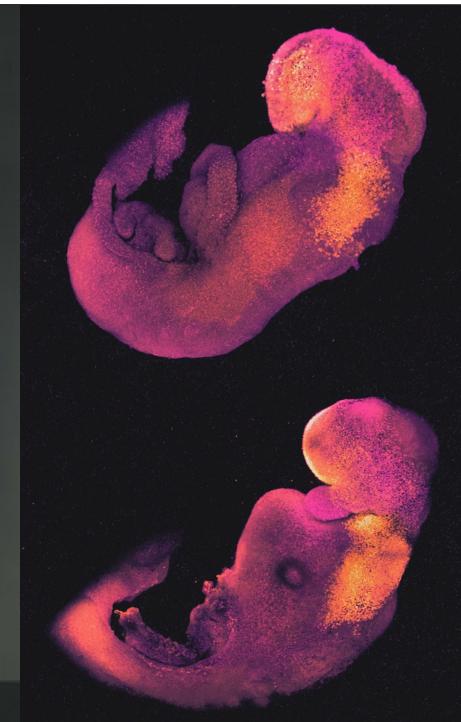


Collège de France; Chaire:
Evolution du Développement et des Génomes
Denis.Duboule@college-de-france.fr

Cours 2024: *La Fabrique des 'Embryons'*



Fœtus humain
'stade Carnegie' 23
(app 60 jours, 20 mm)



Embryon et embryoïde
de souris à 8,5 jours
Amadei *et al.* *Nature* 2021



Denis Duboule/2024



La Fabrique des Embryons



Cours 2024: La Fabrique des 'Embryons'

Déroulé du cours

- **Cours #2:** 21 mai 2024. Quelques notions d'embryologie comparée, Cellules ES et cellules iPS comme matériel de base pour fabriquer des pseudo-embryons. Culture d'embryons à long terme ex-utéro; Production de blastoïdes humains, efficacité, tests d'implantation *in vitro*, comparaison avec la souris.

*Cultiver des embryons *in vitro* et fabriquer des blastoïdes humains*

Embryologie comparée de l'embryon humain (pré-implantation)



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons



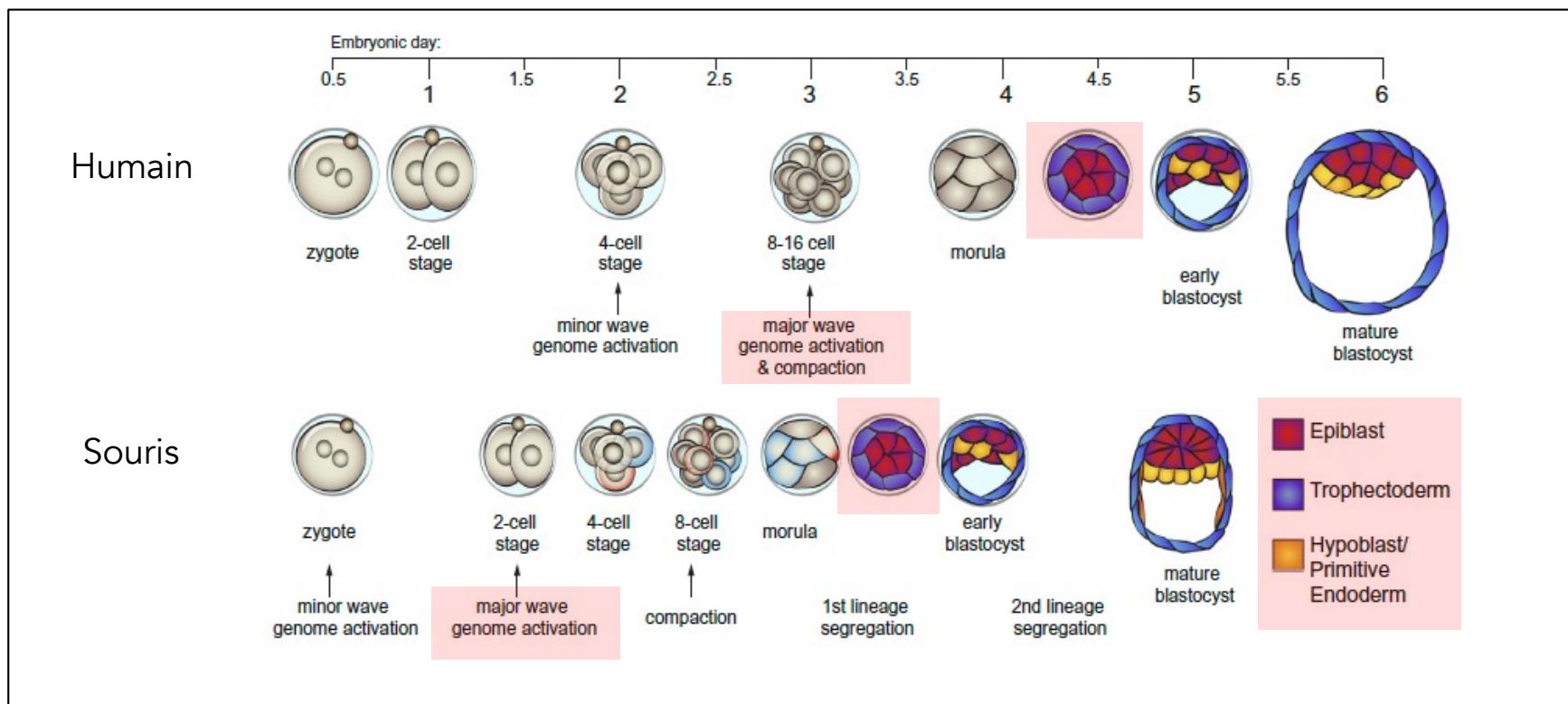
Current Topics in Developmental Biology
Volume 136, 2020, Pages 113-138



Chapter Four - Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation

Matteo A. Molè [†], Antonia Weberling [†], Magdalena Zernicka-Goetz  

- *Tempo différents...
- *Périodes d'activation des génomes différentes
- *Temps d'apparition des linéages différents
- *Tailles des blastocystes différentes (200 vs 120 microns)
- *Structures des épiblastes différentes (rosette..)
- *Résultat final assez semblable..(blastocystes, avec les trois linéages initiaux dans la même disposition)



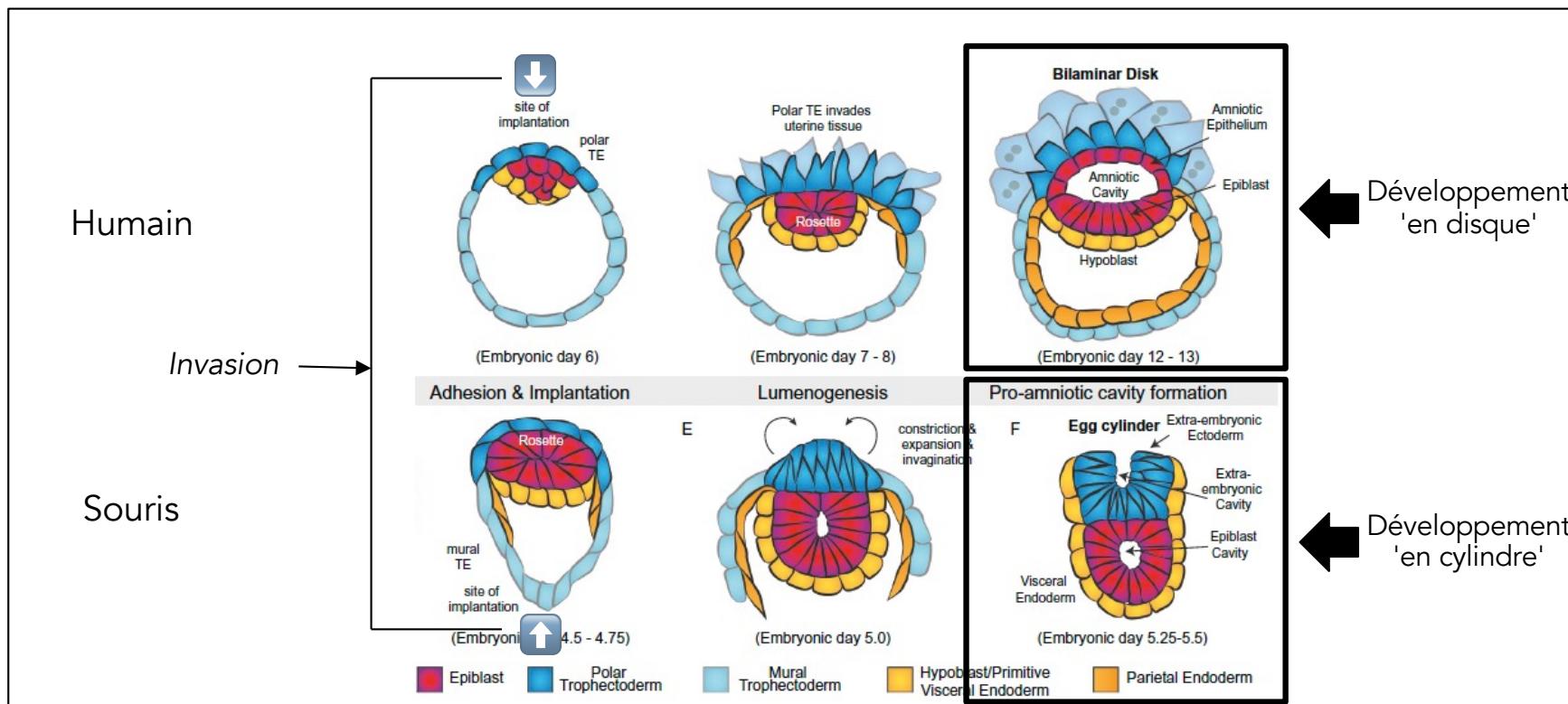
Embryologie comparée de l'embryon humain (implantation)



Chapter Four - Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation

Matteo A. Molè[†], Antonia Weberling[†], Magdalena Zernicka-Goetz  

- *Humain: Invasion par le trophectoderme polaire 
- * Au jour 7, l'épiblaste s'organise en rosette et une cavité apparaît (futur cavité amniotique).
- *Un disque se forme avec deux couches (épi-, hypo-).
- *Souris: Invasion par le trophectoderme mural 
- *Formation d'une rosette d'épiblaste mais avec des tensions mécaniques menant à une extension de la structure formant un cylindre-oeuf (egg-cylinder)



Rappel bref concernant la 'gastrulation'



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

*Une fois l'œuf fécondé s'étant divisé suffisamment, les premiers événements de séparation de linéages cellulaires s'effectuent (chez les mammifères d'abord entre l'épiblaste et le trophectoderme). Peu après l'établissement de ces linéages, et suite à un commencement d'organisation topologique (apparition d'une cavité etc), une période critique de réorganisation de l'embryon commence, qui va durer quelques jours. C'est la *gastrulation*.

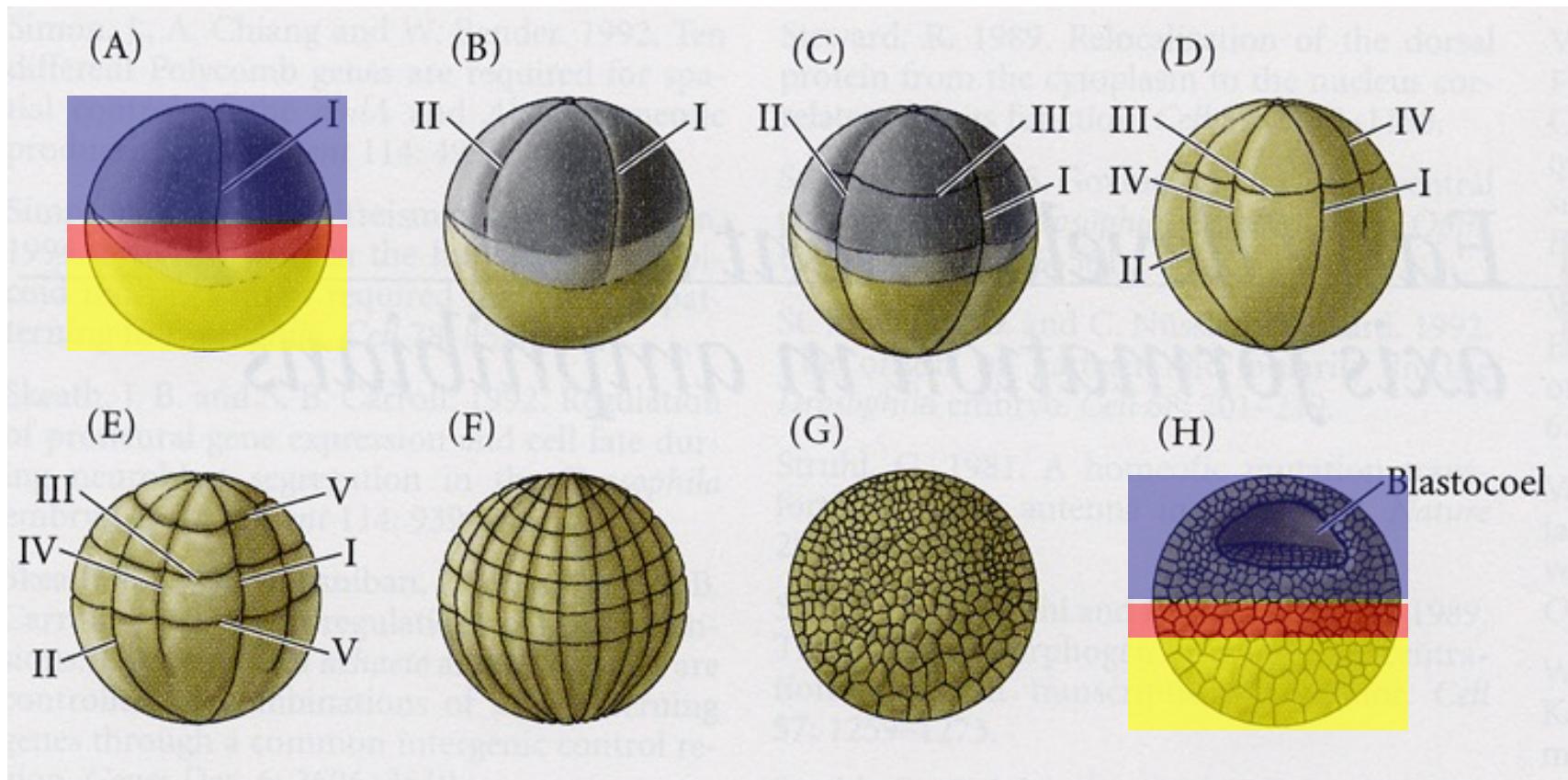
A l'issue de la gastrulation, l'embryon apparaît sous une forme 'fœtale', avec des polarités générales établies. A ce stade, les trois feuillets germinatifs ont pris leurs places définitives, marquant ainsi l'architecture fondamentale du fœtus, sur laquelle l'organogenèse va se dérouler.

