

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



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

La Fabrique des Embryons



## Cours 2024: La Fabrique des 'Embryons'

### Déroulé du cours

- **Cours #3:** 28 mai 2024. Les gastruloïdes; définition, caractérisation et comparaisons souris/humains. Des gastruloïdes comme objets d'étude et comme tubes à essai.

*Les gastruloïdes humains; un ersatz d'embryon incomplet mais pratique*

# Gastruloides (rappel du cours 2018-2019)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

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



STEM CELLS AND REGENERATION

RESEARCH ARTICLE

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

David A. Turner<sup>1,\*</sup>, Mehmet Girgin<sup>2</sup>, Luz Alonso-Crisostomo<sup>1</sup>, Vikas Trivedi<sup>1</sup>, Peter Baillie-Johnson<sup>1,3</sup>, Cherise R. Glodowski<sup>1</sup>, Penelope C. Hayward<sup>1</sup>, Jérôme Collignon<sup>4</sup>, Carsten Gustavsen<sup>5</sup>, Palle Serup<sup>5</sup>, Benjamin Steventon<sup>1</sup>, Matthias P. Lutolf<sup>2</sup> and Alfonso Martinez Arias<sup>1,\*</sup>

\*mESc cultivées en milieu +LIF/2i

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

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

protocoleexchange | nature research

Method Article

Generating Gastruloids from Mouse Embryonic Stem Cells

Denis Duboule<sup>\*</sup> Alfonso Martinez Arias<sup>\*</sup> Mehmet Girgin David Andrew Turner Peter Baillie-Johnson Anne-Catherine Cossy Leonardo Beccari Naomi Moris Matthias Lutolf

Share the most recent version:

# Gastruloides (rappel du cours 2018-2019)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

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



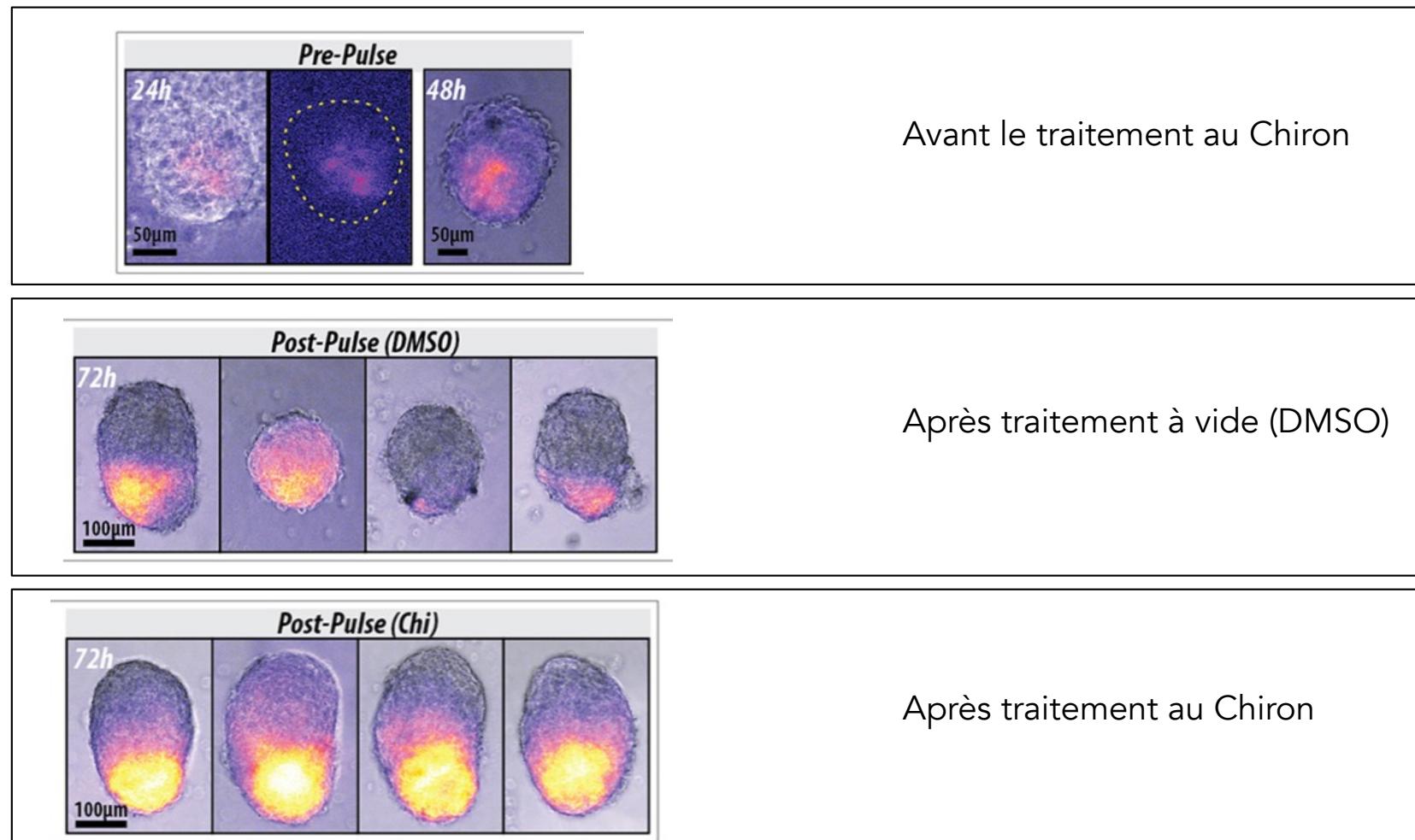
STEM CELLS AND REGENERATION

RESEARCH ARTICLE

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

David A. Turner<sup>1,\*</sup>, Mehmet Girgin<sup>2</sup>, Luz Alonso-Crisostomo<sup>1</sup>, Vikas Trivedi<sup>1</sup>, Peter Baillie-Johnson<sup>1,3</sup>, Cherise R. Glodowski<sup>1</sup>, Penelope C. Hayward<sup>1</sup>, Jérôme Collignon<sup>4</sup>, Carsten Gustavsen<sup>5</sup>, Palle Serup<sup>5</sup>, Benjamin Steventon<sup>1</sup>, Matthias P. Lutolf<sup>2</sup> and Alfonso Martinez Arias<sup>1,\*</sup>

Cellules ES souris: BRA:GFP



# Gastruloides (rappel du cours 2018-2019)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

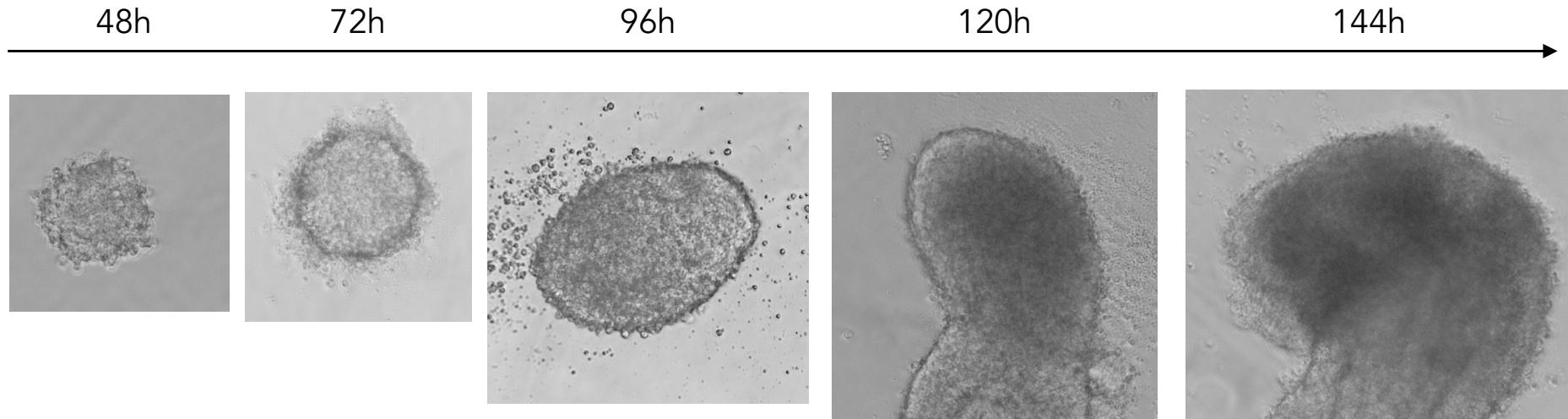
## LETTER

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

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

Leonardo Beccari<sup>1,6</sup>, Naomi Moris<sup>2,6</sup>, Mehmet Girgin<sup>3,6</sup>, David A. Turner<sup>2</sup>, Peter Baillie-Johnson<sup>2,5</sup>, Anne-Catherine Cossy<sup>4</sup>, Matthias P. Lutolf<sup>3</sup>, Denis Duboule<sup>1,4,7\*</sup> & Alfonso Martinez Arias<sup>2,7\*</sup>

11 OCTOBER 2018 | VOL 562 | NATURE | 273



48h Elongation d'une partie BRA+, qui ressemble à l'elongation de la partie postérieure de l'embryon en fin de gastrulation.

Images: Hocine Rekaik and Anne-Catherine Cossy EPFL Lausanne

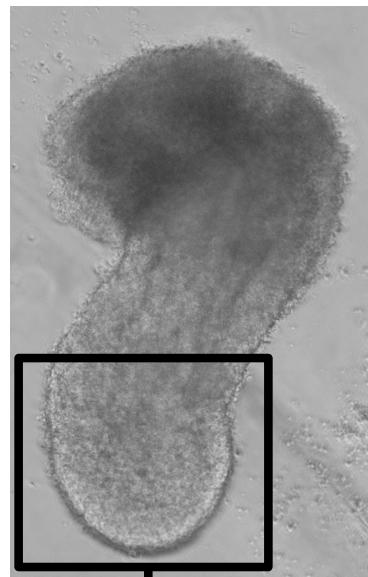
# Gastruloïdes



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

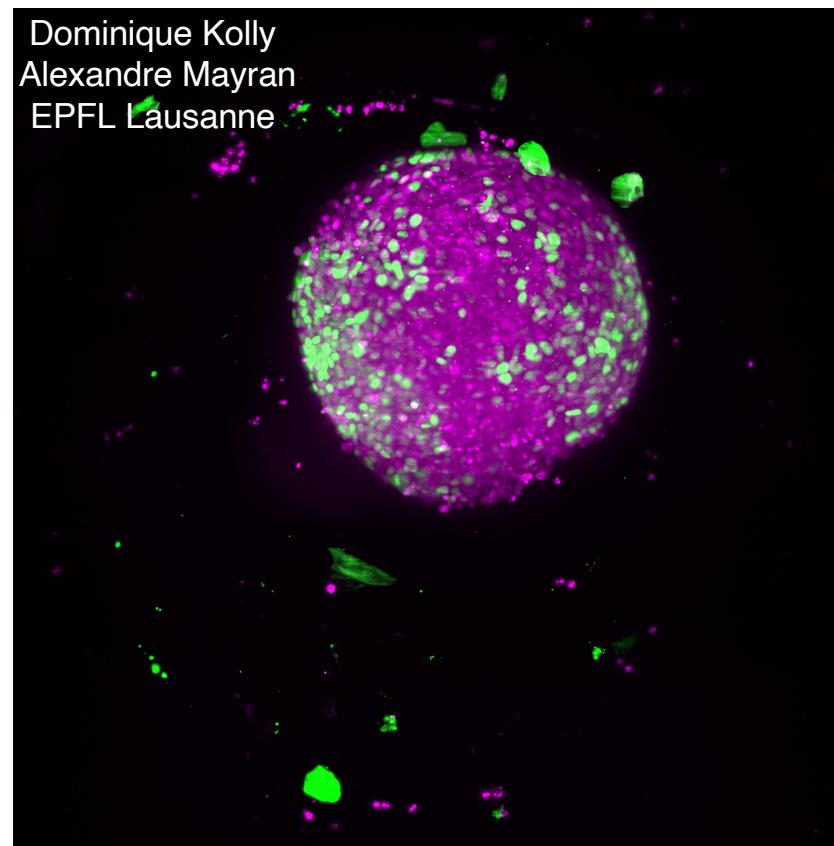
Les Gastruloïdes permettent l'étude de la 'gastrulation' (tardive) de façon dynamique



Elongating axis

Dominique Kolly  
Alexandre Mayran  
EPFL Lausanne

Fenêtre temps: 90h – 120h  
Cellules vertes: *Mesp1*-GFP



Yumiko Saga  
laboratory (Japan)

\*La bande verte est à la transition entre le PSM et le mésoderme somitique...

