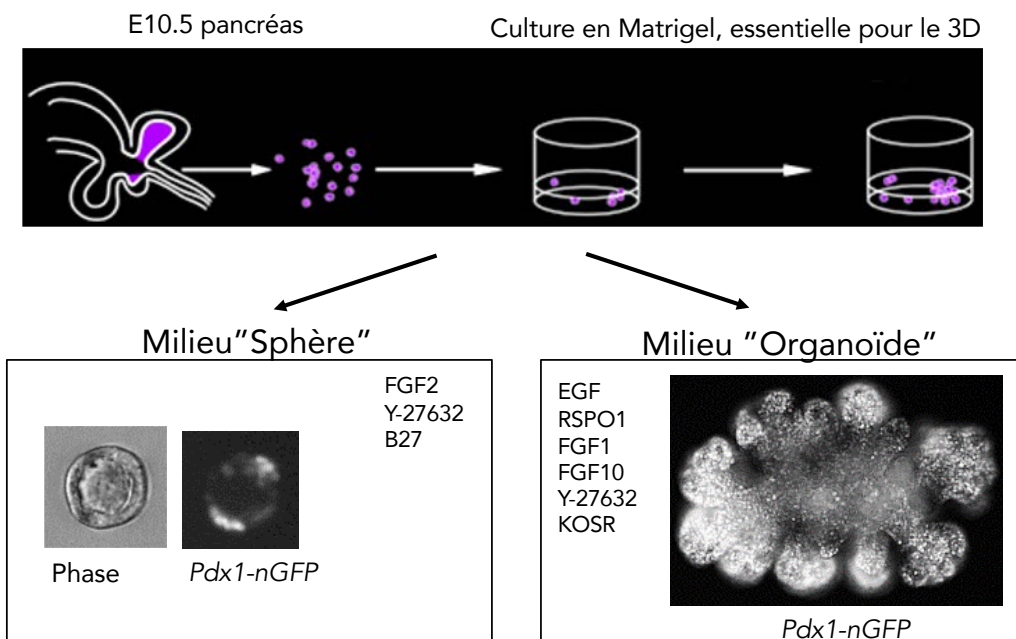


Recapitulating and Deciphering Human Pancreas Development From Human Pluripotent Stem Cells in a Dish

Maja B.K. Petersen^{1,2}, Carla A.C. Gonçalves^{1,2}, Yung Hae Kim¹, Anne Grapin-Botton¹
Curr., Top. Dev. Biol. (2018)