Ce dernier point est vraisemblablement le résultat le plus critique de la gastrulation, qui peut ainsi se dérouler de façons assez différentes entre certains groupes de vertébrés, tant que cette distribution finale des différents feuillets germinatifs est obtenue.

Développement de l'embryon (amphibien)

*Dépôt dans l'oocyte par la mère de déterminants qui vont déjà donner des informations sur les linéages à venir.

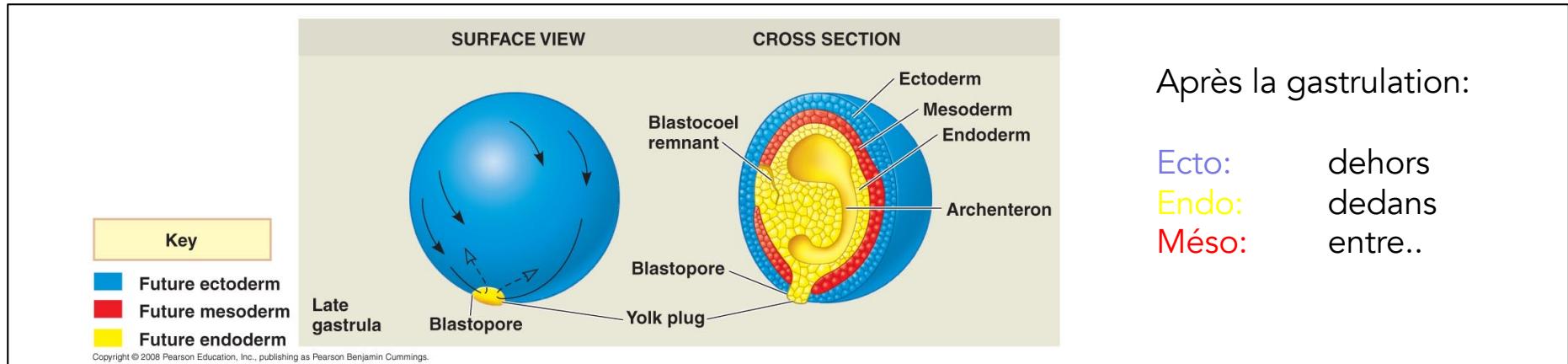
*Ces feuillets doivent être organisés dans l'espace, de façon à permettre l'organogenèse



Adapted from: 'Developmental Biology', Scott Gilbert; Figure 10.1

Les feuillets embryonnaires

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



Après la gastrulation:

Ecto: dehors
Endo: dedans
Méso: entre..

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 anusCornea and lens of eyeNervous systemSensory receptors in epidermisAdrenal medullaTooth enamelEpithelium of pineal and pituitary glands	<ul style="list-style-type: none">NotochordSkeletal systemMuscular systemMuscular layer of stomach and intestineExcretory systemCirculatory and lymphatic systemsReproductive system (except germ cells)Dermis of skinLining of body cavityAdrenal cortex	<ul style="list-style-type: none">Epithelial lining of digestive tractEpithelial lining of respiratory systemLining of urethra, urinary bladder, and reproductive systemLiverPancreasThymusThyroid and parathyroid glands

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

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

Gastrulation d'un 'disque embryonnaire'

Developmental biology

A peek into the black box of human embryology

Alexander Goedel & Fredrik Lanner

The molecular mechanisms involved in human gastrulation, a crucial stage in early embryonic development, have been largely elusive. Gene-expression data from a gastrulating human embryo shed light on this process. See p.285

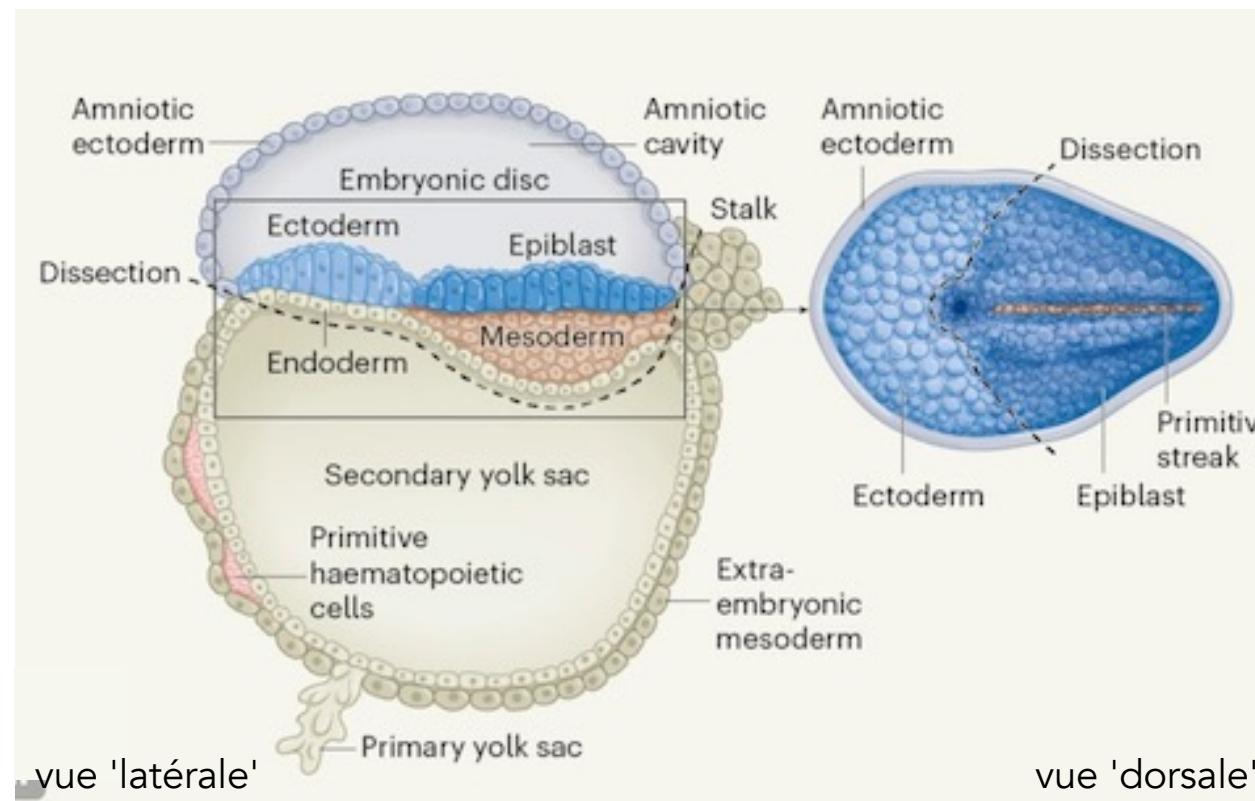
Nature | Vol 600 | 9 December 2021 | 223

*Contrairement à la souris, l'embryon humain se développe sous forme de disque (ressemblant un peu au cas des oiseaux...) séparant deux cavités, avec des cellules de l'épiblaste 'passant' dans la couche inférieure, formant ainsi le mésoderme.

*Les trois feuillets germinatifs dériveront de l'épiblaste

*Deux cavités à ce stade; la future cavité amniotique (ectoderme) et le sac vitellin (mésoderme extra-embryonnaire)

app 16-19 jours
(Carnegie stage 7)



Gastrulation d'un 'disque embryonnaire'

Developmental biology

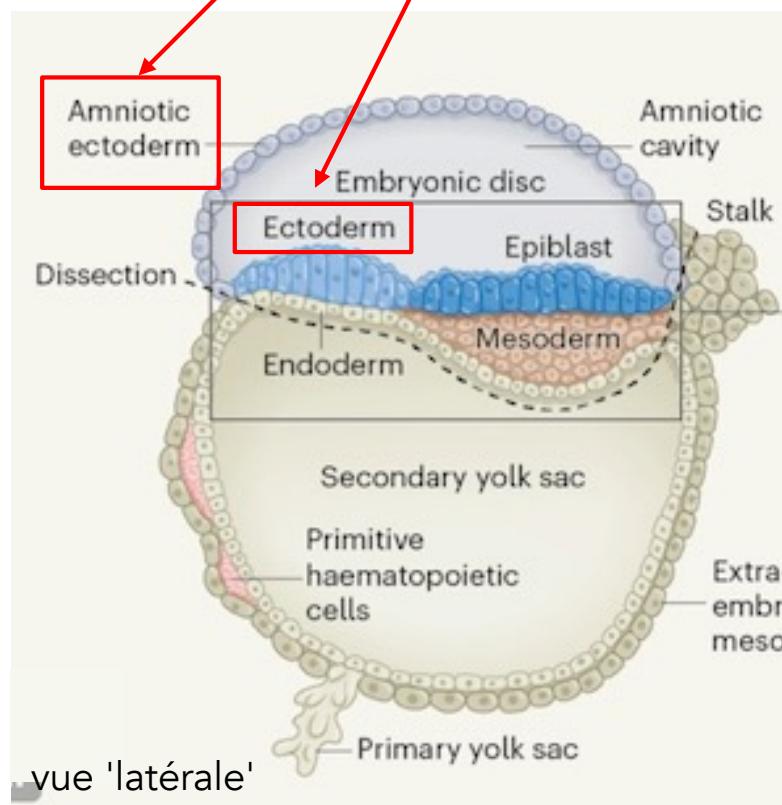
A peek into the black box of human embryology

Alexander Goedel & Fredrik Lanner

The molecular mechanisms involved in human gastrulation, a crucial stage in early embryonic development, have been largely elusive. Gene-expression data from a gastrulating human embryo shed light on this process. See p.285

Nature | Vol 600 | 9 December 2021 | 223

app 16-19 jours
(Carnegie stage 7)



Analysis of the data set revealed several intriguing findings. First, cells of the amniotic ectoderm and the embryonic ectoderm display highly similar gene-expression profiles. The anatomical organization of the disc-shaped human embryo reflects this similarity, with the ectoderm directly bordering the overlying amniotic sac. This is different from the case in mouse embryos, in which these tissues are spatially separated. Further studies are needed to explore this close relationship between the human amniotic ectoderm and embryonic ectoderm in more detail.

Article

Single-cell transcriptomic characterization of a gastrulating human embryo

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04158-y> Received: 28 July 2020 Richard C. V. Tyser^{1,6}, Elmira Mammadova^{2,3,4,6}, Shota Nakano⁶, Ludovic Vallier⁵, Antonio Scialdone^{2,3,4,7,8} & Shankar Srinivas^{1,7,8}

Nature | Vol 600 | 9 December 2021 | 285



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Comment étudier l'embryon et le fœtus humain?



Denis Duboule/2024

La Fabrique des Embryons

*Pour observer et étudier ces stades de développement de l'embryon et du fœtus humain, deux possibilités (combinées?) peuvent être envisagées, avec à terme le projet de les combiner:

1) Améliorer les conditions de culture des embryons (surnuméraires) de façon à pouvoir les suivre pendant ces stades difficiles d'accès.

Problèmes: A. Cela requiert des développements technologiques importants pour 'remplacer' les conditions physiologiques de nidation offertes par l'environnement utérin. B. Cela requiert également l'utilisation d'embryons humains surnuméraires (ou produits dans ce but), avec les limites légales et les questions éthiques associées.

et/ou

2) Produire des structures biologiques (pseudo-embryons, embryoïdes) aussi proches que possible de ces embryons et fœtus sans passer par une fertilisation entre gamètes, en utilisant des cellules souches embryonnaires.

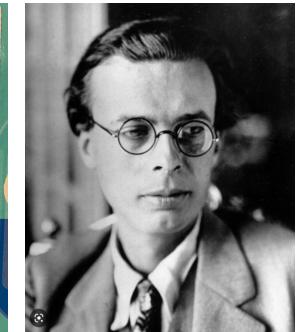
Problème: Comment construire de telles structures et quels statuts leur donner?

Cultures *in vitro* à long terme d'embryons mammifères

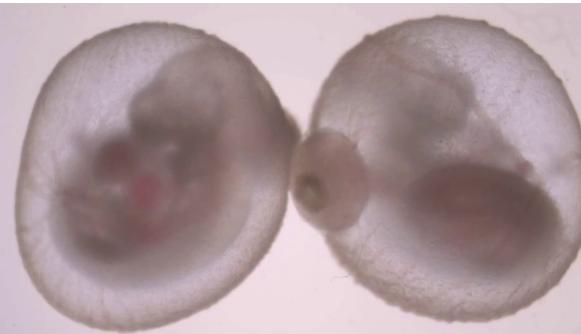


Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

'Il leur montra le mécanisme simple au moyen duquel, pendant les deux derniers mètres de chaque parcours de nuit, on secoue simultanément tous les embryons pour les familiariser avec le mouvement' (1932, *Le meilleur des mondes*).