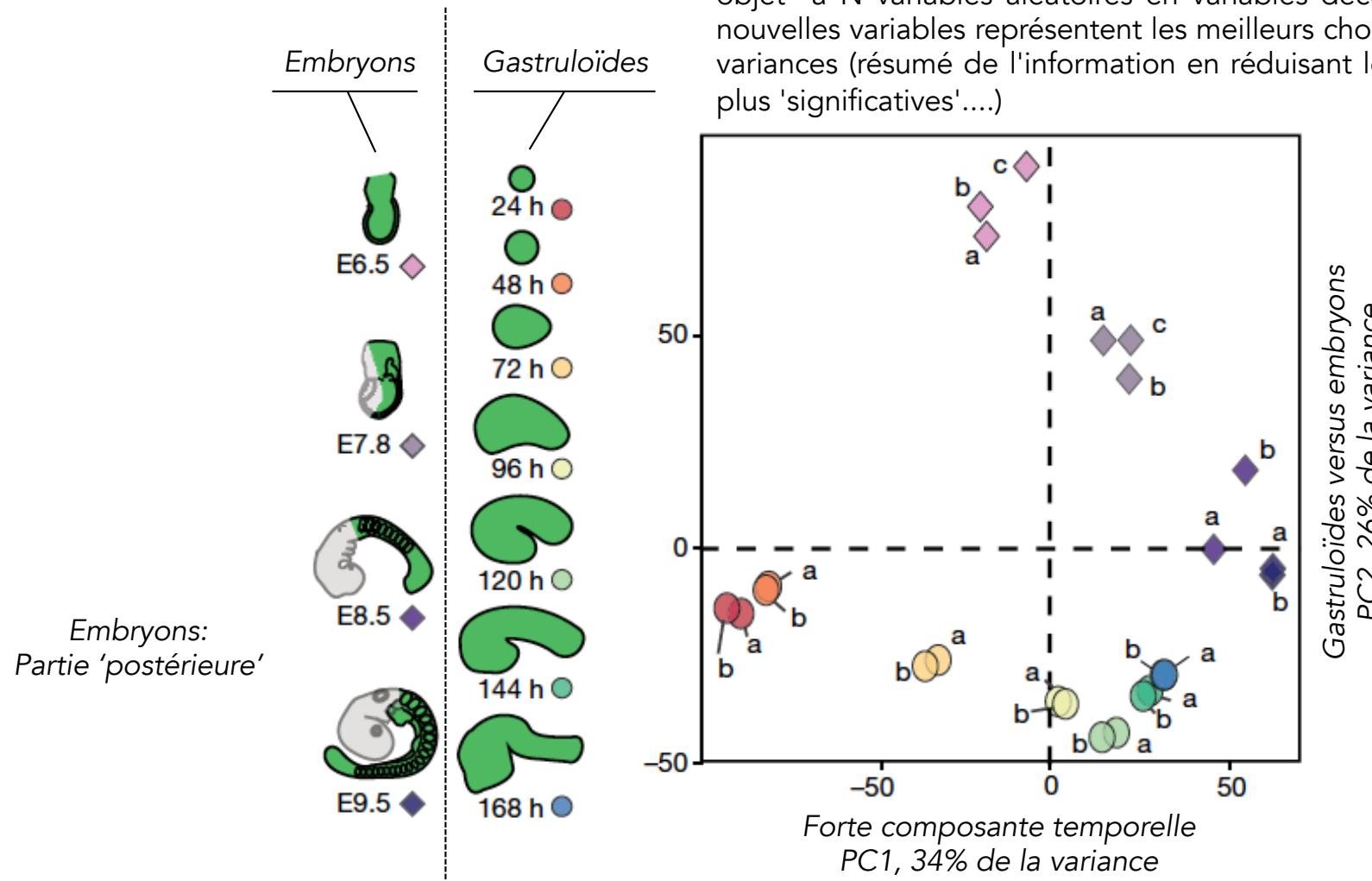
\*Le gastrulôide est donc essentiellement d'identité postérieure

# Gastruloides (rappel du cours 2018-2019)



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

Beccari et al., Nature 2018



Ressemblance avec l'embryon normal

\*Expérience de RNA-seq

\*Analyse en composantes principales (PCA): Décomposer un objet à N variables aléatoires en variables décorrélées. Les premières nouvelles variables représentent les meilleurs choix pour décomposer les variances (résumé de l'information en réduisant les variables à celles les plus 'significatives'....)

\*Bon clustering sur PC1 (temps): corrélation entre la progression des profils d'expression des gastruloides et le développement embryonnaire.

\*Convergence des programmes de transcription aux stades tardifs

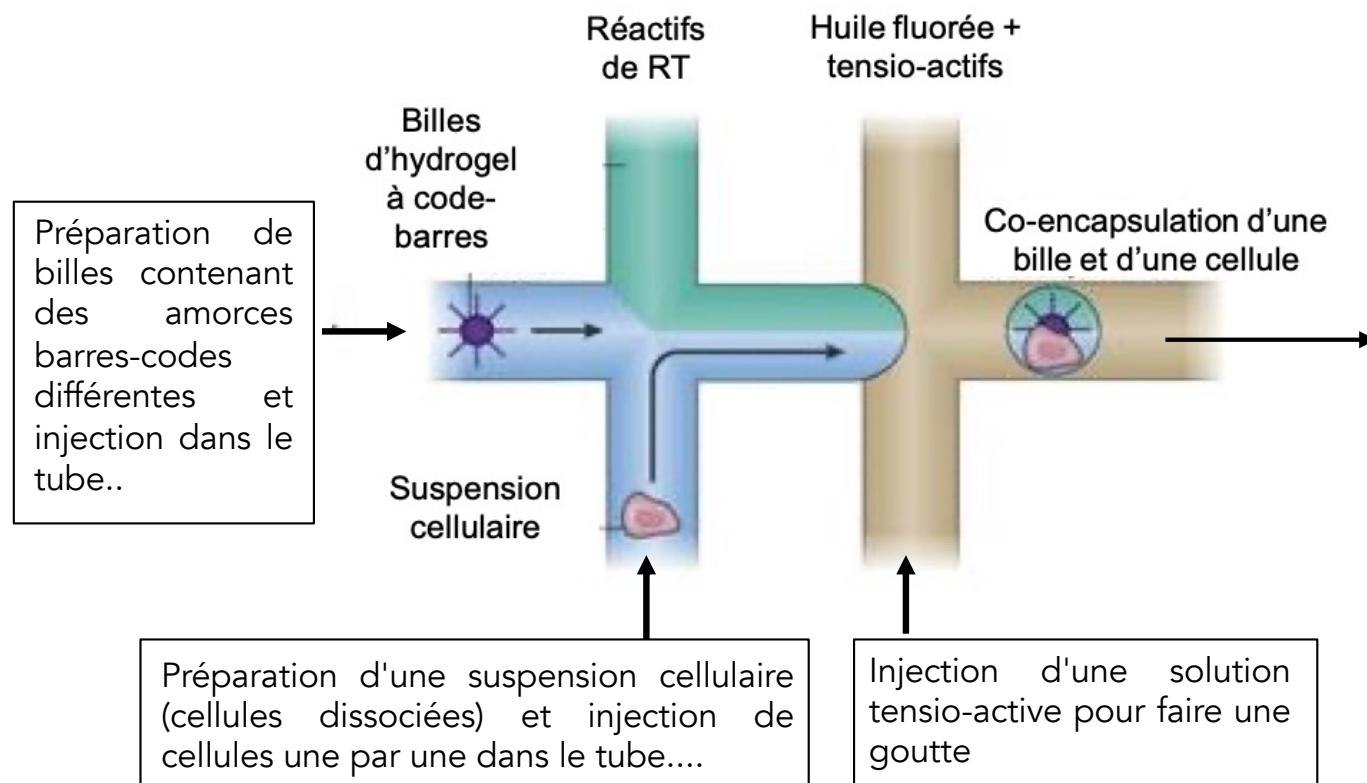
# Séquençage d'ARNs de cellules uniques

(Rappel cours 2022-2023)

THÈSE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Sophie FOULON  
Le 10 Octobre 2019

Préparée à l'Ecole supérieure de physique et de chimie  
industrielles de la ville de Paris



Stratégie générale de l'approche par microfluidique en goutte (avec un système de codes barres pour amorcer la synthèse ....).

Tous les ARNs d'une cellule seront transcrits (inverse) en utilisant le barre-code apporté par la bille comme amorce et donc tous seront marqués avec UN code ADN (petite séquence unique) différent de celui d'une autre cellule...

Après séquençage de X milliers de cellules différentes, les ADNs (ARNs) sont triés par un logiciel en fonction de leurs barres-codes..

B= Séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule

unique en utilisant la microfluidique en gouttes. Des cellules et des billes d'hydrogel porteuses d'amorces à code-barres sont encapsulées dans des gouttes, dispersées dans de l'huile fluorée. La cellule est lysée une fois dans la goutte et ses ARN messagers sont capturées par les amorces apportées par la bille.