Organoïdes: Cellules progénitrices foetales

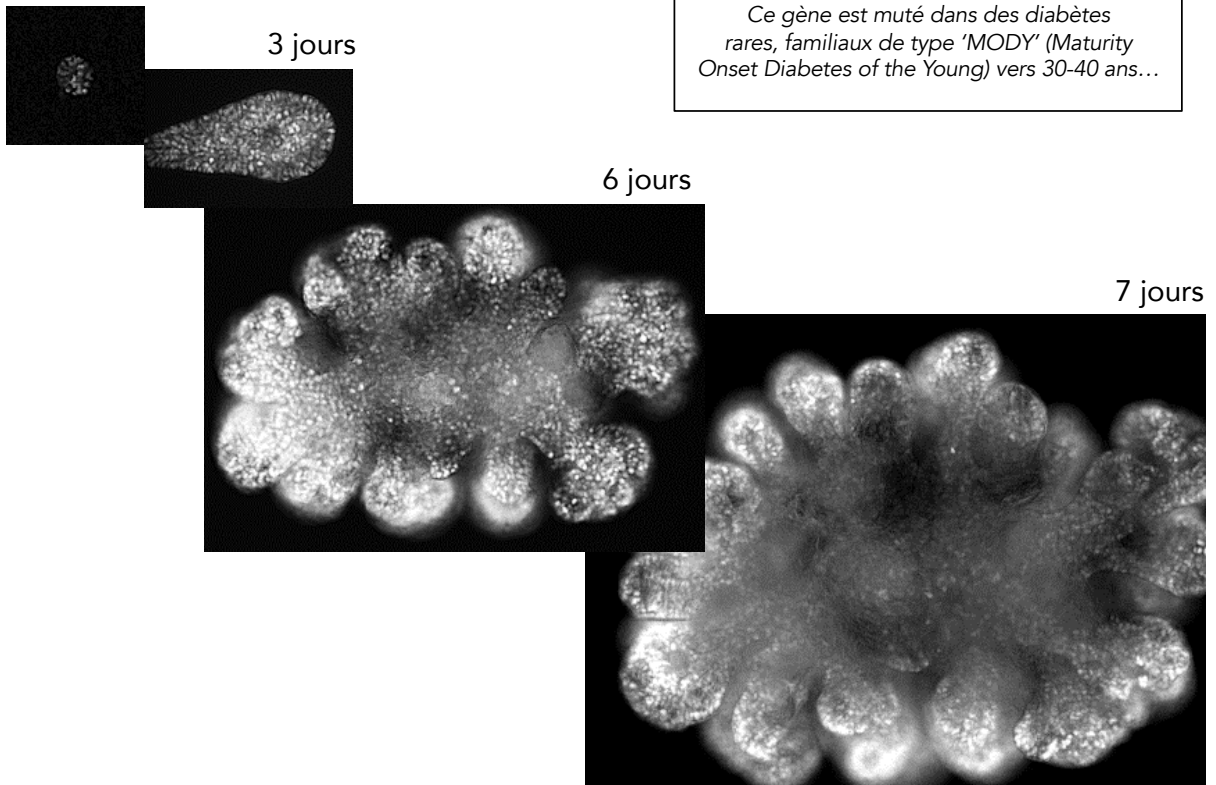
Exemple des organoïdes de pancréas.



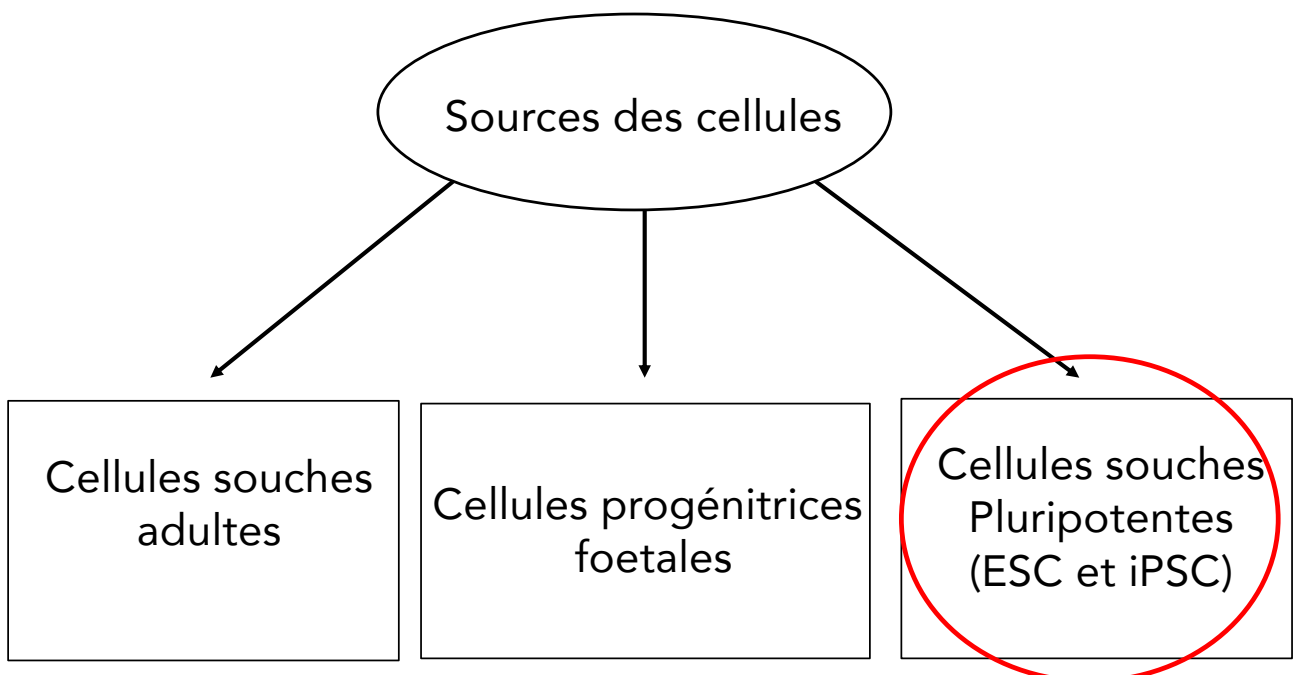
Exemple des organoïdes de pancréas.