Aldous Huxley
(1894-1963)



Photos Laboratoire Jacob Hanna, @The Weizmann Institute, Rehovot

Cultures *in vitro* à long terme d'embryons mammifères

Article

Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03416-3>

Received: 30 June 2020

Accepted: 4 March 2021

Published online: 17 March 2021

 Check for updates

Alejandro Aguilera-Castrejon^{1,10,11}✉, Bernardo Oldak^{1,10}, Tom Shani¹, Nadir Ghanem², Chen Itzkovich³, Sharon Slomovich⁴, Shadi Tarazi¹, Jonathan Bayer¹, Valeriya Chugaeva¹, Muneef Ayyash¹, Shahd Ashouokhi¹, Daoud Sheban¹, Nir Livnat¹, Lior Lasman¹, Sergey Viukov¹, Mirie Zerbib¹, Yoseph Addadi⁵, Yoach Rais⁶, Saifeng Cheng⁶, Yonatan Stelzer⁶, Hadas Keren-Shaul⁷, Raanan Shlomo⁸, Rada Massarwa^{1,11,12}, Noa Novershtern¹¹, Itay Maza^{4,9,11}✉ & Jacob H. Hanna^{1,11}✉

Nature | Vol 593 | 6 May 2021 | 119



Photos Laboratoire Jacob Hanna, @The Weizmann Institute, Rehovot

La culture d'embryons et de fœtus mammifères



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024

La Fabrique des Embryons

Article

Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03416-3>

Received: 30 June 2020

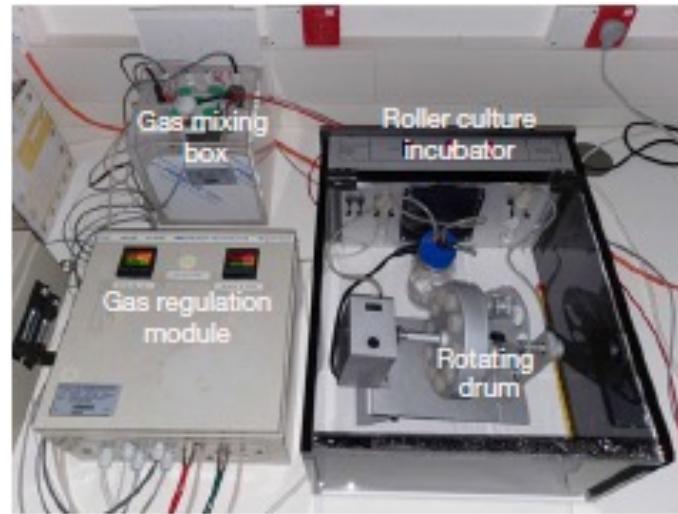
Accepted: 4 March 2021

Published online: 17 March 2021

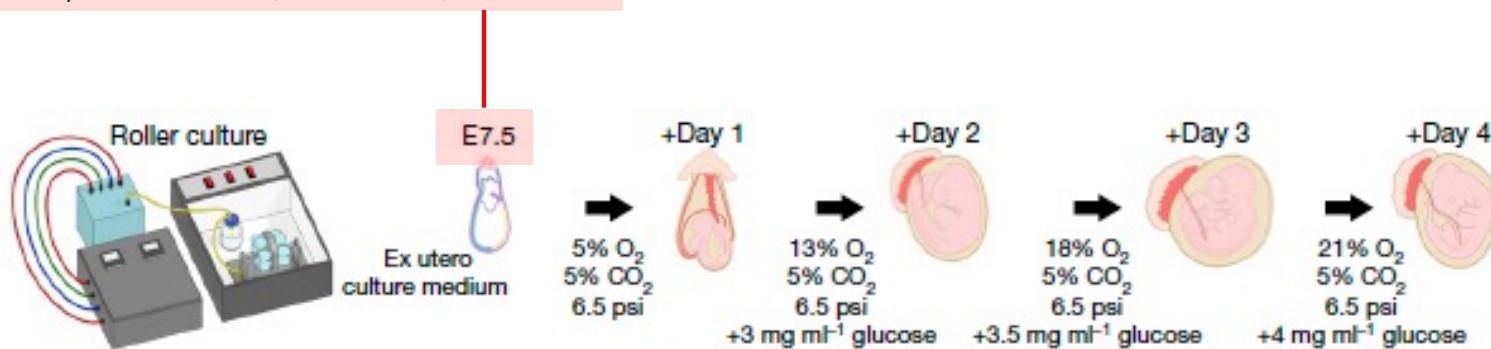
Check for updates

Alejandro Aguilera-Castrejon^{1,10,11}✉, Bernardo Oldak^{1,10}, Tom Shani¹, Nadir Ghanem², Chen Itzkovich³, Sharon Slomovich⁴, Shadi Tarazi¹, Jonathan Bayer¹, Valeriya Chugaeva¹, Muneef Ayyash¹, Shahd Ashouokhi¹, Daoud Sheban¹, Nir Livnat¹, Lior Lasman¹, Sergey Viukov¹, Mirle Zerbib¹, Yoseph Addadi⁵, Yoach Rais⁶, Saifeng Cheng⁶, Yonatan Stelzer⁶, Hadas Keren-Shaul⁷, Raanan Shlomo⁸, Rada Massarwa^{1,12}, Noa Novershtern^{1,11}, Itay Maza^{4,8,11}✉ & Jacob H. Hanna^{1,11}✉

Nature | Vol 593 | 6 May 2021 | 119



Protocole pour un embryon de 7.5 jours (E7.5)



*Conditions établies de façon semi-empirique pour une série de paramètres critiques: mélange gazeux, pression, température etc.. avec un milieu contenant du sérum de rat (50%) et du sérum ombilical humain (25%), supplémenté par du glucose journalier et un système de culture rotatif.

*Pour commencer avec des embryons pré-gastrulation (E 5.5-E6.5), un double système statique (d'abord) puis rotatif est nécessaire...

La culture d'embryons et de fœtus mammifères



Denis Duboule/2024

La Fabrique des Embryons

Article

Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis



<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03416-3>

Received: 30 June 2020

Accepted: 4 March 2021

Published online: 17 March 2021

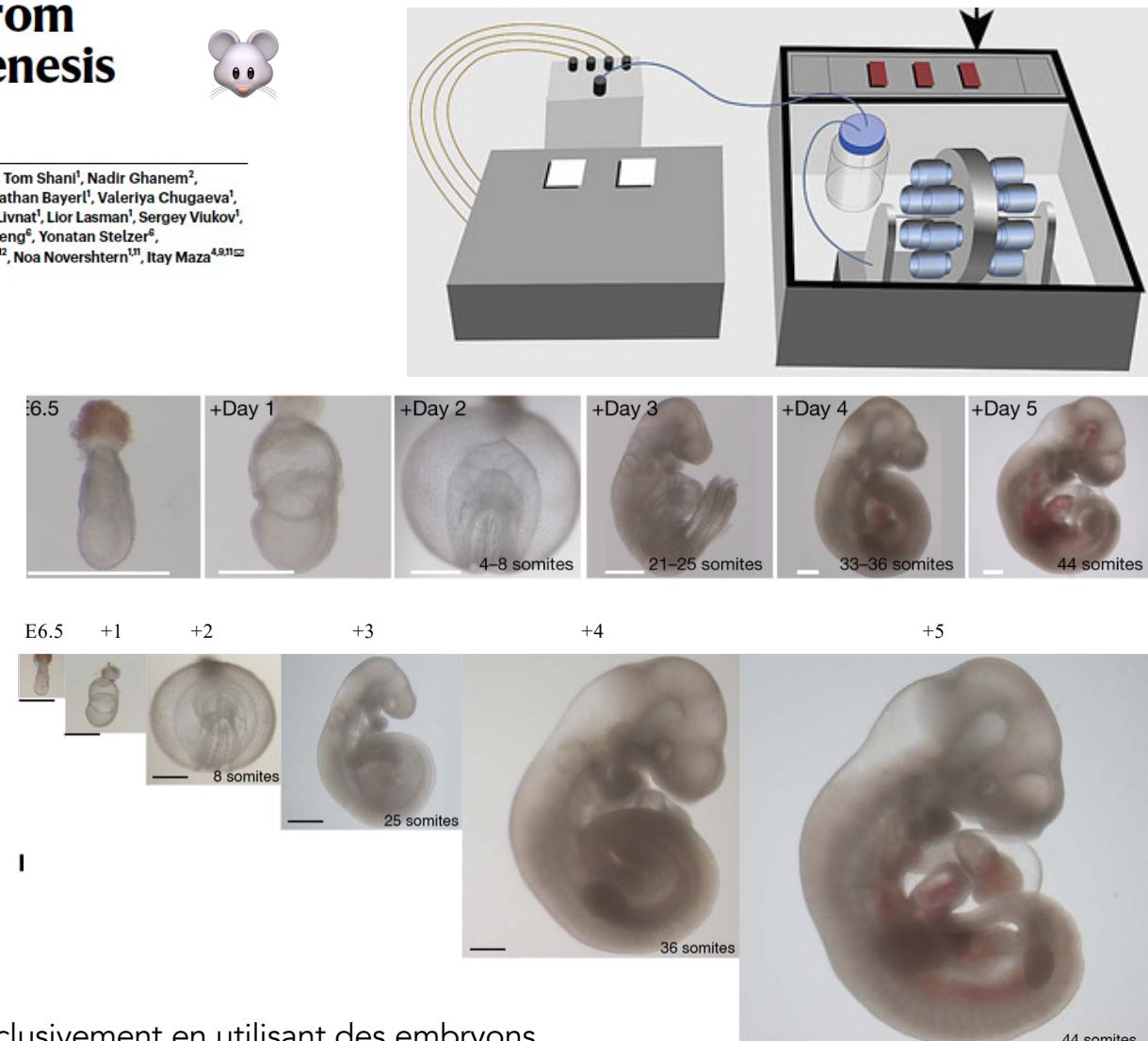
Check for updates

Alejandro Aguilera-Castrejon^{1,10,11}*, Bernardo Oldak^{1,10}, Tom Shani¹, Nadir Ghanem², Chen Itzkovich³, Sharon Slomovitch⁴, Shadi Tarazi¹, Jonathon Bayer¹, Valeriya Chugaeva¹, Muneef Ayyash¹, Shahd Ashouokhi¹, Daoud Sheban¹, Nir Livnat¹, Lior Lasman¹, Sergey Viukov¹, Mirle Zerbib¹, Yoseph Addadi⁵, Yoach Rais⁶, Saifeng Cheng⁶, Yonatan Stelzer⁶, Hadas Keren-Shaul⁷, Raanan Shlomo⁸, Rada Massarwa^{1,12}, Noa Novershtern^{1,11}, Itay Maza^{4,8,11} & Jacob H. Hanna^{1,11}

Nature | Vol 593 | 6 May 2021 | 119

The mammalian body plan is established shortly after the embryo implants into the maternal uterus, and our understanding of post-implantation developmental processes remains limited. Although pre- and peri-implantation mouse embryos are routinely cultured *in vitro*^{1,2}, approaches for the robust culture of post-implantation embryos from egg cylinder stages until advanced organogenesis remain to be established. Here we present highly effective platforms for the ex utero culture of post-implantation mouse embryos, which enable the appropriate development of embryos from before gastrulation (embryonic day (E) 6.5) until the hindlimb formation stage (E11). Late gastrulating embryos (E7.5) are grown in three-dimensional rotating bottles, whereas extended culture from pre-gastrulation stages (E5.5 or E6.5) requires a combination of static and rotating bottle culture platforms.

Histological, molecular and single-cell RNA sequencing analyses confirm that the ex utero cultured embryos recapitulate *In utero* development precisely. This culture system is amenable to the introduction of a variety of embryonic perturbations and micro-manipulations, the results of which can be followed *ex utero* for up to six days. The establishment of a system for robustly growing normal mouse embryos *ex utero* from pre-gastrulation to advanced organogenesis represents a valuable tool for investigating embryogenesis, as it eliminates the uterine barrier and allows researchers to mechanistically interrogate post-implantation morphogenesis and artificial embryogenesis in mammals.



Le développement de ces protocoles se fait exclusivement en utilisant des embryons de souris (!) mais rien ne devrait en principe empêcher de telles cultures en utilisant des embryons humains de stades comparables, si la loi devait un jour l'autoriser (i.e., pas de barrière biologique anticipée).

Production de pseudo-embryons par l'utilisation de cellules souches embryonnaires (ESCs et iPSCs)

Cellules de carcinomes embryonnaires (ECC)

Bref historique



Leroy C. Stevens

(1920-2015)

Laboratoire Jackson (Maine, USA)

Dans les années 1950s, Roy Stevens observe une souris mâle de la souche consanguine 129 avec une tumeur dans le scrotum. Il sélectionnera cette lignée (129Sv-Ter-) qui est sensible au développement de tératomes (10% de la souche..). Dérivation de cellules ECC, proches de cellules souches embryonnaires...