# Séquençage d'ARNs de cellules uniques

(Rappel cours 2022-2023)

## Developmental Cell



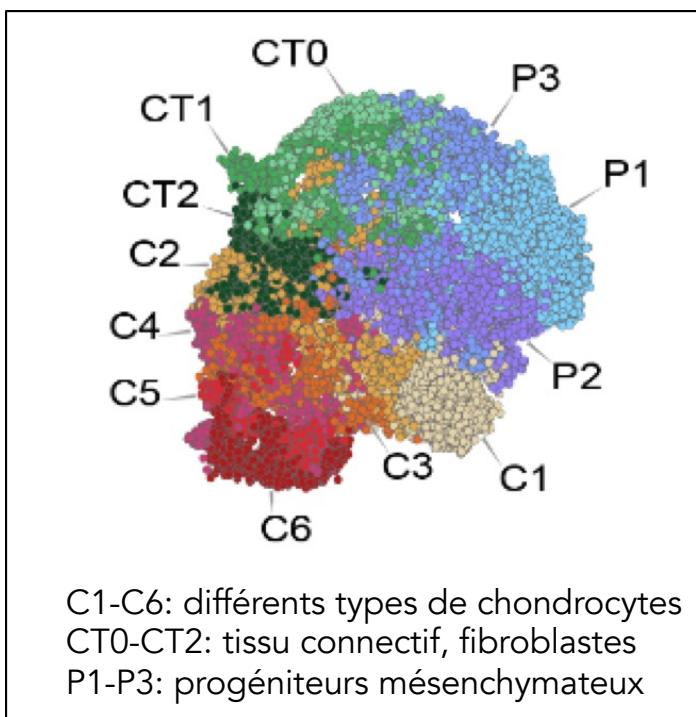
Available online 16 March 2023

In Press, Corrected Proof [What's this?](#)

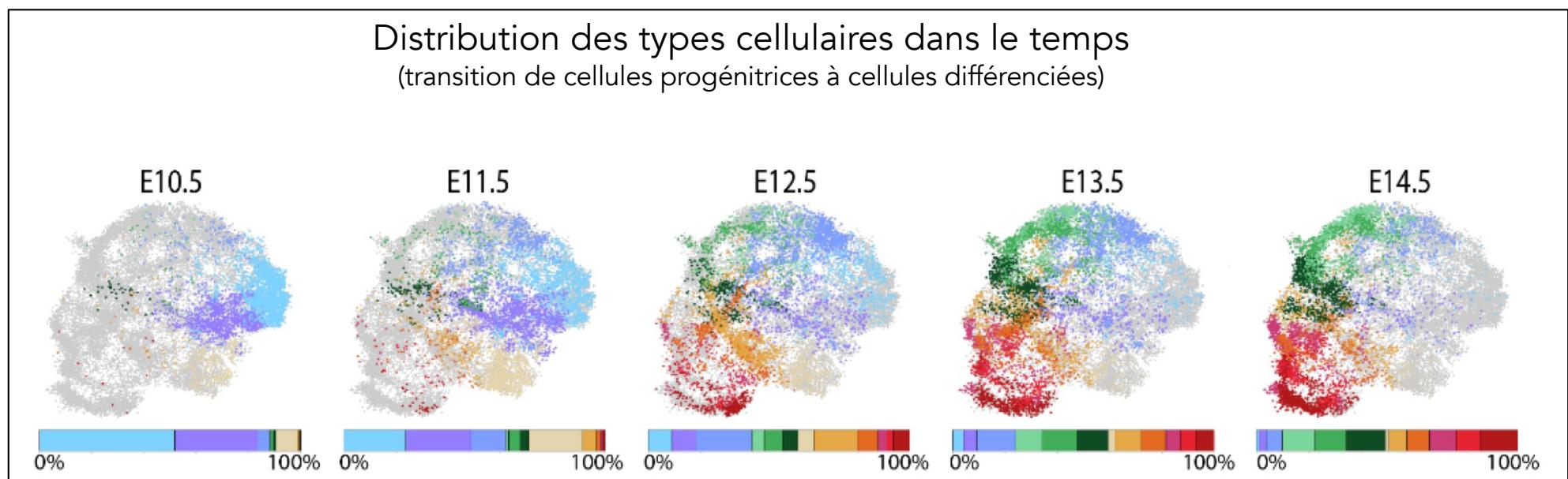
Article

A single-cell census of mouse limb development identifies complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman<sup>1,3</sup>, Mor Zada<sup>2,3</sup>, Eyal David<sup>2</sup>, Amir Giladi<sup>2</sup>, Ido Amit<sup>2,4</sup>   
Elazar Zelzer<sup>1,4,5</sup>



Distribution des types cellulaires dans le temps  
(transition de cellules progénitrices à cellules différenciées)

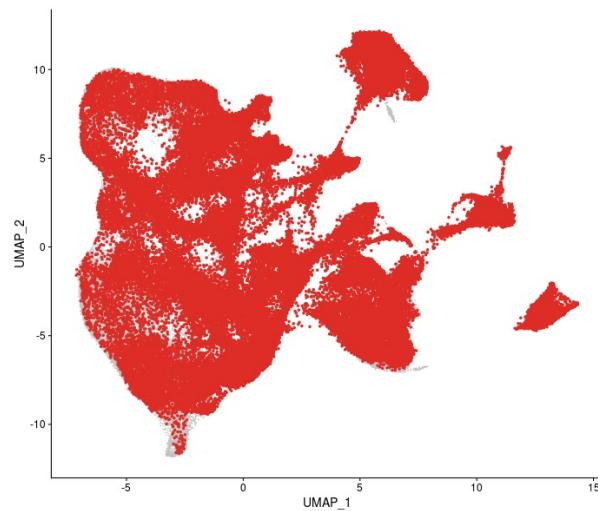


# Gastruloïdes

\*Les gastruloïdes ne contiennent que des cellules représentées dans l'embryon (pas de 'fantaisie')

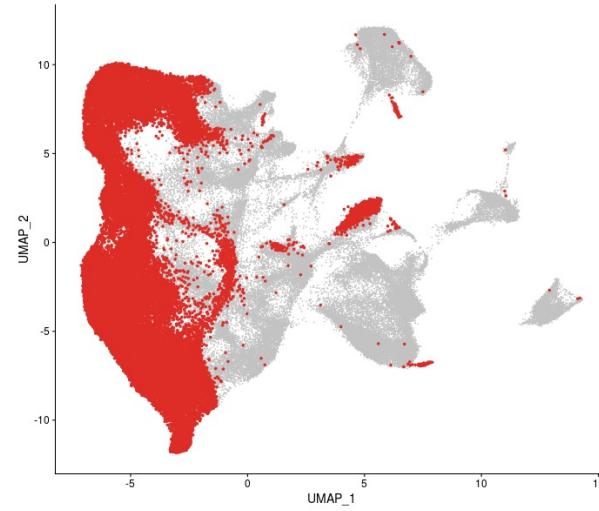
\*Ces types cellulaires correspondent à des tissus postérieurs

77 243 cellules embryonnaires  
E6.5-E8.5h (12h résolution)



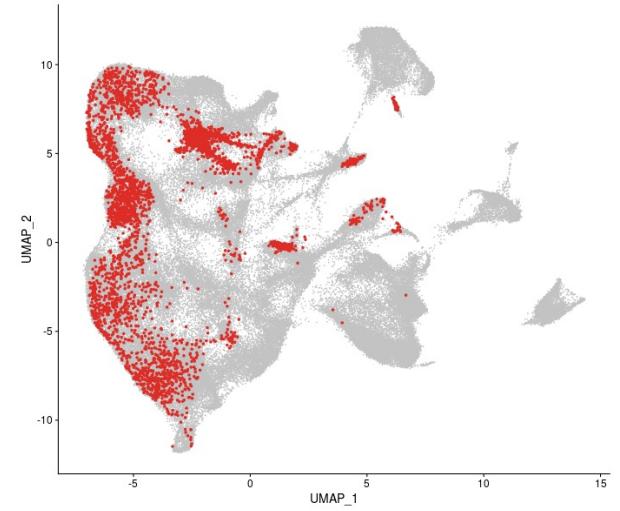
Chan, Smith et al. 2019

52 397 cellules de gastruloïdes  
96-168h (24h résolution)



Alexandre Mayran

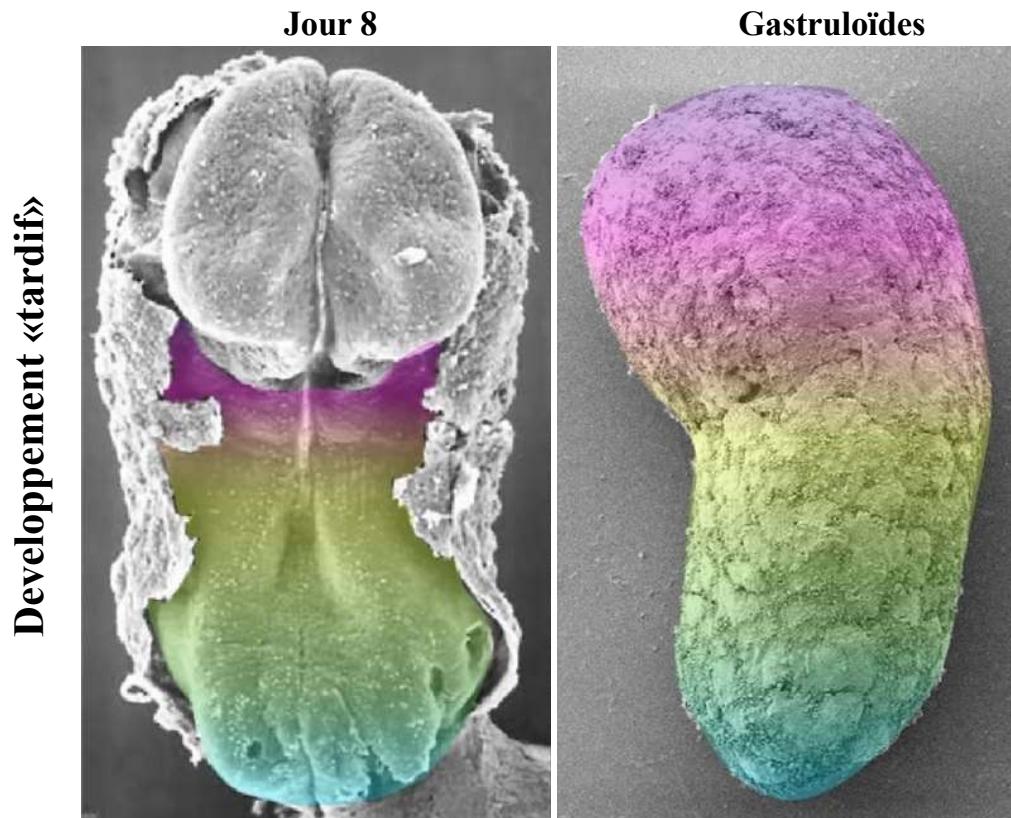
4 001 cellules postérieures  
E9.5 PSM



Diaz-Cuadroz et al., 2020

# Gastruloïdes et embryons

\*Tentative de correspondance



\*Ces correspondances vont dépendre des conditions de cultures qui peuvent faire varier les tissus observés ainsi que leur arrangement, morphologies etc