Pdx1-nGFP

Ce gène est muté dans des diabètes rares, familiaux de type "MODY" (Maturity Onset Diabetes of the Young) vers 30-40 ans...



Origine des cellules



Organoïdes

Cellules ES et iPS:

Origines et bref historique

Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)

Bref historique



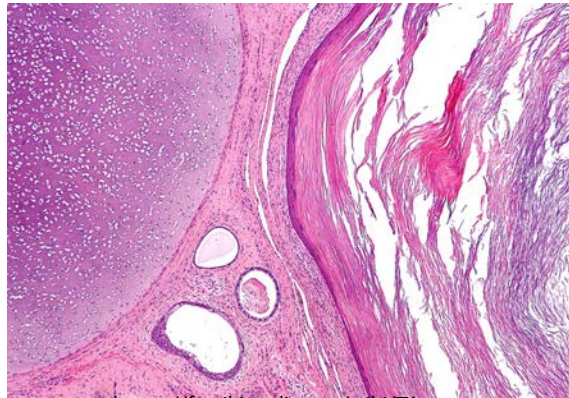
Leroy C. Stevens
(1920-2015)
Laboratoire Jackson (Maine, USA)

Dans les années 1950s, Roy Stevens remarque une souris mâle de la souche 129 avec une tumeur dans le scrotum. Il sélectionnera cette lignée (129Sv –Ter) qui est sensible au développement de tératomes.

| | | | |
|---|-------|---|--|
| 129X1/SvJ (129/SvJ) | 129X1 | A^m/A^m Oca2 ^o Tyr ^{c-01} /Oca2 ^o Tyr ^c or A^m/A^m Oca2 ^o Tyr ^c /Oca2 ^o Tyr ^c or A^m/A^m Oca2 ^o Tyr ^{c-01} /Oca2 ^o Tyr ^{c-} | white-bellied, pink-eyed, light chinchilla (off-white) or albino or white-bellied, pink-eyed, light chinchilla (light tan) |
| 129S1/Sv-Oca2 ^o Tyr ^c Kit ^{fl} /J (129/Sv-p ⁺ Tyr ^c Kit ^{fl} /J) (129/Sv-+P + Tyr ^c + Mg ^{fl} /J) | 129S1 | A^m/A^m Kit ^{fl-1} /Kit ^{fl+} | white (or light)-bellied agouti, coat color dilution, variable white spotting |
| 129S1/SvImJ (129S3/SvImJ) (129/SvImJ) (129/Sv-p ⁺ Tyr ^c Kit ^{fl} /J) (129Sv-+P + Tyr ^c + Mg ^{fl} /J) | 129S1 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S2/SvPas (129/SvPas) | 129S2 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S4/SvJae (129/SvJae) | 129S4 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S5/SvEvBrd (129/SvEvBrd) | 129S5 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S9/SvEvH (129/SvEv) | | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S6/SvEvTac (129/SvEvTac) | 129S6 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S7/SvEvBrd-Hprt ^{1b-m2} (129/SvEvBrd-Hprt ^{1b-m2}) | 129S7 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129S8/SvEvBrd-Hprt ^{1b-m2} (129/SvEvBrd-Hprt ^{1b-m2}) | 129S8 | A^m/A^m | white (or light)-bellied agouti |
| 129T1/Sv-Oca2 ^o Tyr ^{c-01} Dnd1 ^{fl} /J (129/Sv-p ⁺ Tyr ^{c-01} Ter/+@Na) (129/Sv-+P Tyr ^{c-01} Ter/+@Na) | 129T1 | A^m/A^m Tyr ^{c-01} /Tyr ^{c-01} | white (or light)-bellied chinchilla |
| 129T2/SvEms (129/SvEms-Ter ¹⁷³) | 129T2 | A^m/A^m Tyr ^{c-01} /Tyr ^{c-01} | white (or light)-bellied chinchilla |
| 129T3/SvEmsJ (129/SvEms-Ter ¹⁷³) | 129T2 | A^m/A^m Tyr ^{c-01} /Tyr ^{c-01} | white (or light)-bellied chinchilla |

Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)

Tératomes, tératocarcinomes.. (tumeurs 'dysembryoplasiques')



<https://fr.wikipedia.org/wiki/Tératome>

Fin des années 1970's: Etudes des cellules souches de tératocarcinomes (ECCs)
Conditions de cultures, analyses des protéines... Normalisation au sein de
l'embryon normal de souris... (USA, UK, puis François Jacob à Pasteur...)
Développement des technologies associées...

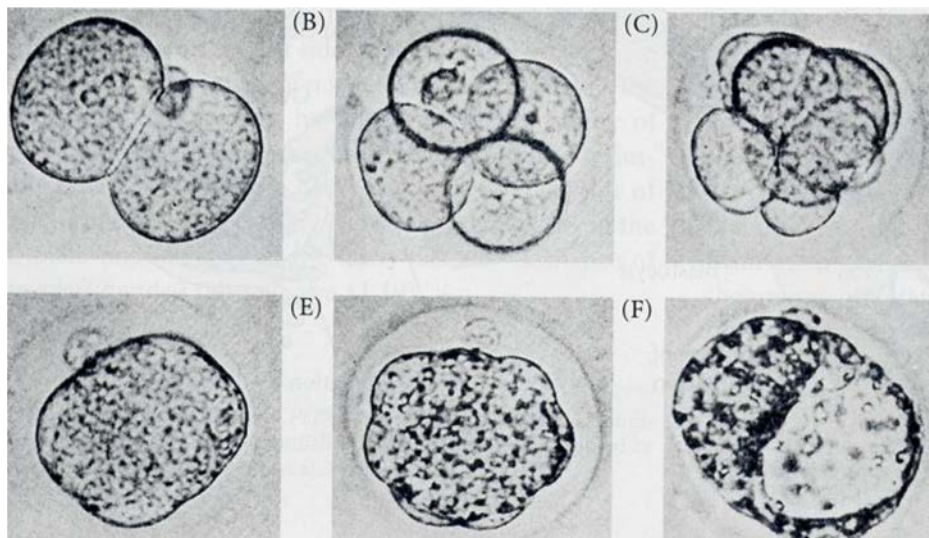
En parallèle, développement de l'embryologie des mammifères *in vitro*
Techniques de culture etc (première IVF Louise Brown en Angleterre 1978)

Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)

Emergence des cellules souches embryonnaires (début 1980's)

Souris: (1981) Evans, Kaufman and Martin

Humains: (1998)