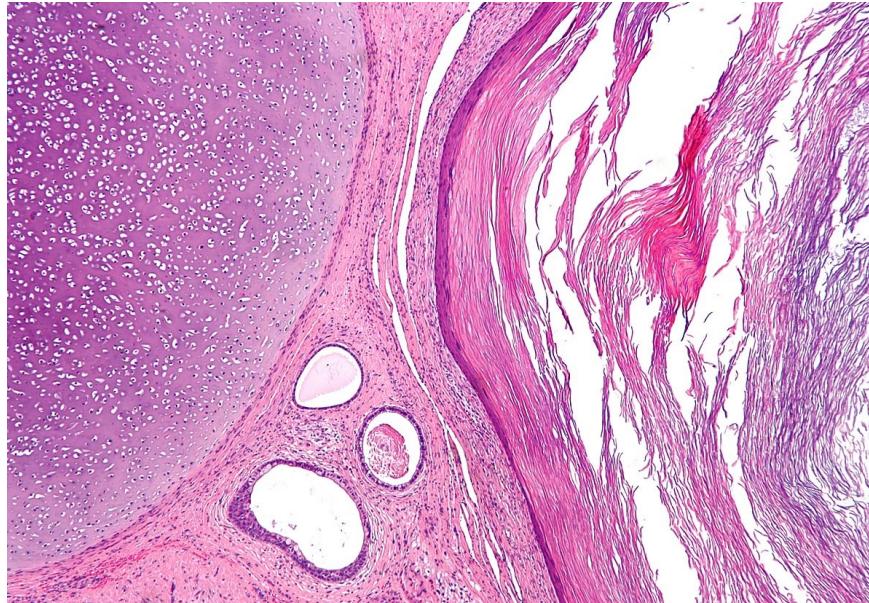
129X1/SvJ (129/SvJ)	129X1	A^w/A^w $Oca2^p$ $Tyr^{c-ch}/Oca2^p$ Tyr^c or A^w/A^w $Oca2^p$ $Tyr^c/Oca2^p$ Tyr^c or A^w/A^w $Oca2^p$ $Tyr^{c-ch}/Oca2^p$ Tyr^{c-ch}	white-bellied, pink-eyed, light chinchilla (off-white) or albino or white-bellied, pink-eyed, light chinchilla (light tan)
129S1/Sv-Oca2 ⁺ Tyr^+ Kit^{Sl-J} (129/Sv-p ⁺ Tyr^+ $Kit^{Sl-J}+/+$) (129/Sv-+P ⁺ $Tyr^{c-Mgf}^{Sl-J}+/+$)	129S1	A^w/A^w Kit^{Sl-J}/Kit^{l^+}	white (or light)-bellied agouti, coat color dilution, variable white spotting
129S1/SvImJ (129S3/SvImJ) (129/SvImJ) (129/Sv-p ⁺ Tyr^+ $Kit^{l^+}/+$) (129Sv-+P ⁺ $Tyr^{c-Mgf}^{Sl-J}/+$)	129S1	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S2/SvPas (129/SvPas)	129S2	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S4/SvJae (129/SvJae)	129S4	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S5/SvEvBrd (129/SvEvBrd)	129S5	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S9/SvEvH (129/SvEv)		A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S6/SvEvTac (129/SvEvTac)	129S6	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S7/SvEvBrd- $Hprt^{1b-m2}$ (129/SvEvBrd- $Hprt^{b-m2}$)	129S7	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129S8/SvEv- $Gat1^c$ $Hprt^{1b-m2}/J$ (129/SvEv- $Gat1^c$ $Hprt^{1b-m2}/J$)	129S8	A^w/A^w	white (or light)-bellied agouti
129T1/Sv-Oca2 ⁺ Tyr^{c-ch} $Dnd1^{l^+}/+$ (129/Sv-p ⁺ Tyr^{c-ch} $Ter^{+}/@Na$) (129/Sv-+P ⁺ Tyr^{c-ch} $Ter^{+}/@Na$)	129T1	A^w/A^w Tyr^{c-ch}/Tyr^{c-ch}	white (or light)-bellied chinchilla
129T2/SvEms (129/SvEms-Ter ⁺ ?)	129T2	A^w/A^w Tyr^{c-ch}/Tyr^{c-ch}	white (or light)-bellied chinchilla
129T2/SvEmsJ (129/SvEms-Ter ^{+/J})	129T2	A^w/A^w Tyr^{c-ch}/Tyr^{c-ch}	white (or light)-bellied chinchilla

Cellules souches embryonnaires (ECC)

Tératomes, tératocarcinomes.. (tumeurs 'dysembryoplasiques')



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons



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

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

*En parallèle, développement de l'embryologie des mammifères *in vitro*

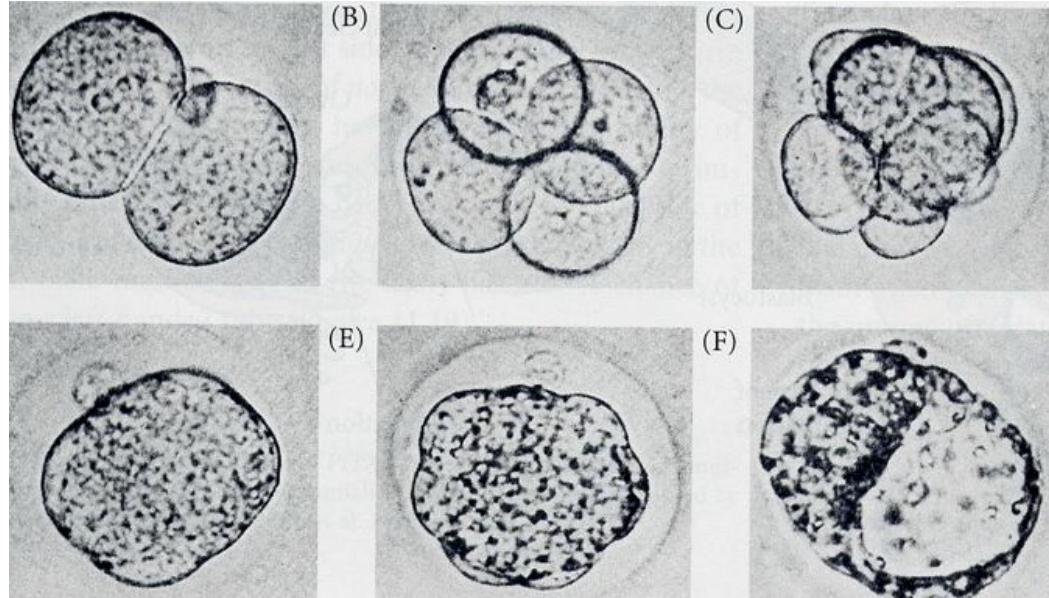
*Techniques de culture... (première IVF Louise Brown en Angleterre 1978).

Cellules souches embryonnaires (ESC)

Emergence des cellules souches embryonnaires (début 1980's)

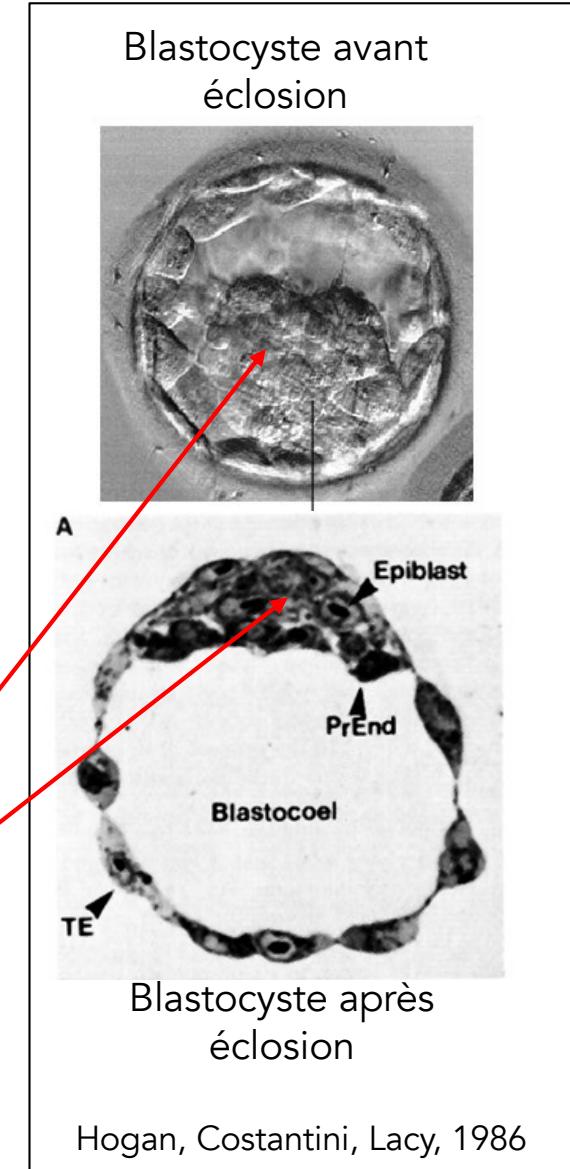
Souris: (1981) Evans, Kaufman and Martin

Humains: (1998)



'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

Cellules de l'épiblaste

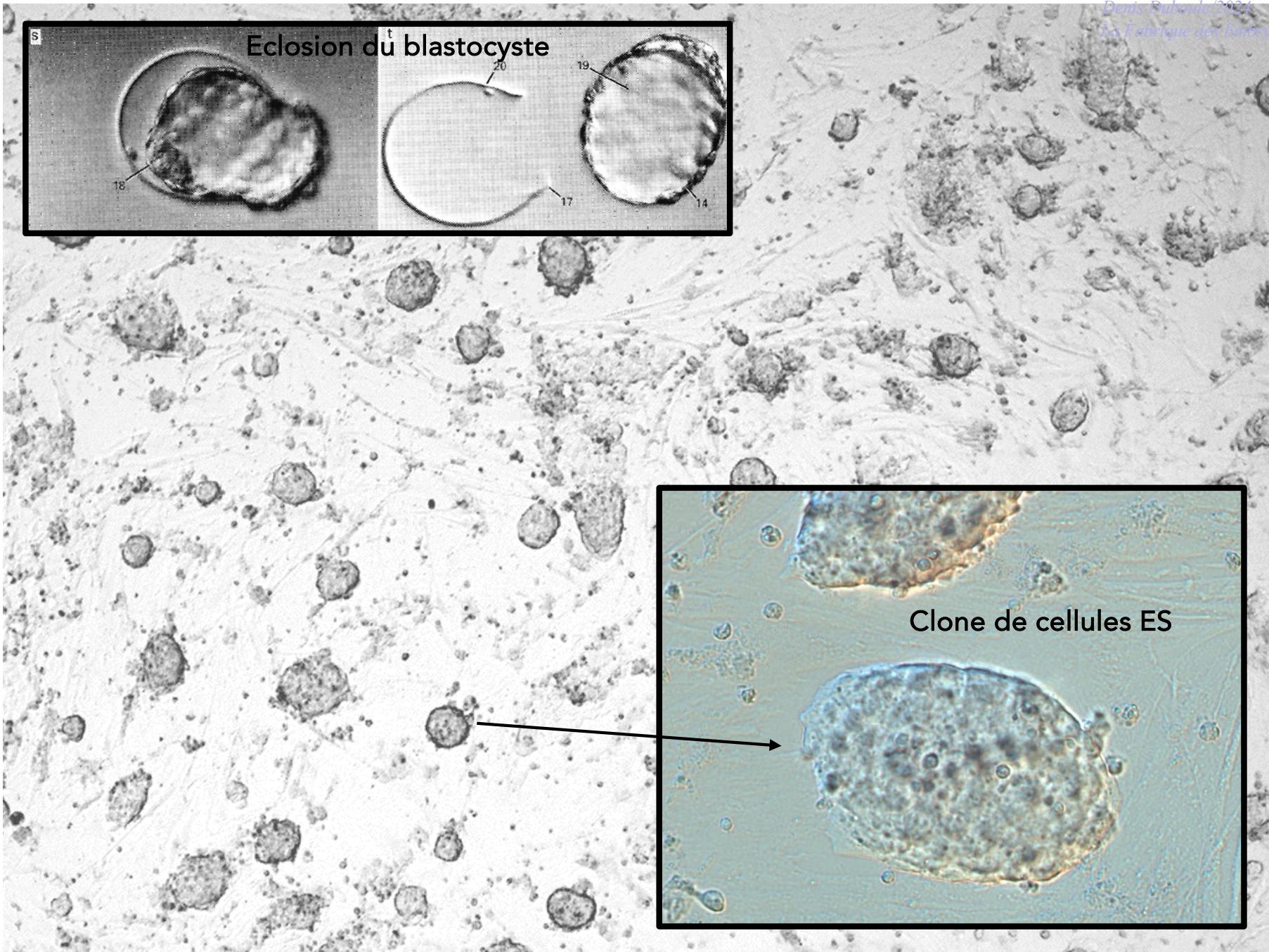


Cellules souches embryonnaires (ESC)



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons



Cellules souches embryonnaires (ESC)



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

- *Les cellules souches embryonnaires sont multipotentes (mais pas 'totipotentes')
- *Elles peuvent refaire un embryon entier (mais pas de membranes extra-embryonnaire)
- *Deux états caractérisés par des paramètres divers:

Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 2009;4:487–492.

*Cellules ES **naïves**, similaires à des cellules de l'ICM (app 4.5 jours, avant implantation). Ces cellules sont cultivées en présence d'une cytokine (LIF) avec ou sans 2i, deux inhibiteurs de kinases (MEK et GSK3). Ces cellules poussent en 3D en formant de petits dômes..

***MEK**: Kinase (addition de phosphates) impliquée dans la croissance cellulaire (Fgfs..)

https://fr.wikipedia.org/wiki/Voie_de_signalisation_MAPK/ERK

***GSK3**: Kinase impliquée dans de nombreuses voies métaboliques cellulaires.

<https://en.wikipedia.org/wiki/GSK-3>

Milieu 2i: Il s'agit d'inhiber les signaux poussant les cellules à se différencier etc

Cellules souches embryonnaires (ESC)



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024

La Fabrique des Embryons

- *Les cellules souches embryonnaires sont multipotentes (mais pas 'totipotentes')
- *Elles peuvent refaire un embryon entier (mais pas de membranes extra-embryonnaire)
- *Deux états caractérisés par des paramètres divers:

Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 2009;4:487–492.