# Gastruloides humains

Article

## An *in vitro* model of early anteroposterior organization during human development

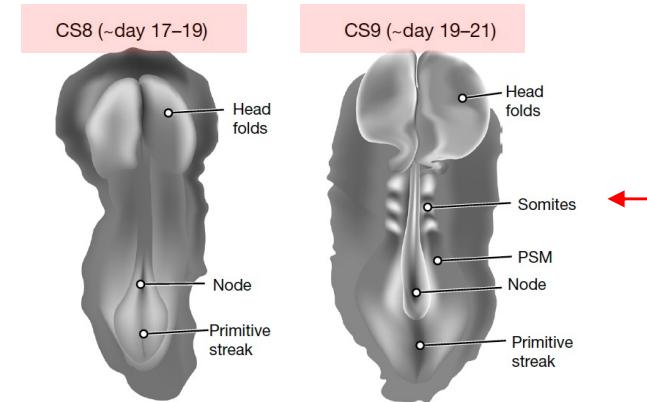
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

Received: 14 December 2018

Accepted: 24 April 2020

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020

The body plan of the mammalian embryo is shaped through the process of gastrulation, an early developmental event that transforms an isotropic group of cells into an ensemble of tissues that is ordered with reference to three orthogonal axes<sup>1</sup>. Although model organisms have provided much insight into this process, we know very little about gastrulation in humans, owing to the difficulty of obtaining embryos at such early stages of development and the ethical and technical restrictions that limit the feasibility of observing gastrulation *ex vivo*<sup>2</sup>. Here we show that human embryonic stem cells can be used to generate gastruloids—three-dimensional multicellular aggregates that differentiate to form derivatives of the three germ layers organized spatiotemporally, without additional extra-embryonic tissues. Human gastruloids undergo elongation along an anteroposterior axis, and we use spatial transcriptomics to show that they exhibit patterned gene expression. This includes a signature of somitogenesis that suggests that 72-h human gastruloids show some features of Carnegie-stage-9 embryos<sup>3</sup>. Our study represents an experimentally tractable model system to reveal and examine human-specific regulatory processes that occur during axial organization in early development.



\*Les gastruloides humains s'allongent selon un axe antéro-postérieur qui montre une organisation de domaines d'expression comparable à celle de l'embryon humain au stade Carnegie 9 (partie postérieure, jours 19-21; 2mm).

\*Ces gastruloides sont donc des objets intéressants pour étudier ces phases de régulation difficiles (impossible) d'accès dans l'embryon humain.

# Gastruloides humains; protocole

Article

## An in vitro model of early anteroposterior organization during human development

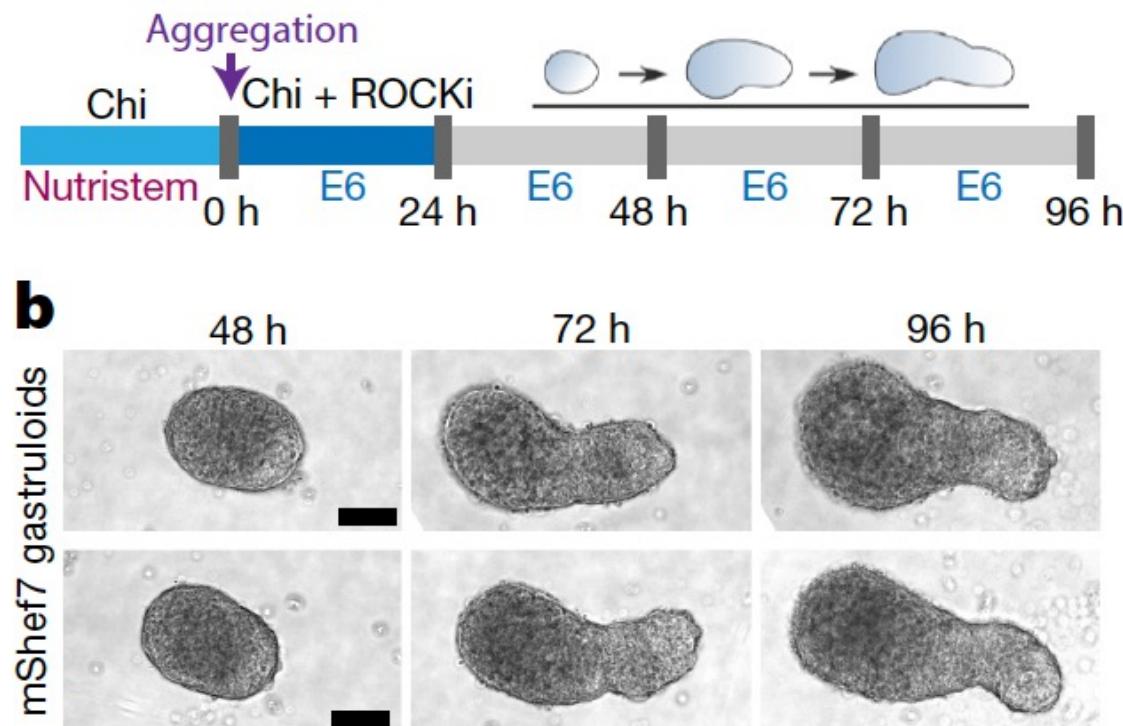
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

Received: 14 December 2018

Accepted: 24 April 2020

Naomi Moris<sup>1,6</sup>✉, Kerim Anlas<sup>1,3,6</sup>, Susanne C. van den Brink<sup>2,6</sup>, Anna Alemany<sup>2,6</sup>,  
Julia Schröder<sup>1,4</sup>, Sabitri Ghimire<sup>1</sup>, Tina Balayo<sup>1,6</sup>, Alexander van Oudenaarden<sup>2,7</sup>✉  
& Alfonso Martinez Arias<sup>1,7</sup>✉

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020



Chi: Chiron (Wnt agonist CHIR99021)

ROCKi: inhibiteur de la kinase ROCK (Rho-associated kinase; impliquée dans la forme et le mouvement des cellules –cytosquelette).

mShef7: cellules ES humaines

Nutristem: Milieu sans sérum (donc sans facteurs..)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

\*protocole un peu différent que celui utilisé pour les gastruloides de souris.

\*Traitement au Chiron des cellules en 2D, avant qu'elles ne forment des agrégats. Ce traitement est essentiel pour l'élongation. Mais, traitement en utilisant Wnt3A ne fonctionne pas! (effets différents..?).

\*Utilisation d'un inhibiteur de la kinase ROCK

\*la majorité des gastruloides se rétracte après 72h, contrairement au gastruloides de souris.

# Gastruloïdes humains; protocole

Article

## An in vitro model of early anteroposterior organization during human development

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

Received: 14 December 2018

Accepted: 24 April 2020

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020

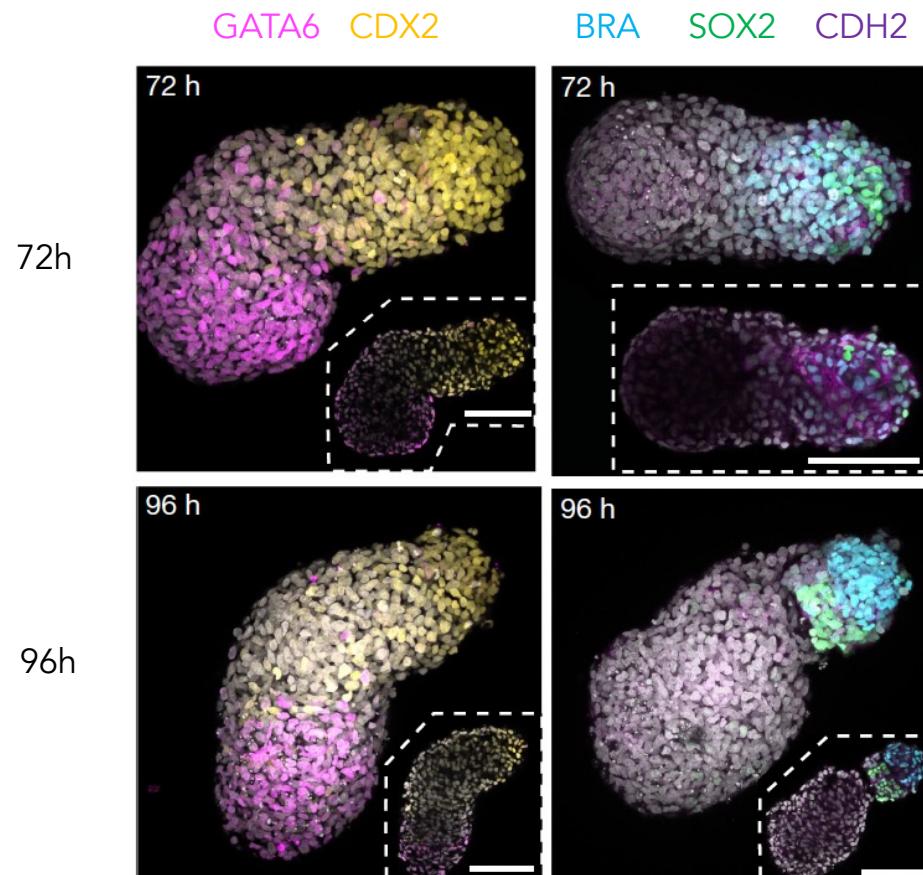


COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

\*Vérification que des dérivés des trois feuillets germinatifs peuvent être obtenus et que le gastruloïde est bien polarisé.

\*Utilisation de la lignée humaine RUES2-GLR (Martyn et al., *Nature* 2018).



GATA6: Cardiaque, endoderme

CDX2: mésoderme, partie postérieure

BRA: mésoderme postérieur

SOX2: mésoderme

\*Ces marqueurs indiquent la présence d'une région correspondant à la région postérieure de l'embryon, qui s'allonge pendant l'extension de l'axe corporel AP, ainsi que d'une région plus 'antérieure', donc une polarisation du gastruloïde.

# Gastruloides; analyse des ARNs par TOMO-seq



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Cell

Resource

## Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo

Jan Philipp Junker,<sup>1,6</sup> Emily S. Noël,<sup>1,6</sup> Victor Guryev,<sup>2</sup> Kevin A. Peterson,<sup>3</sup> Gopi Shah,<sup>4</sup> Jan Huisken,<sup>4</sup>  
Andrew P. McMahon,<sup>3</sup> Eugene Berezikov,<sup>2,5</sup> Jeroen Bakkers,<sup>1,7</sup> and Alexander van Oudenaarden<sup>1,5,7,\*</sup>

Cell 159, 662–675, October 23, 2014 ©2014 Elsevier Inc.

\*Analyse des domaines d'expression des ARNs en 3D par tomographie

## Tomographie

Article   [Discussion](#)

[Lire](#)   [Modifier](#)   [Modifier](#)

La **tomographie** est une technique d'imagerie, très utilisée dans l'imagerie médicale, ainsi qu'en géophysique, en astrophysique et en mécanique des matériaux. Cette technique permet de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées depuis l'extérieur de cet objet.