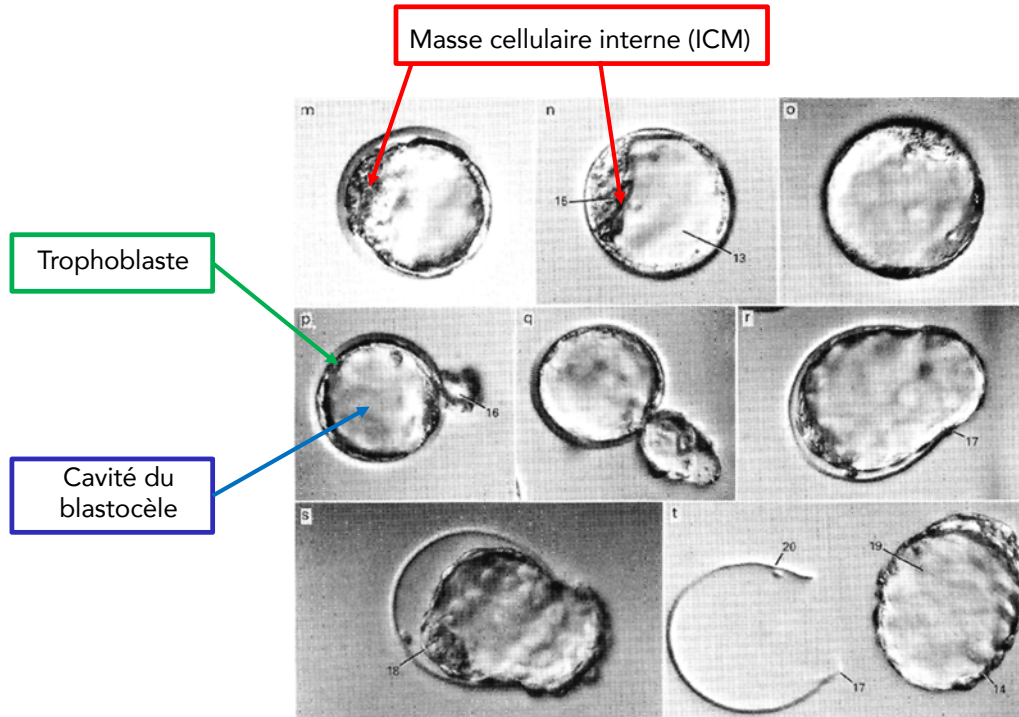


'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)

Emergence des cellules souches embryonnaires (début 1980's)

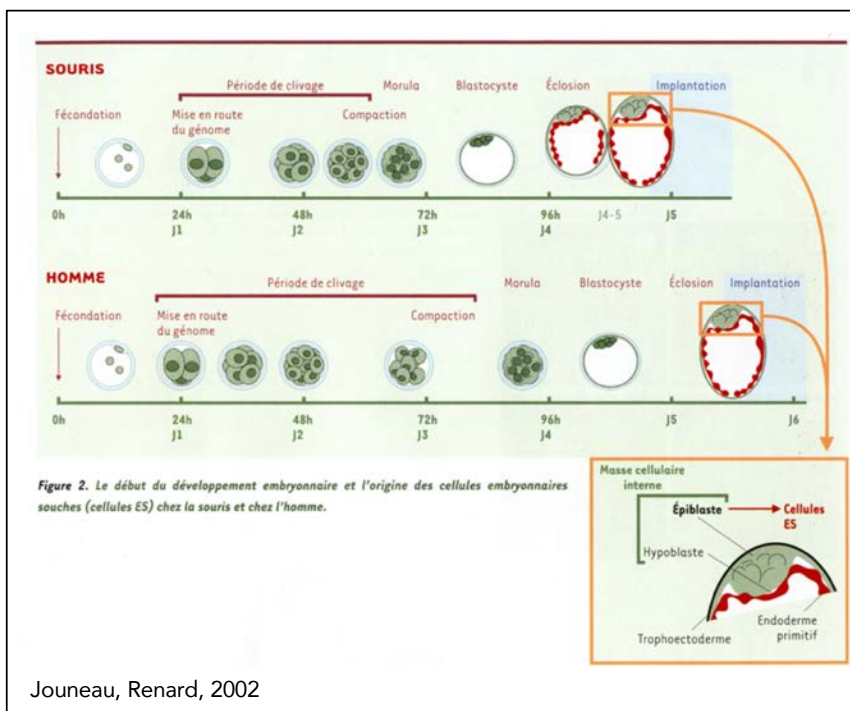
Blastocyste: éclosion *in vitro*, sortie de la zone pellucide