*Cellules ES **naïves**, similaires à des cellules de l'ICM (app 4.5 jours, avant implantation). Ces cellules sont cultivées en présence d'une cytokine (LIF) avec ou en condition '2i', deux inhibiteurs de kinases (MEK et GSK3). Ces cellules poussent en 3D en formant de petits dômes..

*Cellules ES **amorcées**, dérivées des cellules de l'épiblaste (app 5.5 jours, i.e., juste après l'implantation) requiert de la signalisation FGF et de l'Activin –TGFbeta-like–. Elles poussent généralement en monolayers et ressemblent aux cellules souches embryonnaires humaines qui font plutôt des clusters en 2 dimensions

Leurs profils épigénétiques et les facteurs de transcriptions présents sont similaires, bien que des différences existent.

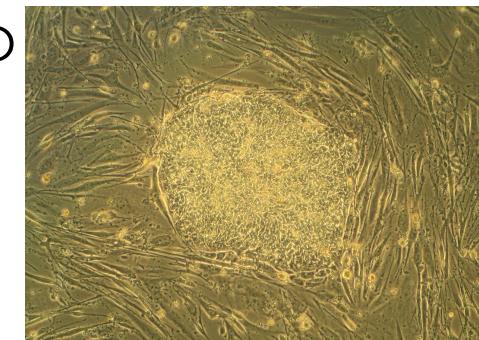
ESCs de souris et d'humain



3D



2D

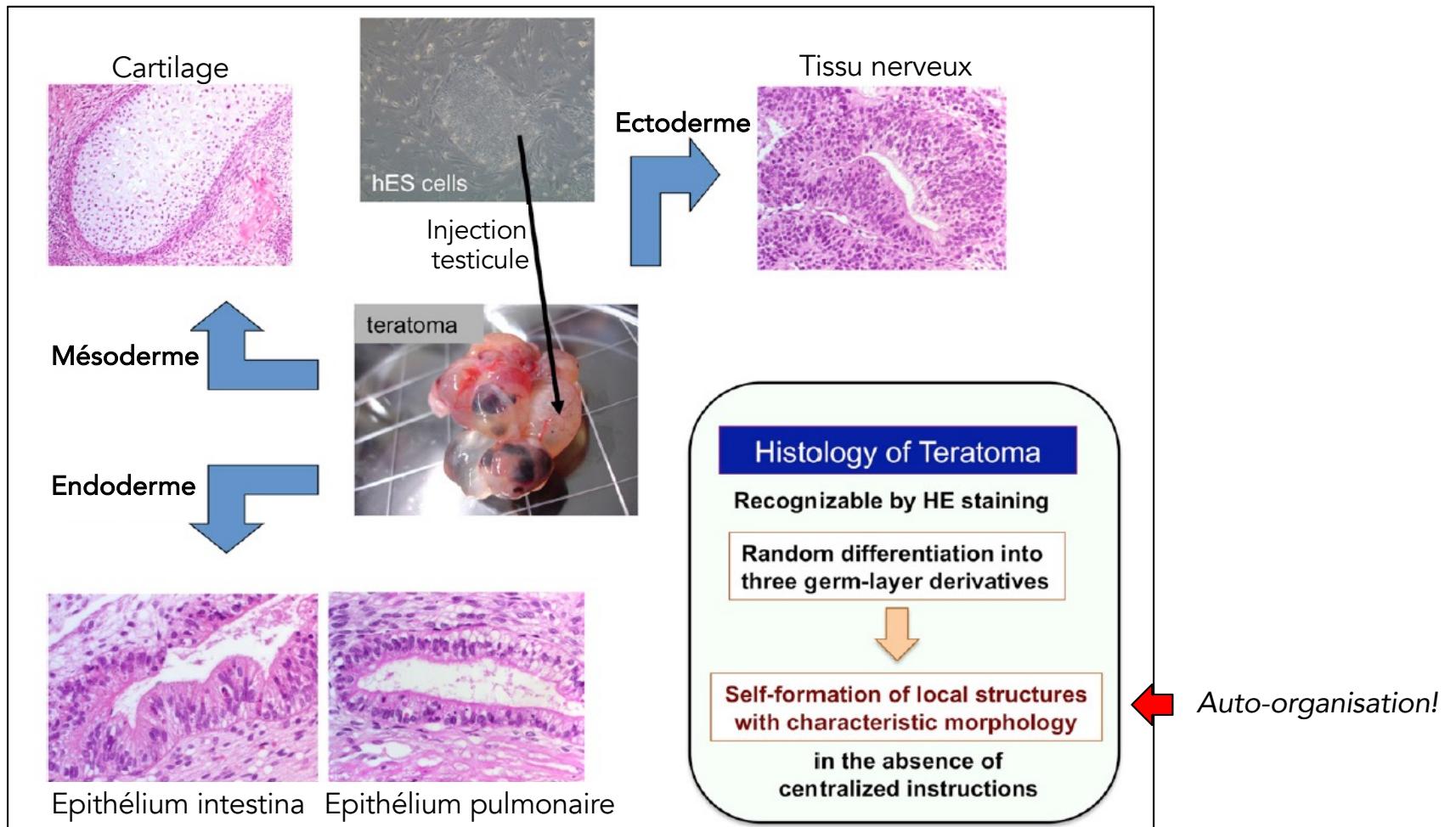


https://en.wikipedia.org/wiki/Embryonic_stem_cell#

Cellules souches embryonnaires (ESC)

Potentialités

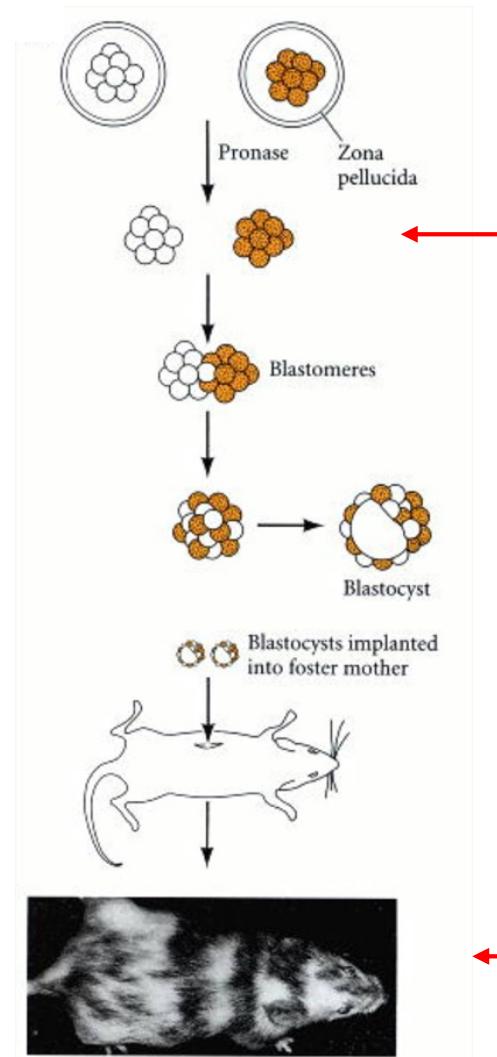
*Une façon de vérifier la potentialité des cellules ES est la production de tératomes par injection de cellules ES cultivées *in vitro*, dans les testicules. Ces tératomes montrent à la fois la présence de types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires, mais également un niveau d'auto-organisation de structures et de tissus remarquable.



Cellules souches embryonnaires (ESC)

Potentialités

*L'autre façon est par injection de ESC dans des blastocystes pour produire des souris chimériques dans lesquelles ces cellules participent à de nombreux tissus et organes (ou par agrégation avec des morula)



*Animaux 'chimériques' par agrégation de morula de deux génotypes différents.

*Il est également possible de mélanger une morula avec des cellules ES (ou de les injecter dans des blastocystes).

*Si il y a colonisation de la lignée germinale, alors des gamètes seront produits à partir des descendantes des cellules ES etc

*Animal 'mosaïque', 'chimérique', 'alophénique'..

Cellules souches pluripotentes induites (iPSC)



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

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

Cellules de souris (fibroblastes): 2006

Cellules humaines: 2007

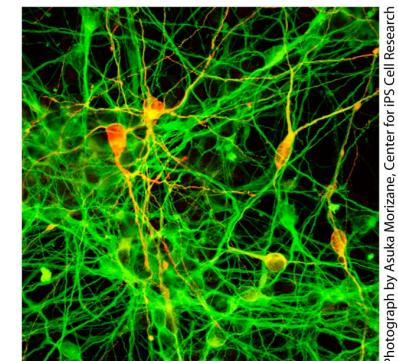
Les cellules sont reprogrammées par l'introduction de quatre gènes connus pour leur fonctions associées à l'état de 'cellule souche': *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* (*le 'cocktail de Yamanaka'*). L'expression de ces gènes permet de reprogrammer de très nombreux types cellulaires, même si les profils épigénétiques obtenus ne sont pas exactement identiques à ceux des cellules ES.

L'utilité principale des iPSCs est de produire des cellules souches à partir d'adultes consentant et donc de disposer de nouvelles approches thérapeutiques en les différenciant en types cellulaires variés.



Shinya Yamanaka
Prix Nobel 2012

Photos: Tokyo University



Neurones dopaminergiques
Produits à partir de iPS

Photograph by Asuka Morizane, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University.

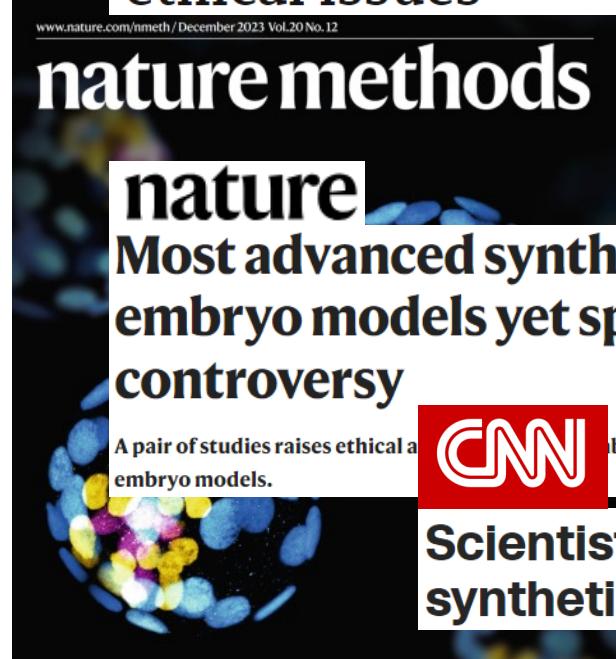
Production de pseudo-embryons par l'utilisation de cellules souches embryonnaires (ESCs) et iPSCs



Synthetic human embryos created in groundbreaking advance

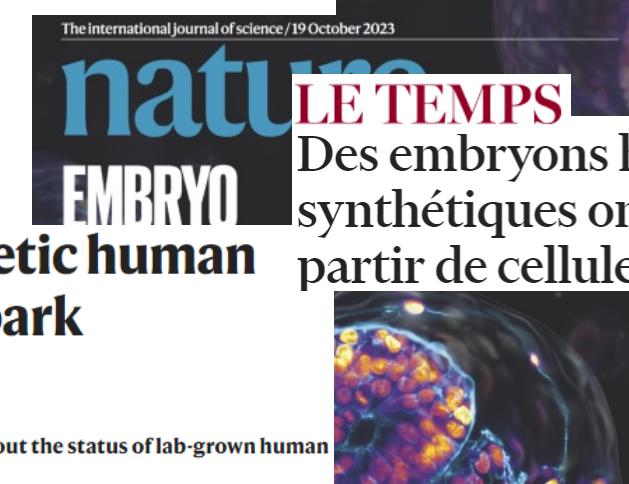
B B C

Synthetic human embryo raises ethical issues



Most advanced synthetic human embryo models yet spark controversy

A pair of studies raises ethical a
embryo models.



Des embryons humains synthétiques ont été créés à partir de cellules souches



Comment encadrer la recherche sur les modèles d'embryon



Pour la première fois, des chercheurs créent un modèle d'embryon humain sans sperme ni ovule



Ceci n'est pas un embryon de souris

CellPress

Les différents types de pseudo-embryons humains (quelques)

Developmental Biology 509 (2024) 43–50



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology



Why study human embryo development?