# Gastruloides; analyse des ARNs par TOMO-seq



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

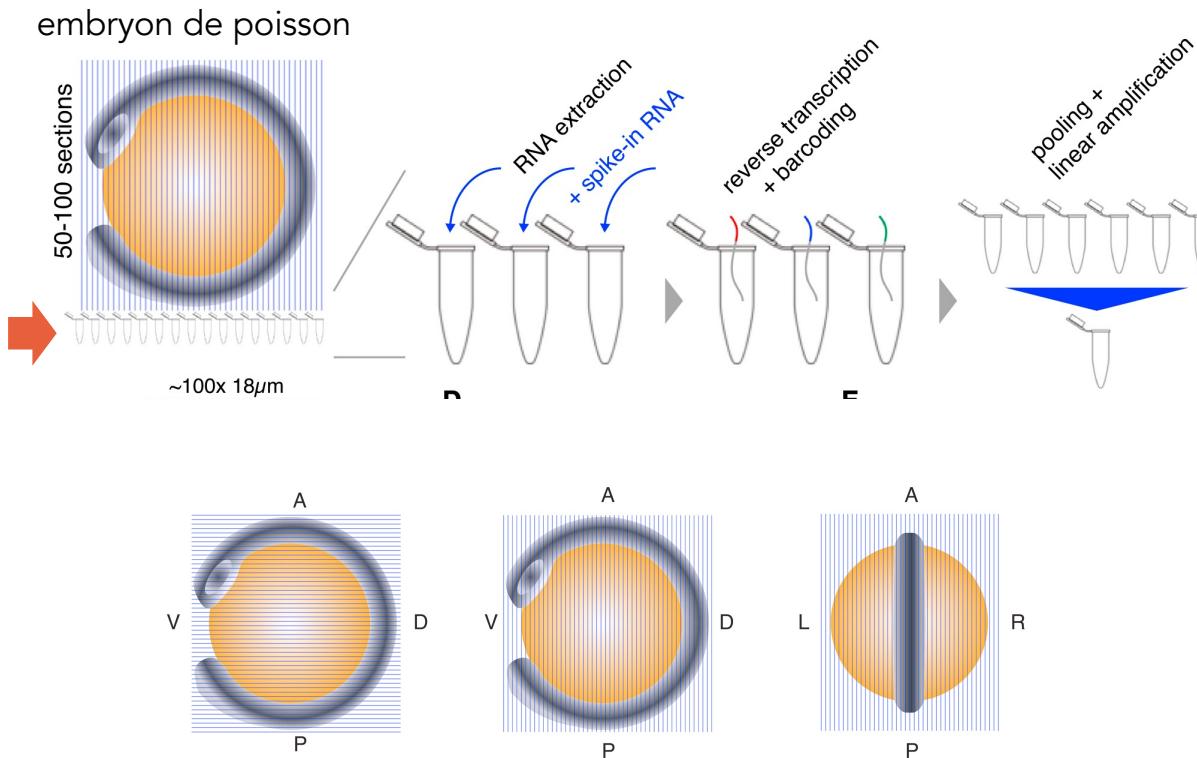
Cell

Resource

## Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo

Jan Philipp Junker,<sup>1,6</sup> Emily S. Noël,<sup>1,6</sup> Victor Guryev,<sup>2</sup> Kevin A. Peterson,<sup>3</sup> Gopi Shah,<sup>4</sup> Jan Huisken,<sup>4</sup> Andrew P. McMahon,<sup>3</sup> Eugene Berezikov,<sup>2,5</sup> Jeroen Bakkers,<sup>1,7</sup> and Alexander van Oudenaarden<sup>1,5,7,\*</sup>

Cell 159, 662–675, October 23, 2014 ©2014 Elsevier Inc.



\*Exemple d'un embryon de poisson

\*Sections histologiques en série faites sur un spécimen congelé.

\*Extraction des ARNs totaux pour chaque section et rajout de 'spike-in RNA' pour calibrer chaque extraction (être certain de l'homogénéité des extractions..).

\*Transcription inverse pour faire de l'ADN et rajout d'un code-barres pour chaque section, ce qui permet de tout amplifier et séquencer en même temps...

\*Des sections sous d'autres plans d'un spécimen identique permettent d'avoir une idée de la topologie de l'expression d'un ARN particulier.

# Gastruloides; analyse des ARNs par TOMO-seq



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Article

## An in vitro model of early anteroposterior organization during human development

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

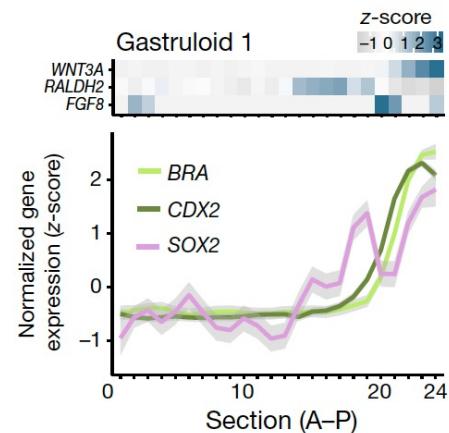
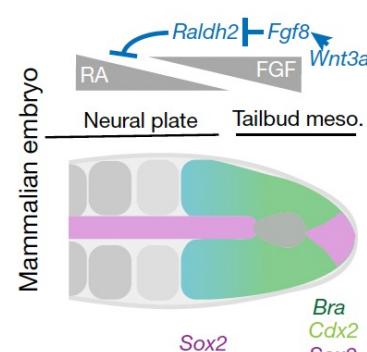
Received: 14 December 2018

Accepted: 24 April 2020

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020

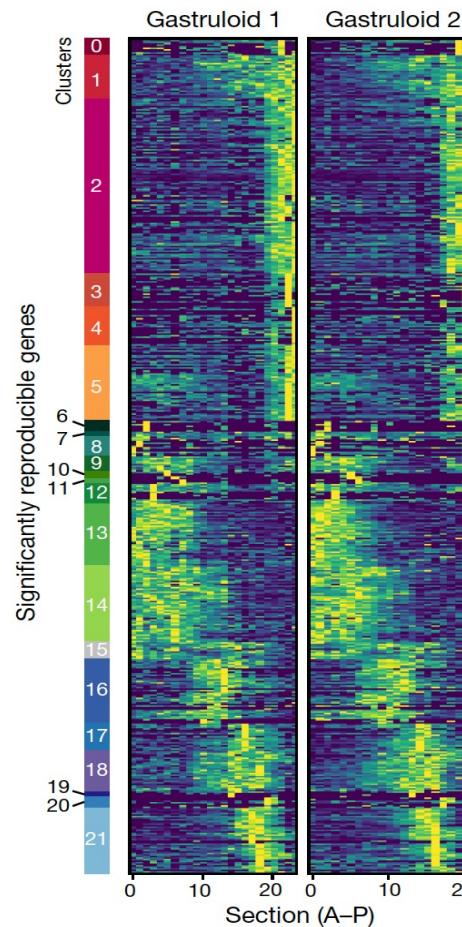
Naomi Moris<sup>1,6</sup>\*, Kerim Anlas<sup>1,3,6</sup>, Susanne C. van den Brink<sup>2,6</sup>, Anna Alemany<sup>2,6</sup>,  
Julia Schröder<sup>1,4</sup>, Sabitri Ghimire<sup>1</sup>, Tina Balayo<sup>1,5</sup>, Alexander van Oudenaarden<sup>2,7</sup>✉  
& Alfonso Martinez Arias<sup>1,7</sup>✉

\*Extraction de données particulières touchant un gène ou un réseau de gènes



\*Sections histologiques en série de deux gastruloides humains.

\*Regroupement (clustering) des gènes montrant des profiles d'expressions similaires par TOMO-seq.



\*Très bonne reproductibilité...

# Gastruloides; comparaison humain-souris par TOMO-seq

Article

## An in vitro model of early anteroposterior organization during human development

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

Received: 14 December 2018

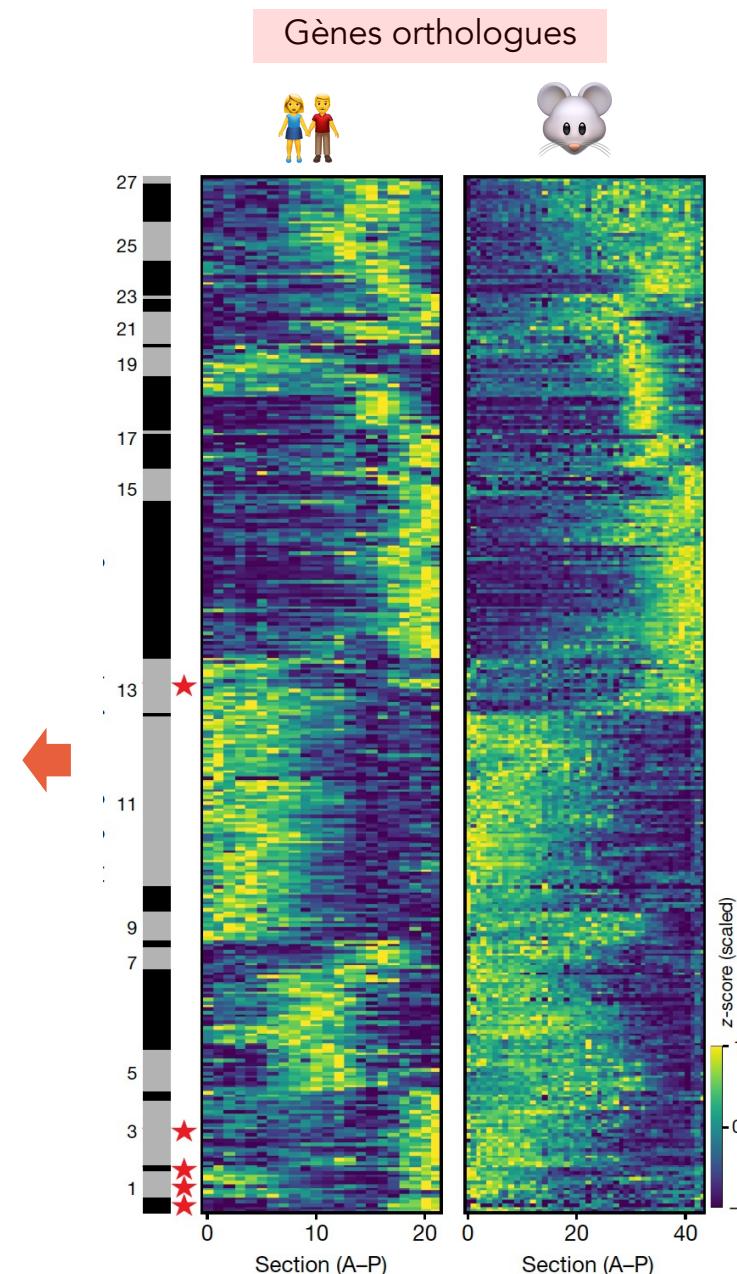
Accepted: 24 April 2020

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020

### Comparative spatial transcriptomics

The high degree of organization in gene expression that we observed in human gastruloids prompted us to investigate how these patterns correspond with other developmental models. To do this, we focused on mouse gastruloids as an equivalent model system<sup>9,10</sup>. Comparison of mouse and human gastruloid tomo-seq datasets showed that there was a high degree of conservation in axial patterning (Fig. 4g, Supplementary Data 8). In particular, we observed a conserved pattern of mesodermal differentiation along the anteroposterior axis of the gastruloids<sup>24</sup>.