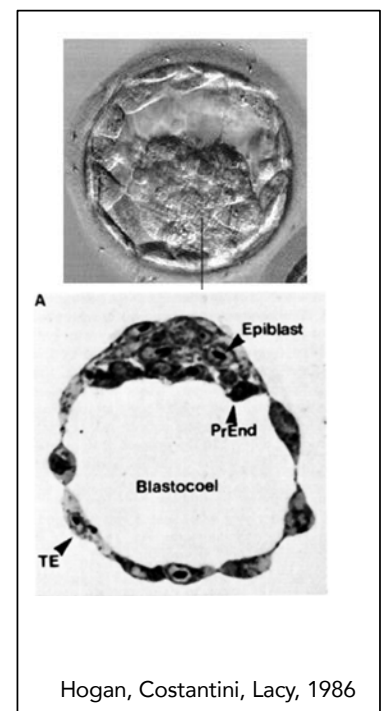
Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)

Emergence des cellules souches embryonnaires

Comparaison des timings entre la souris et les humains

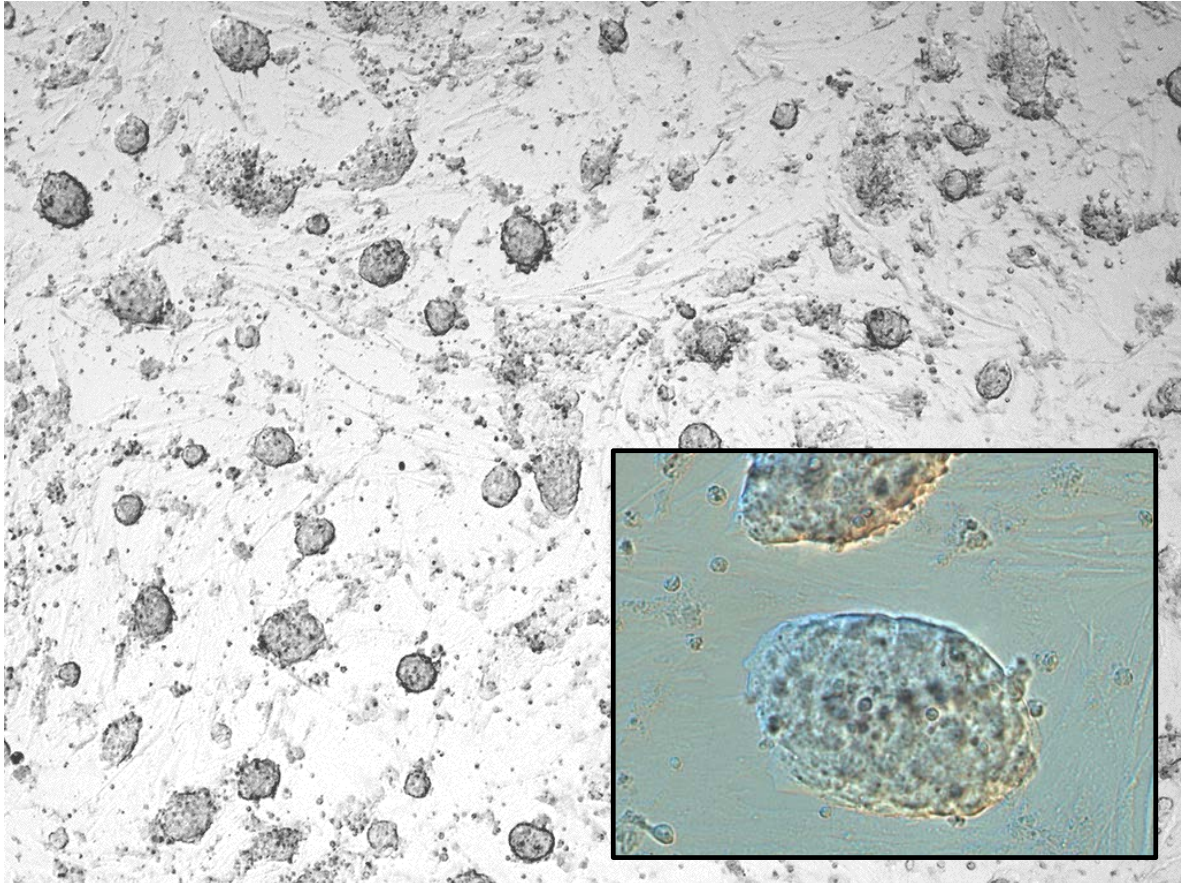


Jouneau, Renard, 2002



Hogan, Costantini, Lacy, 1986

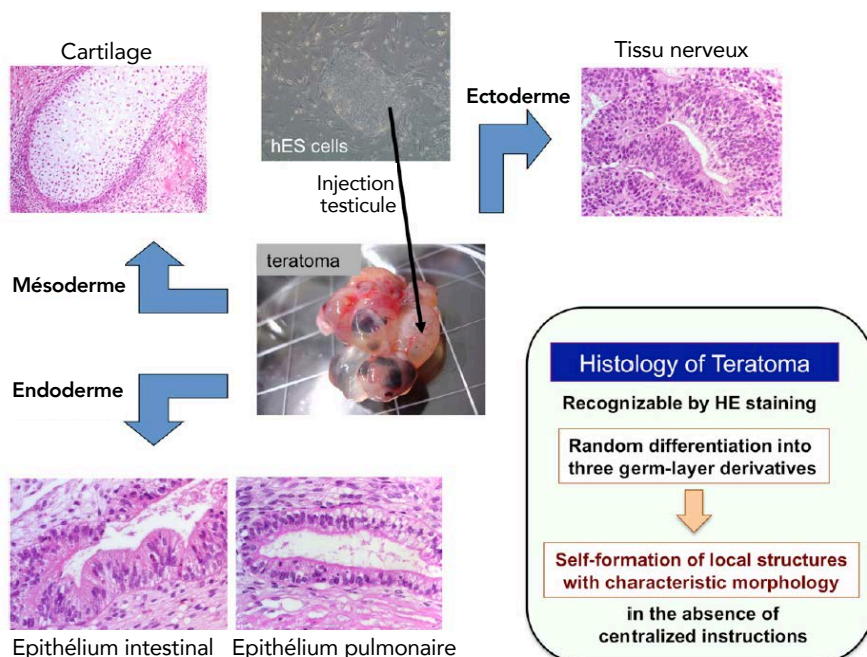
Cellules souches embryonnaires (ESC, iPSC)



Cellules souches embryonnaires (ESC)

Les cellules souches embryonnaires sont multipotentes (mais pas 'totipotentes')
Elle peuvent refaire un embryon entier (mais pas de membranes extra-embryonnaire)

Tératome par injection de cellules souches ES dans les testicules



Emergence des cellules reprogrammées (iPS; *induced pluripotent stem cells* ou 'cellules souches pluripotentes induites')

Cellules de souris (fibroblastes): 2006

Cellules humaines: 2007

Les cellules sont reprogrammées par l'introduction de quatre gènes connus pour leurs fonctions associées à l'état de 'cellule souche': *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*.



Photos: Tokyo University