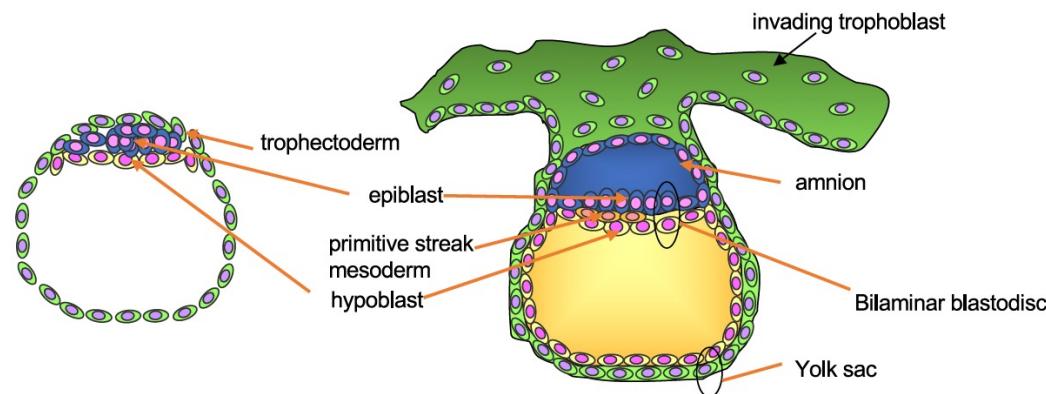
Janet Rossant



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Différents types de pseudo-embryons en fonction des étapes du développement qu'ils sont sensés représenter



Blastocyste (5-7^{ème} jour)

Embryon implanté (10-14^{ème} jour)



Blastoïdes



Gastruloïdes

pseudo-embryons intégrés

Les Blastoïdes

Des structures pseudo-embryonnaires qui ressemblent à des blastocystes, donc juste avant l'implantation

LETTER

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

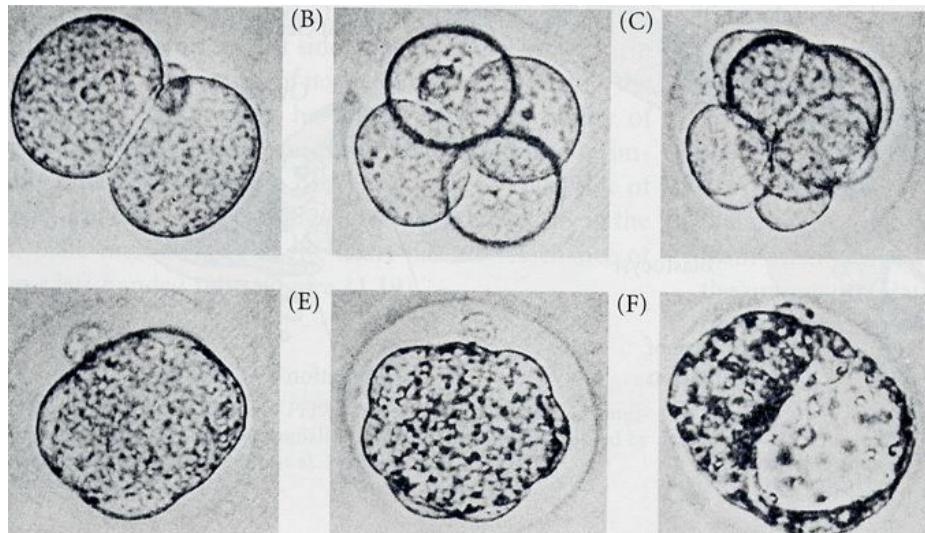
Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrij¹, Jean-Charles Boisset², Jeroen Korving², 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)



Première publication en 2018, avec des blastoïdes produits par agrégation de deux types cellulaires distincts (voir le cours du CdF 2018-2019).



*Deux types cellulaires (au moins), la ICM (épiblaste) et le trophectoderme autour.

Les Blastoïdes



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Des structures pseudo-embryonnaires qui ressemblent à des blastocystes, donc juste avant l'implantation

LETTER

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

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrij¹, Jean-Charles Boisset², Jeroen Korving², 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)



Première publication en 2018, avec des blastoïdes produits par agrégation de deux types cellulaires distincts (voir le cours du CdF 2018-2019).



Différence importante



Première publication en 2022 en n'utilisant qu'un seul type de cellules au départ, car les cellules ESC ou iPSC humaines **naïves** sont capables de former du linéage extra-embryonnaire

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

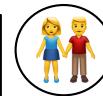
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

Published online: 2 December 2021

Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel^{1,3}, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,6}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,6}



Kagawa et al. Nature | Vol 601 | 27 January 2022 | 603

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

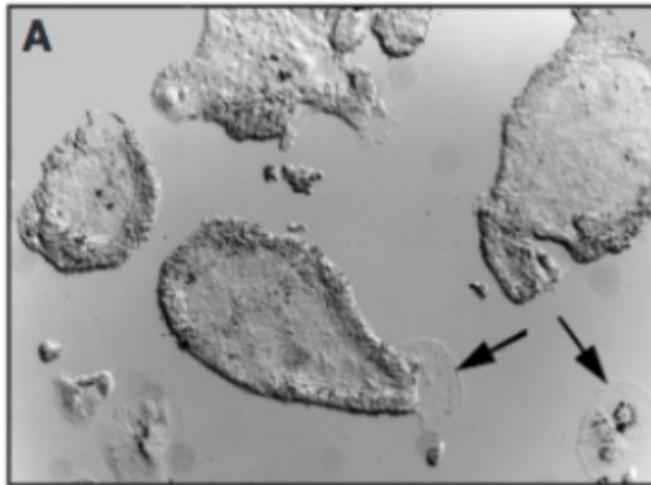
Cellules souches de trophoblaste

Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4

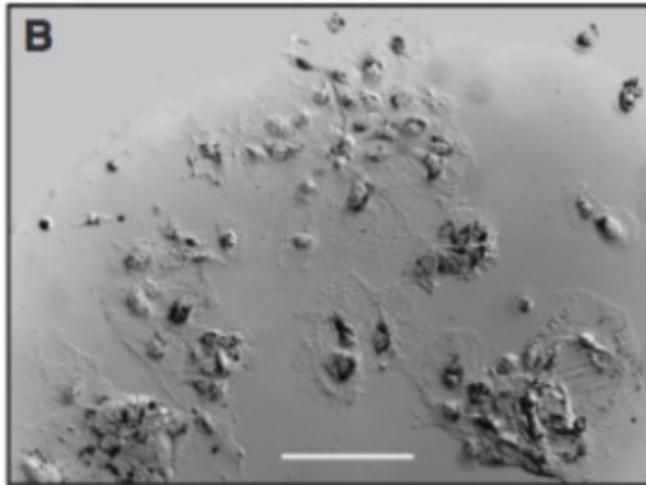
Satoshi Tanaka,* Tilo Kunath, Anna-Katerina Hadjantonakis,
Andras Nagy, Janet Rossant†

11 DECEMBER 1998 VOL 282 SCIENCE www.sciencemag.org

avec FGF4



sans FGF4



*Culture de trophectoderme 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).

Blastoïdes de souris

LETTER

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

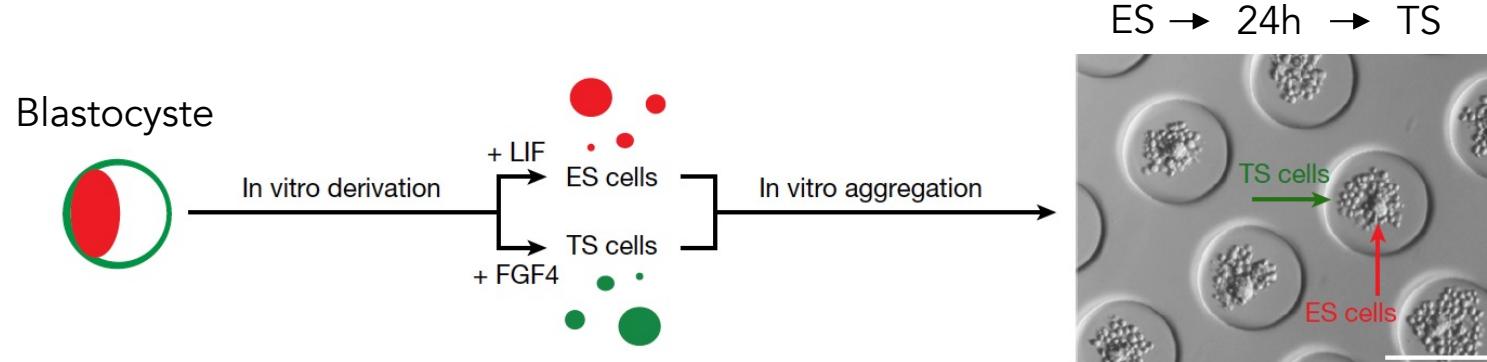


Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Blastocyst-like structures generated solely from stem cells

Rivron et al., Nature (2018)

Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrijl³, Jean-Charles Boisset², Jeroen Korving², Judith Vivie^{2,3}, Roman K. Truckenmüller¹, Alexander van Oudenaarden², Clemens A. van Blitterswijk^{1,5} & Niels Geijsen^{2,4,5}



*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*

Blastoïdes de souris

LETTER

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

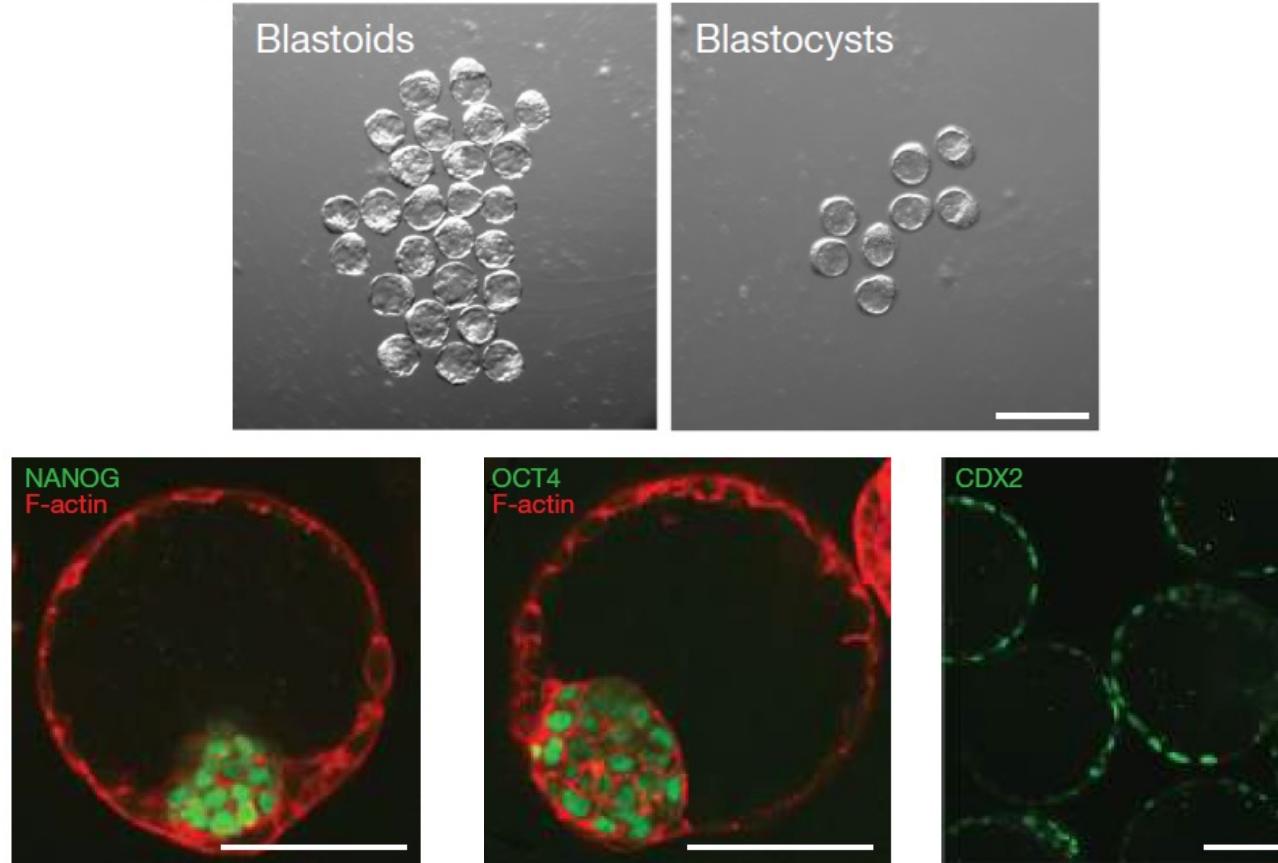
Blastocyst-like structures generated solely from stem cells Rivron et al., Nature (2018)

Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrijl¹, Jean-Charles Boisset², Jeroen K. Roman K. Truckenmüller¹, Alexander van Oudenaarden², Clemens A. van Blitterswijk^{1,3,5,8}



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

*Production de blastoïdes



*Ces blastoïdes sont similaires en aspect général aux blastocystes normaux

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

Blastoïdes de souris

LETTER

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

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

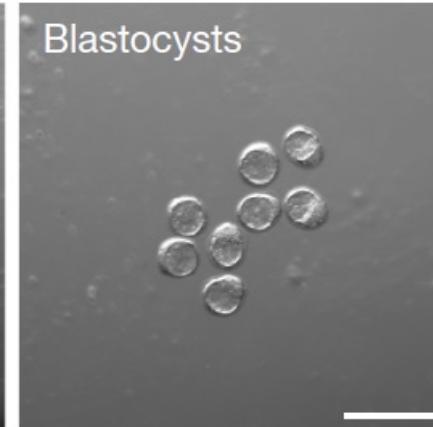
Nicolas C. Rivron^{1,2*}, Javier Frias-Aldeguer^{1,2}, Erik J. Vrijl³, Jean-Charles Boisset², Jeroen K. Roman K. Truckenmüller¹, Alexander van Oudenaarden², Clemens A. van Blitterswijk^{1,3,5} &

*Clones



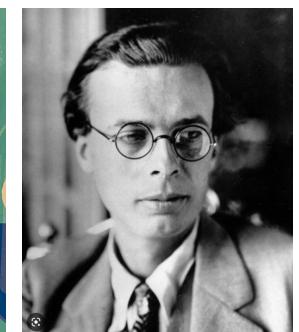
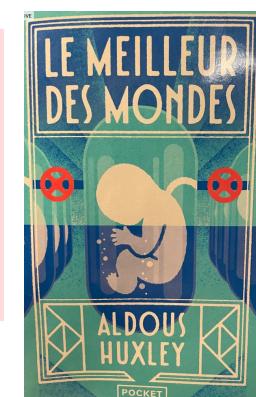
*Production de blastoïdes

Blastocysts



*Fratrie

'Un oeuf, un embryon, un adulte- c'est la normale- Mais un oeuf Bokanovskifié à la propriété de bourgeonner, de proliférer, de se diviser [...] On fait ainsi pousser quatre-vingt-seize êtres humains là où il n'en poussait autrefois qu'un seul. Le progrès.' (1932, Le meilleur des mondes; le Directeur).