There was a posterior-to-anterior signature of somitogenesis, with the expression of tailbud genes (*BRA*, *CDX2* and *LFNG*) posteriorly, a short domain of *MESPI* and *MESP2* expression and a more-anterior, broader domain of *MEOX1* and *TCF15* expression (Fig. 4h). The overall pattern of gene expression therefore mirrors the organization of paraxial mesoderm specification and differentiation in a mammalian embryo<sup>25</sup>, as well as the temporal sequences of somitogenesis in human ES cells<sup>7,26</sup>. In contrast to these conserved patterns, we also noticed genes that were expressed in different regions (clusters 0, 2, 3 and 13 for example; Supplementary Data 8) or uniquely expressed (Extended Data Fig. 9a–e, Supplementary Data 9) in each of the two systems, supporting the notion that species-specific regulation of patterning might be occurring in the gastruloid models.



\*Comparables mais avec des différences notables!!

# Gastruloides; comparaison humain-souris par TOMO-



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Article

## An in vitro model of early anteroposterior organization during human development

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

Received: 14 December 2018

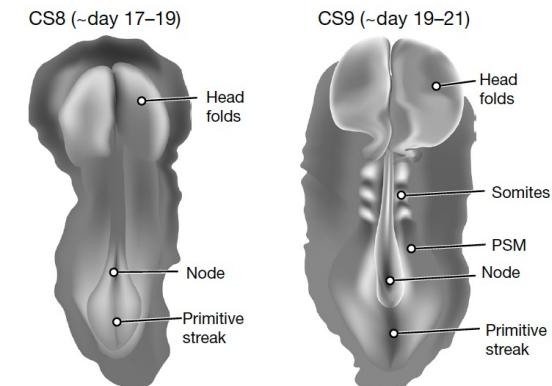
Accepted: 24 April 2020

Naomi Moris<sup>1,6</sup>✉, Kerim Anlas<sup>1,3,6</sup>, Susanne C. van den Brink<sup>2,6</sup>, Anna Alemany<sup>2,6</sup>,  
Julia Schröder<sup>1,4</sup>, Sabitri Ghimire<sup>1</sup>, Tina Balayo<sup>1,5</sup>, Alexander van Oudenaarden<sup>2,7</sup>✉  
& Alfonso Martinez Arias<sup>1,7</sup>✉

412 | Nature | Vol 582 | 18 June 2020

The lack of anterior neural and extra-embryonic lineages that is characteristic of gastruloids raises important questions about the self-organization of the mammalian body plan, but also removes several of the ethical considerations that are associated with prolonged culturing of human embryo. Human gastruloids represent an experimental model that could prove fruitful in the study of the mechanisms associated with early human development and disease, and their tractable nature should allow the detailed exploration of a variety of questions associated with human embryogenesis.

Conclusion (une des...):



Ces gastruloides humains semblent donc être de bons modèles pour étudier certaines questions touchant au développement de l'embryon humain. En outre, le fait que toute la partie neurale antérieure ainsi que les annexes extra-embryonnaires fassent défaut, relativise certaines des considérations éthiques associées à l'utilisation et à l'étude de ces pseudo-embryons humains.

# Gastruloides humains; protocole avec RA



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>,  
Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>,  
Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

### ABSTRACT

Embryonic organoids are emerging as powerful models for studying early mammalian development. For example, stem cell-derived 'gastruloids' form elongating structures containing all three germ layers<sup>1-4</sup>. However, although elongated, human gastruloids do not morphologically resemble post-implantation embryos. Here we show that a specific, discontinuous regimen of retinoic acid (RA) robustly induces human gastruloids with embryo-like morphological structures, including a neural tube and segmented somites. Single cell RNA-seq (sc-RNA-seq) further reveals that these human 'RA-gastruloids' contain more advanced cell types than conventional gastruloids, including neural crest cells, renal progenitor cells, skeletal muscle cells, and, rarely, neural progenitor cells. We apply a new approach to computationally stage human RA-gastruloids relative to somite-resolved mouse embryos, early human embryos and other gastruloid models, and find that the developmental stage of human RA-gastruloids is comparable to that of E9.5 mouse embryos, although some cell types show greater or lesser progression. We chemically perturb WNT and BMP signaling in human RA-gastruloids and find that these signaling pathways regulate somite patterning and neural tube length, respectively, while genetic perturbation of the transcription factors PAX3 and TBX6 markedly compromises the formation of neural crest and somites/renal cells, respectively. Human RA-gastruloids complement other embryonic organoids in serving as a simple, robust and screenable model for decoding early human embryogenesis.

We investigated differences between mouse and human gastruloids generated with published protocols, which led us to hypothesize that neuromesodermal progenitor (NMPs) are biased towards somitic rather than neural fates in previously described human gastruloids, relative to both mouse gastruloids and *in vivo* development. In seeking to correct this, we discovered that a discontinuous regimen of retinoic acid (RA) and Matrigel is sufficient to induce embryo-like morphological features in human gastruloids. Specifically, these human 'RA-gastruloids' robustly form both a neural tube and segmented somite-like structures. Furthermore, sc-RNA-seq revealed that human RA-gastruloids include more advanced cell types than either human or mouse gastruloids, including neural crest cells, renal progenitor cells, skeletal muscle cells, and neural progenitor cells. We developed and applied a

\*Traitement discontinu avec de l'acide rétinoïque (RA) induit des gastruloides avec des structures plus avancées, telles qu'un tube neural et des somites segmentées, ainsi que des types cellulaires généralement non-présent dans les gastruloides 'conventionnels' (cellules de la crête neurale, progéniteurs des cellules rénales etc...)

Traitement au RA pour 'corriger un biais' des cellules NMPs vers la différenciation PSM puis somitique.....(justification..)

# Signalisation par l'acide rétinoïque (RA)



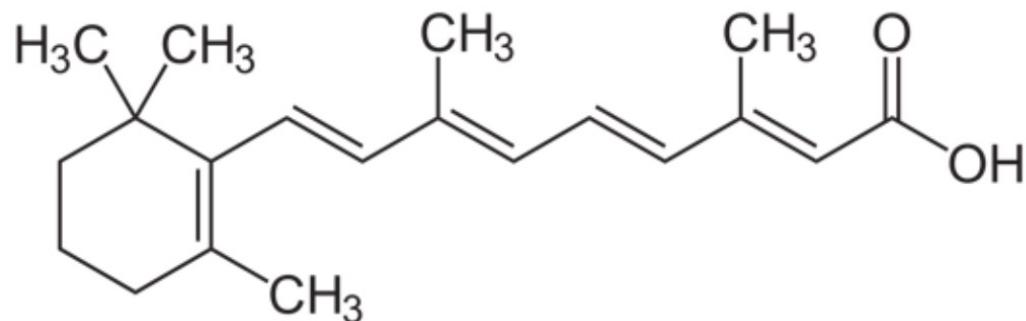
COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

## Acide rétinoïque

Les dérivés naturels de la vitamine A sont l'acide rétinoïque et son isomère l'acide 9-cis-rétinoïque. Ces molécules liposolubles influencent le développement embryonnaire chez plusieurs vertébrés via une action régulatrice sur l'expression de gènes cibles. [Wikipédia](#)

**Formule :** C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>



# Signalisation par l'acide rétinoïque (RA)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Journal of Molecular  
Endocrinology

M Berenguer and G Duester

69:4

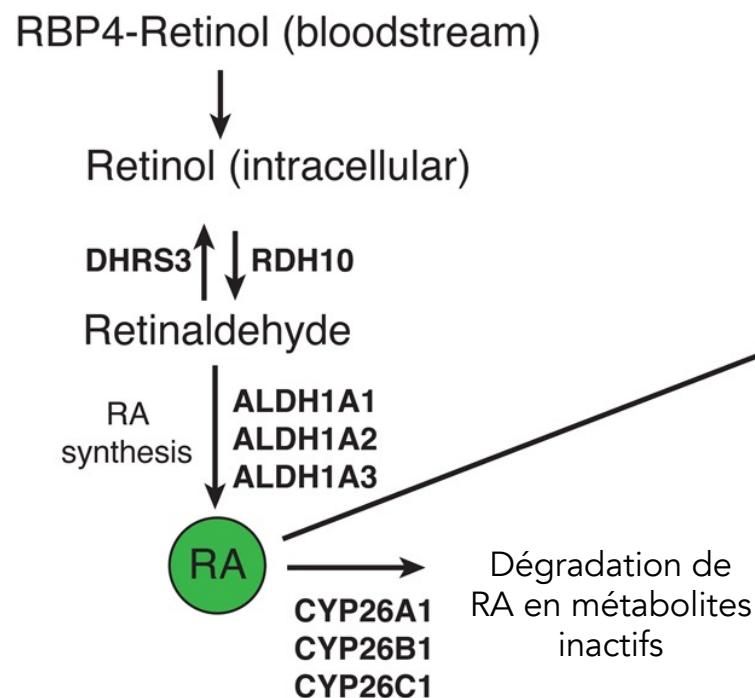
THEMATIC REVIEW

## Retinoic acid, RARs and early development

Journal of Molecular  
Endocrinology  
(2022) 69, T59-T67

Marie Berenguer and Gregg Duester<sup>✉</sup>

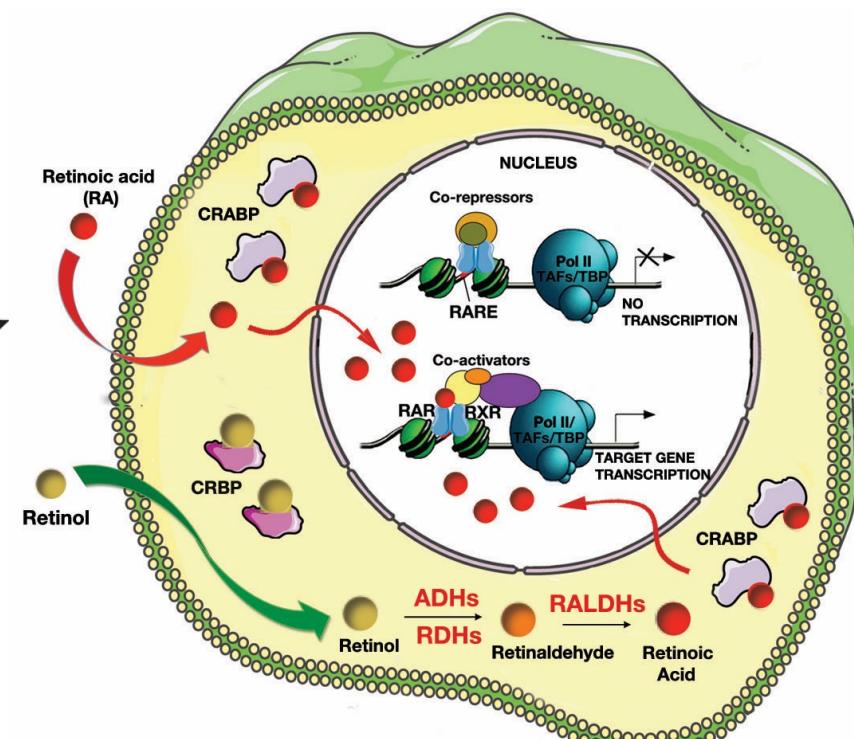
Development, Aging, and Regeneration Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California, USA



\*Retinol naturel (Vitamine A) dans les carottes, citrouilles, patates douces...

\*Retinol intracellulaire transformé en retinaldéhyde par la retinol déhydrogénase, puis en RA par des aldéhyde déhydrogénase (ALDH), mais aussi catabolisé par des enzymes CYP26...

\*RA pris en charge par des récepteurs nucléaires (RAR, RXR) qui lient l'ADN sur des séquences cibles bien précises (DR1, DR2 ou DR5) et qui activent ou répriment la transcription de gènes cibles.



# Importance du RA dans le développement précoce



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Journal of Molecular  
Endocrinology

M Berenguer and G Duester

69:4

THEMATIC REVIEW

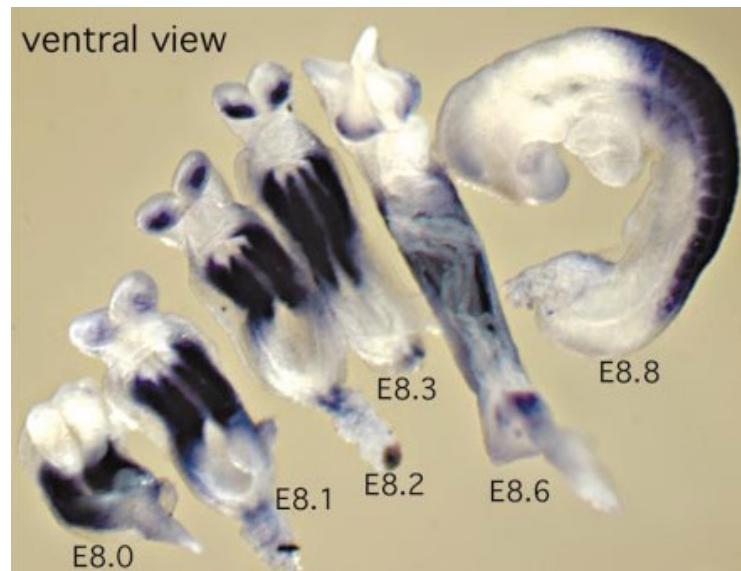
## Retinoic acid, RARs and early development

Journal of Molecular  
Endocrinology  
(2022) 69, T59-T67

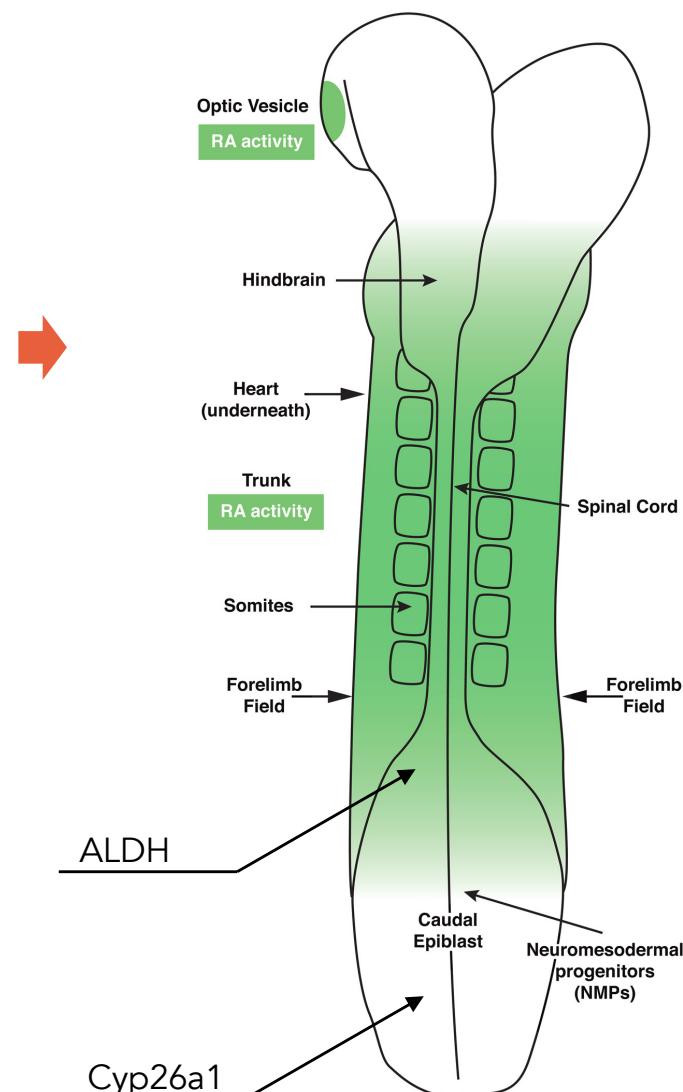
Marie Berenguer and Gregg Duester

Development, Aging, and Regeneration Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California, USA

\*Le RA est actif principalement dans les régions plus matures du tronc et son action est exclue de la partie contenant les cellules NMPs (souches) et plus généralement de la partie représentée dans la région 'postérieure' des gastruloides... Donc son application devrait intuitivement conduire à une 'maturation' supplémentaire des gastruloides...



RALDH mRNAs, Wagner et al., Dev. Biol., 2000



# Importance du RA dans le développement précoce

\*Des mutations provoquant des surplus ou des manques de RA pendant cette période embryonnaire produisent des effets tératologiques variés, selon les doses et l'âge des embryons chez les rongeurs.

\*Contre-indication absolue des crèmes pour la peau (acné etc) à base de rétinol/RA pour les femmes enceintes.

Accutane, 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), entered the U.S. market in 1982 for the treatment of severe cystic acne. In 1985, Lammer *et al.* reported the findings of the first prospective study that clearly defined its high teratogenic potency.

Risks associated with human exposure to the therapeutic dose during embryogenesis were reported to be 40% for spontaneous abortion, 4-5% for perinatal mortality, 16% for premature birth, and 25% for major malformation.

This striking teratogenic potency was not anticipated, because earlier as well as later research documented that in rodent models, isotretinoin had lower teratogenic potency than all-trans-retinoic acid and other retinoids"

Références : Lammer *et al.*, 1985 (Isotréтиnoïne: Accutane®)  
deDie-Smulders *et al.*, 1995 (Acitretin)  
Revue : Adams, Birth Defects Research, 2010

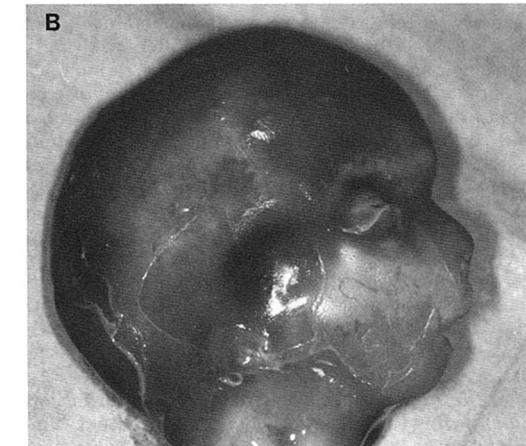


Fig. 5. A,B: Craniofacial anomalies in the fetus. Underdevelopment of maxilla and mandibula, microtia, and preauricular tags.

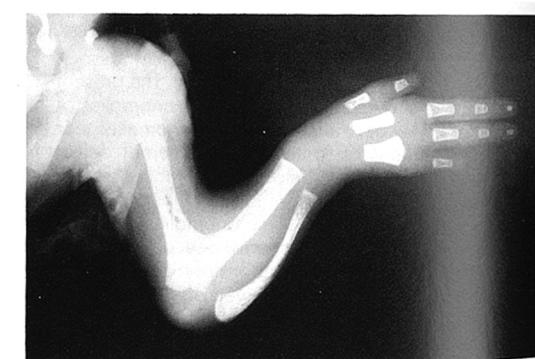


Fig. 3. Radiography of the left arm. Humeroradial synostosis and only four rays in the hands. For further details see text.

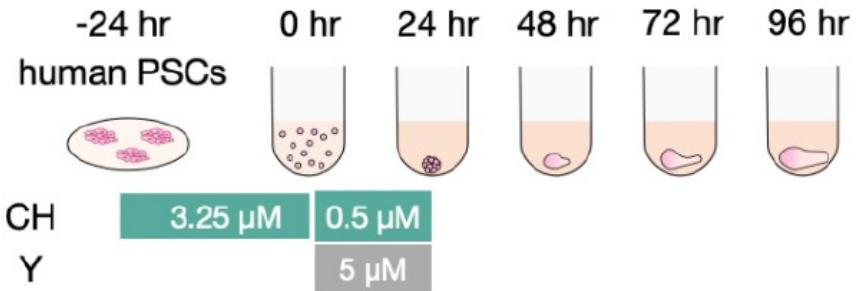
# Gastruloides humains; protocole avec RA

> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

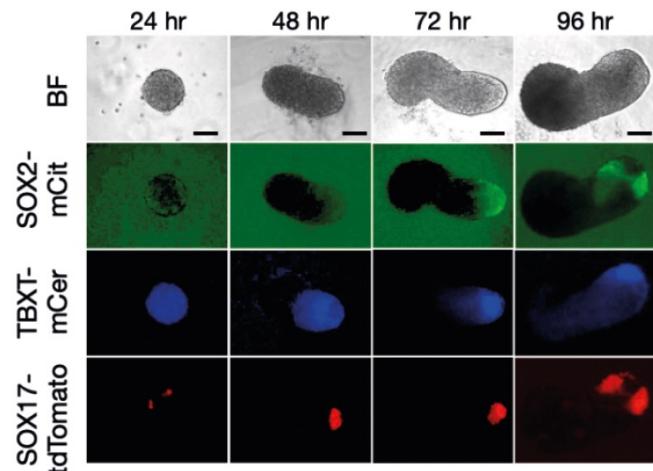
## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>, Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>, Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

Protocole 'contrôle': Pré-traitement avec CHI et utilisation d'un inhibiteur de la kinase ROCK (Y). Idem Moris et al. (pas d'effet robuste avec ou sans matrigel...).