Aldous Huxley
(1894-1963)



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Blastoïdes humains

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

Published online: 2 December 2021

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | 603

One week after fertilization, human embryos implant into the uterus. This event requires the embryo to form a blastocyst consisting of a sphere encircling a cavity lodging the embryo proper. Stem cells can form a blastocyst model that we called a blastoid¹. Here we show that naive human pluripotent stem cells cultured in PXGL medium² and triply inhibited for the Hippo, TGF- β and ERK pathways efficiently (with more than 70% efficiency) form blastoids generating blastocyst-stage analogues of the three founding lineages (more than 97% trophectoderm, epiblast and primitive endoderm) according to the sequence and timing of blastocyst development.

Blastoids spontaneously form the first axis, and we observe that the epiblast induces the local maturation of the polar trophectoderm, thereby endowing blastoids with the capacity to directionally attach to hormonally stimulated endometrial cells, as during implantation. Thus, we propose that such a human blastoid is a faithful, scalable and ethical model for investigating human implantation and development^{3,4}.



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Milieu PXGL: N2B27 milieu classique, avec un inhibiteur de la voie MEK, un inhibiteur de la voie Wnt, un inhibiteur de la PKC and LIF (leukemia inhibitory factor).

Avec en plus des inhibiteurs des voies Hippo, Tgf-beta et ERK....

Des cellules ESC et iPSC naïves cultivées dans un milieu PXGL complémenté (ci-dessus) peuvent générer des blastoïdes à grande fréquence (70%) avec les trois linéages attendus (épiblaste, trophectoderme et endoderme primitif).

Ces blastoïdes peuvent s'attacher de façon 'spécifique' (directionnelle) à des cellules endométriales stimulées, comme dans le cas d'une implantation dans l'utérus.

Blastoïdes humains

nature
protocols

PROTOCOL

<https://doi.org/10.1038/s41596-023-00802-1>

 Check for updates

Generating human blastoids modeling blastocyst-stage embryos and implantation

Heidar Heidari Khoei^{1,6}, Alok Javali^{1,6}, Harunobu Kagawa^{1,6}, Theresa Maria Sommer¹,
Giovanni Sestini¹, Laurent David^{1,2,3}, Jana Slováková⁴, Maria Novatchkova^{1,5},
Yvonne Scholte op Reimer¹ and Nicolas Rivron¹

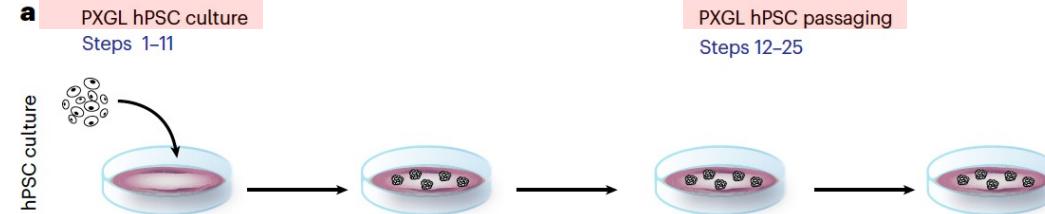
2023



Denis Duboule/2024

La Fabrique des Embryons

UN SEUL TYPE CELLULAIRE AU DÉPART
(pas de mélange comme pour les ESCs de souris)



Milieu PXGL: N2B27 milieu classique (sans sérum), avec un inhibiteur de la voie MEK, un inhibiteur de la voie Wnt, un inhibiteur de la PKC and LIF (leukemia inhibitory factor).

Wnt: voie de signalisation très importante pour le développement des embryons.

PKC: Kinases actives dans la transduction de plusieurs voies de signalisation

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

*Plusieurs passages en cellules feeders (substrat adhérant)

*Collection et dissociation des cellules en suspension

*Re-étalement sur un substrat non-adhérant (pour former des agrégats)

Blastoïdes humains

nature
protocols

PROTOCOL

<https://doi.org/10.1038/s41596-023-00802-1>

 Check for updates

Generating human blastoids modeling blastocyst-stage embryos and implantation 2023

Heidar Heidari Khoei^{1,6}, Alok Javali^{1,6}, Harunobu Kagawa^{1,6}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini^{1,6}, Laurent David^{1,2,3}, Jana Slováková⁴, Maria Novatchkova^{1,5}, Yvonne Scholte op Reimer¹ and Nicolas Rivron^{1,6}

N2B27 + Y: milieu avec un inhibiteur de la kinase ROCK. Y stimule la différenciation vers le mésendoderme...

PALLY: Milieu avec inhibiteur de la voie MEK, un inhibiteur général de la voie TGF-beta, un inhibiteur de la voie Hippo, LIF, un inhibiteur de la kinase ROCK.

LY: Milieu avec inhibiteur de la voie Hippo et un inhibiteur de la kinase ROCK.

IVF: Milieu commercial pour les IVF.

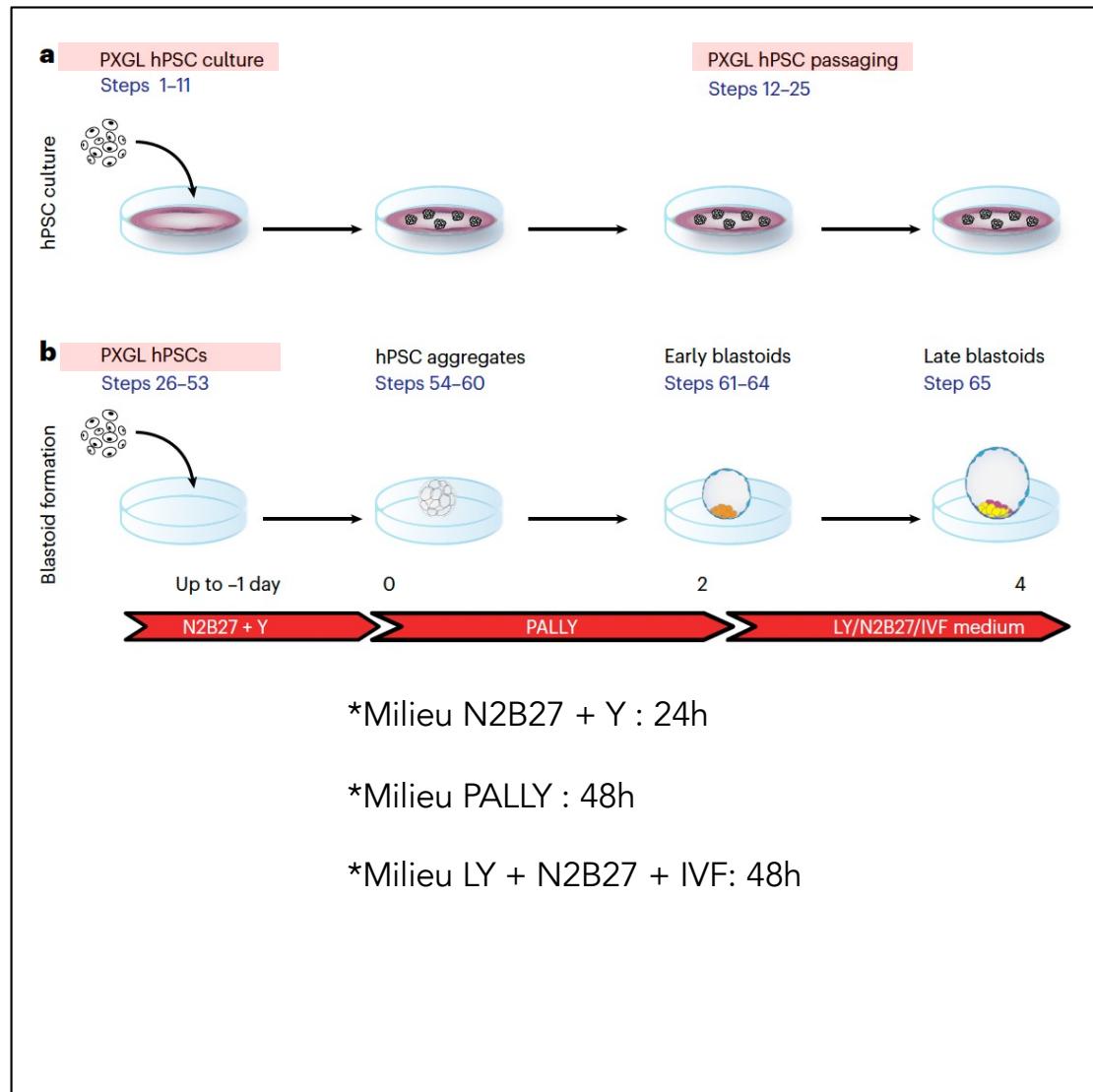
ROCK: Kinase impliquée dans les formes et mouvements cellulaires (cytosquelette).

https://en.wikipedia.org/wiki/Rho-associated_protein_kinase

TGFbeta: Voie de signalisation importante pendant le développement embryonnaire.

Hippo: Kinase impliquée dans la taille des organes...

UN SEUL TYPE CELLULAIRE AU DÉPART
(pas de mélange comme pour les ESCs de souris)



Blastoïdes humains, linéages précoce

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

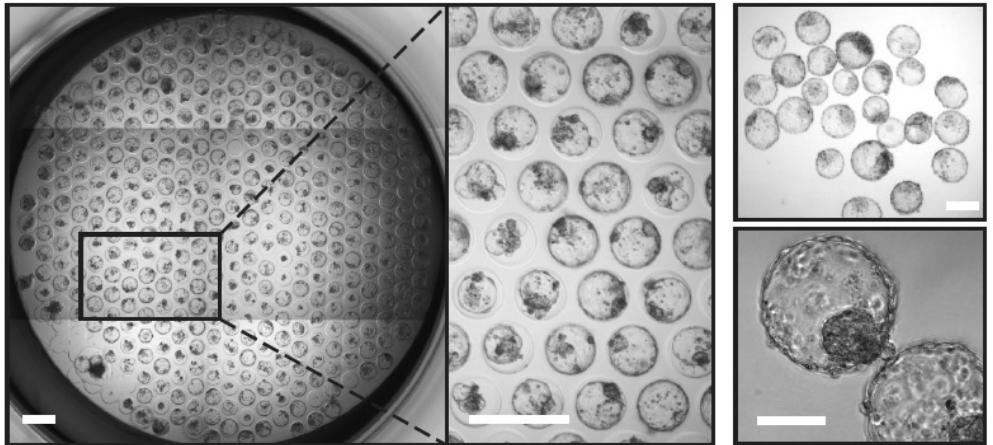
Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

Published online: 2 December 2021

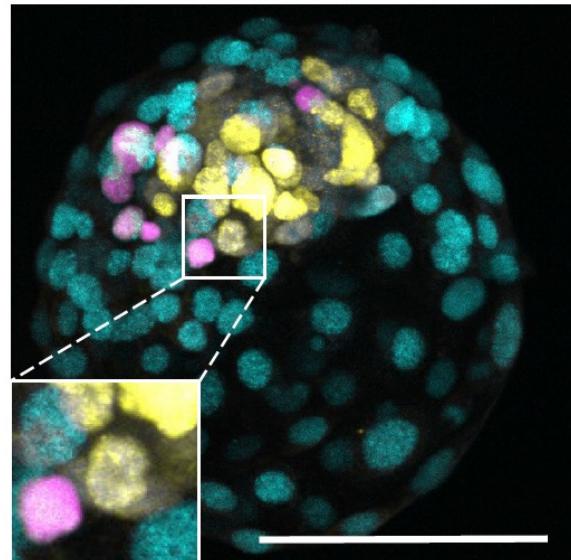
Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel³, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,5}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,2}

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | **603**

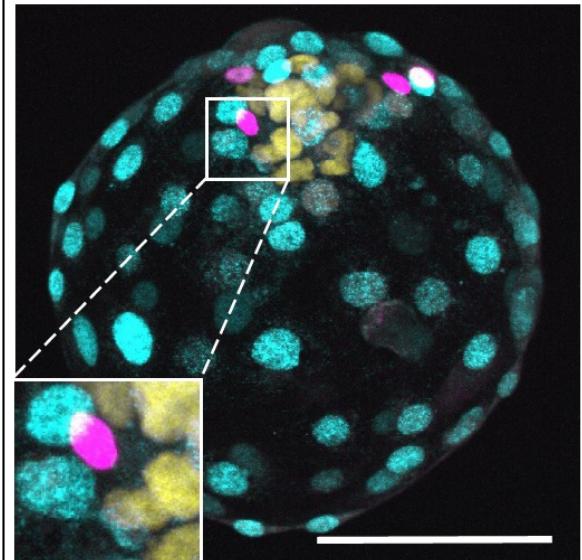


Plus de 70% d'efficacité, cuvettes avec hydrogel, non-adhérentes

Marqueur épiblaste: **NANOG**
Marqueur trophectoderme: **CDX2**
Marqueur endoderme primitif: **SOX17**



Marqueur épiblaste: **OCT4**
Marqueur trophectoderme: **GATA3**
Marqueur endoderme primitif: **GATA4**



*Blastoïdes très comparables à des blastocystes normaux en terme de linéages précoce présents.

*L'analyse des ARNs en cellules uniques (scRNA-seq) confirme la présence des trois linéages cellulaires pré-implantation.



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Blastoïdes humains, linéages précoce

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

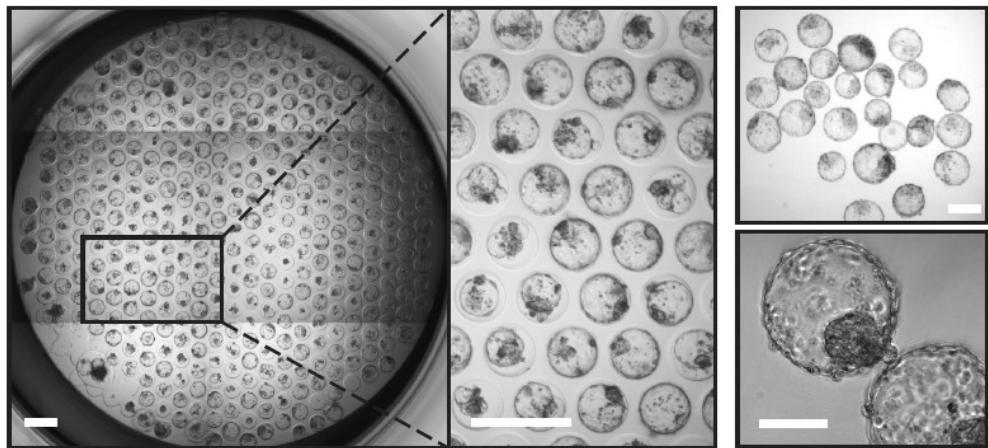
Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

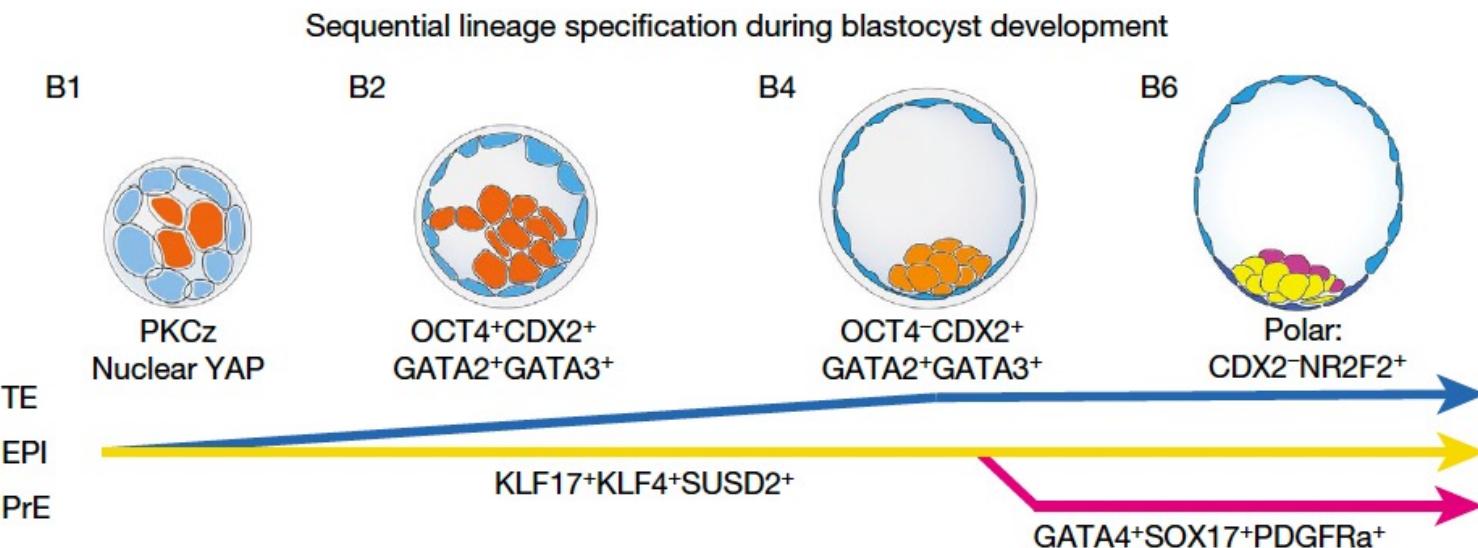
Published online: 2 December 2021

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | **603**

Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel³, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,5}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,2}



*La séquence temporelle d'apparition de ces linéages est aussi comparable.



Blastoïdes humains, modèle d'implantation sur des organoïdes d'endomètre humain



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

© 2017. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2017) 144, 1775-1786 doi:10.1242/dev.148478



HUMAN DEVELOPMENT

TECHNIQUES AND RESOURCES ARTICLE

Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability

Matteo Boretto¹, Benoit Cox¹, Manuel Noben², Nikolai Hendriks², Amelie Fassbender³, Heleen Roose¹, Frédéric Amant^{4,5,6}, Dirk Timmerman^{3,4}, Carla Tomassetti^{3,4}, Arne Vanhie^{3,4}, Christel Meuleman^{3,4}, Marc Ferrante² and Hugo Vankelecom^{1,*}

ABSTRACT

The endometrium, which is of crucial importance for reproduction, undergoes dynamic cyclic tissue remodeling. Knowledge of its molecular and cellular regulation is poor, primarily owing to a lack of study models. Here, we have established a novel and promising organoid model from both mouse and human endometrium. Dissociated endometrial tissue, embedded in Matrigel under WNT-activating conditions, swiftly formed organoid structures that showed long-term expansion capacity, and reproduced the molecular and histological phenotype of the tissue's epithelium. The supplemented WNT level determined the type of mouse endometrial organoids obtained: high WNT yielded cystic organoids displaying a more differentiated phenotype than the dense organoids obtained in low WNT. The organoids phenocopied physiological responses of endometrial epithelium to hormones, including increased cell proliferation under estrogen and maturation upon progesterone. Moreover, the human endometrial organoids replicated the menstrual cycle under hormonal treatment at both the morpho-histological and molecular levels. Together, we established an organoid culture system for endometrium, reproducing tissue epithelium physiology and allowing long-term expansion. This novel model provides a powerful tool for studying mechanisms underlying the biology as well as the pathology of this key reproductive organ.

*Tissue de l'endomètre dissocié

*Dans du matrigel (substrat)

*Traitement par Wnt (différentes doses..)

*Expansion et maintien d'un épithélium endométrial

*OFEL: 'Open Face Epithelial Layer' Formation en 2D d'une couche ouverte d'épithélium qui permet de déposer des blastocystes/blastoïdes directement dessus

KEY WORDS: Endometrium, Organoids, Hormone responsiveness, WNT, RSPO, LGR

Blastoïdes humains, modèle d'implantation

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

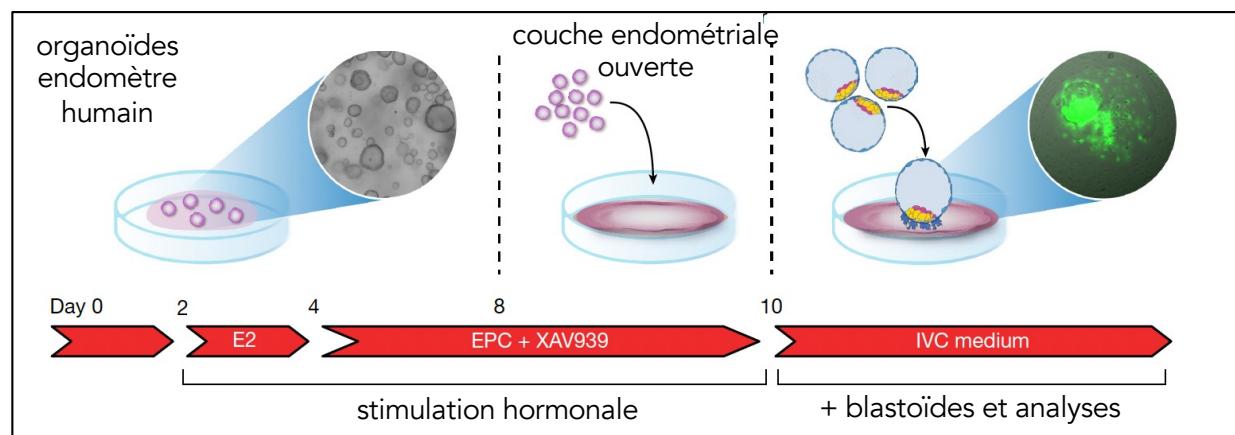
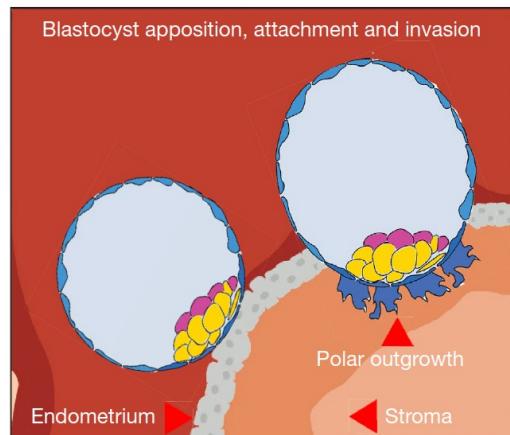
Published online: 2 December 2021

Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel³, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,5}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,2}

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | 603

Stimulation hormonale des organoïdes avant et après matrigel, précédant la dépose des blastoïdes.

Système modèle pour l'implantation *in vitro*



Implantation normale
(Jour 7) et invasion

*endomètre

*Stroma

*Croissance polaire

Implantation *in vitro*

*E2: béta-œstradiol

*EPC: E2 + progestérone + cyclic AMP

*XAV939: Inhibiteur de la voie Wnt

*IVC: Milieu de culture d'embryon ('classique')

Blastoïdes humains, modèle d'implantation

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

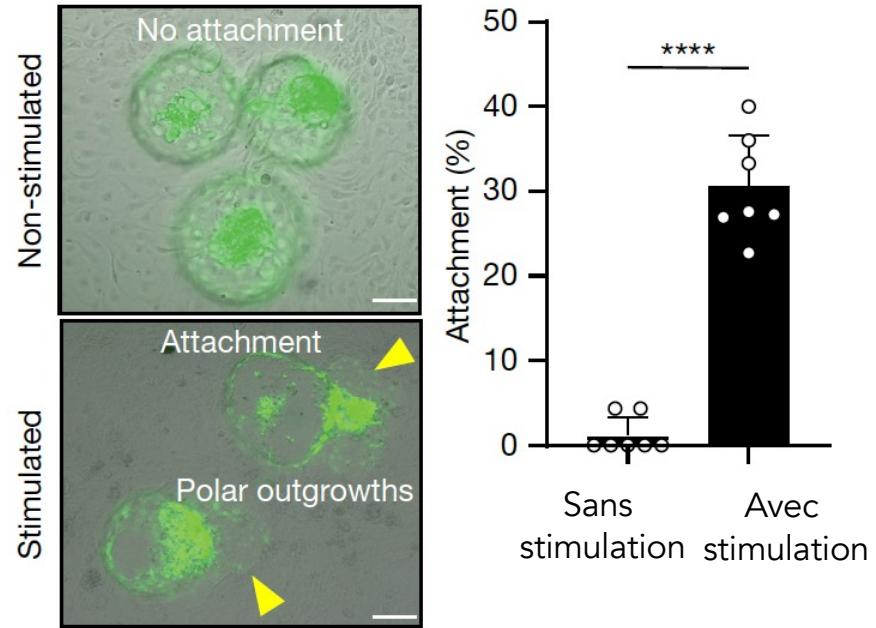
Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

Published online: 2 December 2021

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | 603

Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel³, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,5}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,2}



*Sans stimulation hormonale: Pas d'implantation

*Avec stimulation hormonale: 30% montrant des signes d'implantation

*Stimulation + levonorgestrel (contraceptif): Pas d'implantation

Test de grossesse

Sans stimulation:
blastoïdes
non-attachés

Avec stimulation:
blastoïdes
attachés



*Présence d'hormone chorionique gonadotrope dans le milieu. La HCG est normalement sécrétée par les cellules trophoblastiques de la femme enceinte dès le 6-7^{ème} jour (test de grossesse classique). La HCG n'est détectée que dans le milieu où les blastoïdes se sont attachés....

Blastoïdes humains, conclusions



Denis Duboule/2024
La Fabrique des Embryons

Article

Human blastoids model blastocyst development and implantation

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

Received: 12 February 2021

Accepted: 18 November 2021

Published online: 2 December 2021

Harunobu Kagawa^{1,7}, Alok Javali^{1,7}, Heidar Heidari Khoei^{1,7}, Theresa Maria Sommer¹, Giovanni Sestini¹, Maria Novatchkova^{1,2}, Yvonne Scholte op Reimer¹, Gaël Castel³, Alexandre Bruneau³, Nina Maenhoudt⁴, Jenna Lammers^{3,5}, Sophie Loubersac^{3,5}, Thomas Freour^{3,5}, Hugo Vankelecom⁴, Laurent David^{3,6} & Nicolas Rivron^{1,2}

Kagawa et al. *Nature* | Vol 601 | 27 January 2022 | 603

Modèle adapté à l'étude du développement et de l'implantation de l'embryon humain.

Utilisation pour des cibles thérapeutiques, amélioration des conditions de milieux FIV, études de contraceptifs...

Concepts de proportionnalité et de subsidiarité: Les blastoïdes représentent une opportunité 'éthique' pour compléter la recherche utilisant des embryons humains

Discussion

Human blastoids morphologically resemble the human blastocyst (criteria described in Methods), efficiently generate analogues of its three lineages with transcriptomes matching the human blastocyst stage, and form these analogues according to the sequence (TE and EPI, then pTE and PrE) and approximate pace (4 days) of blastocyst development. We therefore propose that this model is relevant for the study of human blastocyst development and implantation. Some initial parameters and end-point criteria that are useful to form and define these models⁵⁻⁹ are summarized in Supplementary Table 2. Mimicking the interaction between the epiblast and trophectoderm revealed that the epiblast induces the local maturation of polar trophectoderm and subsequently endows it with the capacity to attach onto stimulated endometrial cells. In future, human blastoids may be used to help identify therapeutic targets and contribute to preclinical modelling (for example, *in vitro* fertilization medium complements such as LPA and NAEPA or contraceptives such as SC144 (ref.³)). Considering the proportionality (balancing the benefits and harms) and subsidiarity (pursuing goals using the morally least problematic means) of human embryology, blastoids represent an ethical opportunity to complement research using embryos⁴.