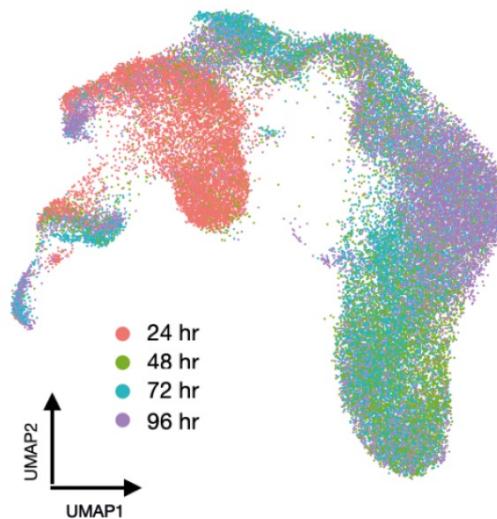


Marqueurs de polarisation AP  
idem Moris et al.

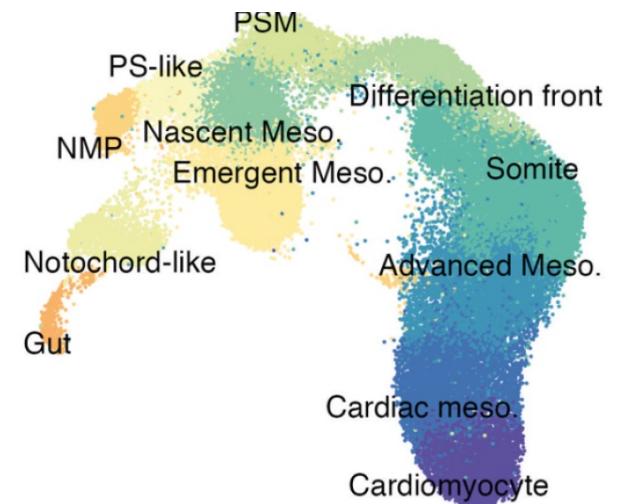


Analyses par scRNA-seq

Clusters temporels



Clusters types cellulaires



# Gastruloides humains; protocole avec RA



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

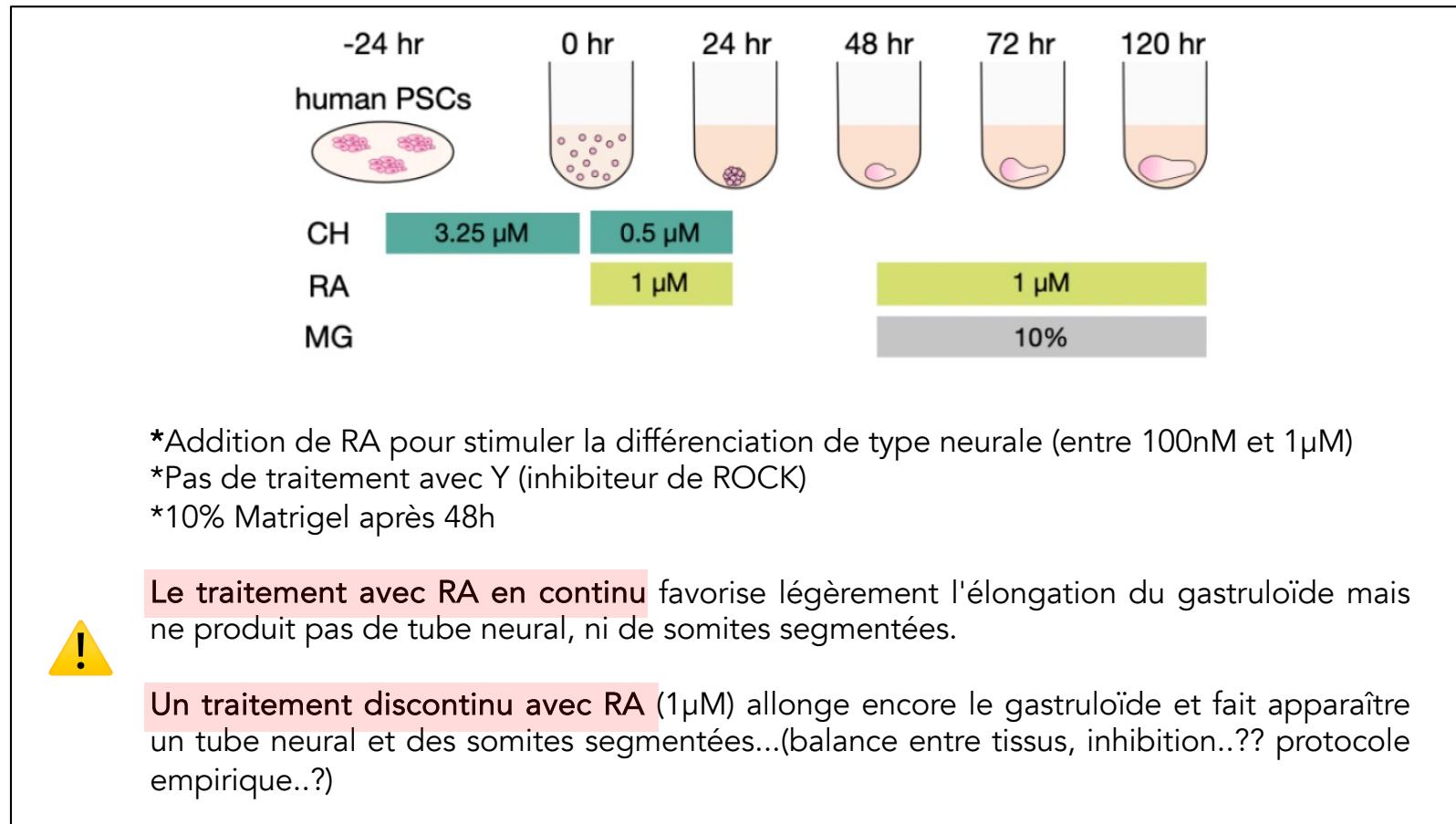
Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>,  
Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>,  
Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

Nouveau protocole



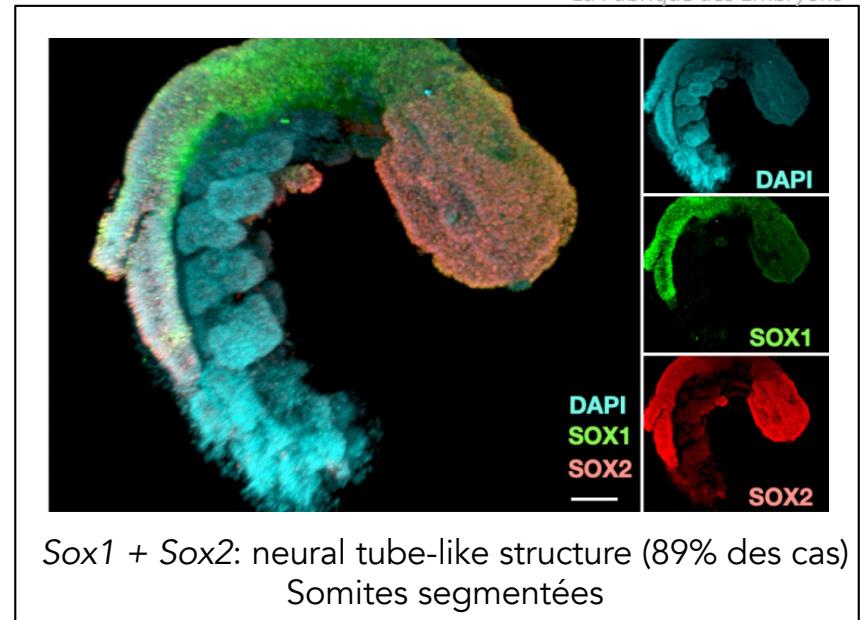
# Gastruloides humains; protocole avec RA

> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

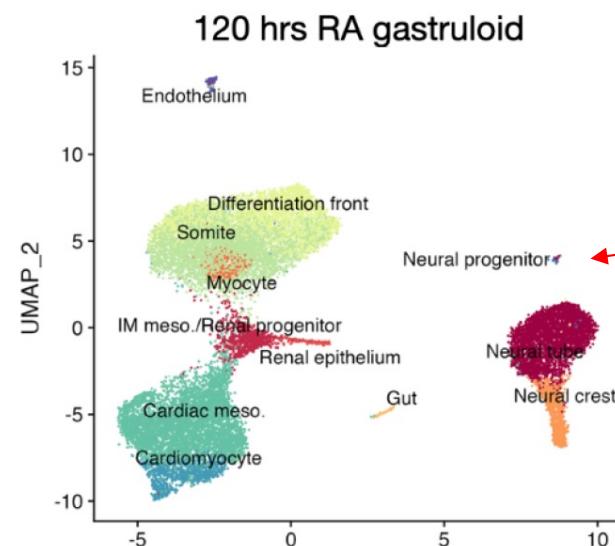
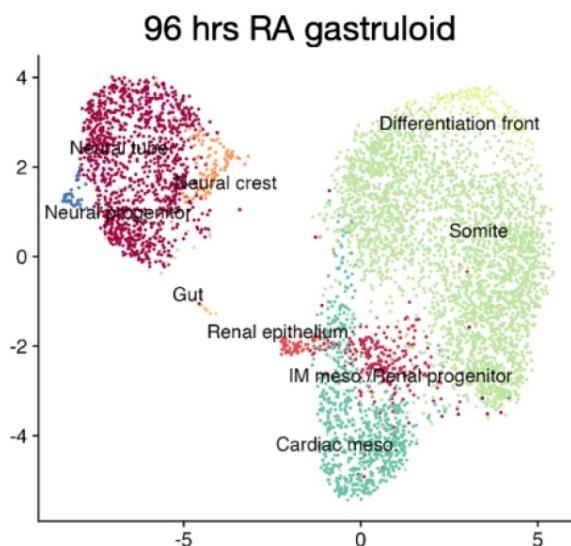
## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>, Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>, Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

\*Les gastruloides se développent jusqu'à 120h avec des structures non observées chez les gastruloides humains poussés sans RA.



### Analyses par scRNA-seq



\*Des types cellulaires apparaissant à 96h sont 'renforcés' à 120h (crête neurale, tube neural..), avec l'apparition de quelques cellules progénitrices neurales

# Gastruloides humains; protocole avec RA



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>,  
Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>,  
Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

Conclusion (une des...):

Overall, these results show that human RA-gastruloids mature to a more advanced stage than previously described mammalian gastruloid models, roughly approaching the equivalent of mouse E9.5-E10.5. However, this greater progression may be accompanied by desynchronization with *in vivo* development, presumably due to the coarser signaling environment, lack of extra-embryonic cues, and other factors.

\*Ces gastruloides avec traitement RA se développent jusqu'à 120h avec des structures qui indiquent clairement un stade de maturation plus avancé que les gastruloides 'conventionnels'. A ce stade, ils correspondent à peu près à des embryons de souris entre E9.5 et E10.5, ou à des embryons humains proches de CS 11 (23-26 jours, 3.5mm), comparé au CS 9 (19-21 jours, 2mm) des gastruloides conventionnels. Toutefois, ces estimations sont rendues difficiles par l'hétérogénéité des différents stades de différents tissus et types cellulaires trouvés dans les gastruloides RA...

# Les voies de signalisation BMP (TGFbeta)



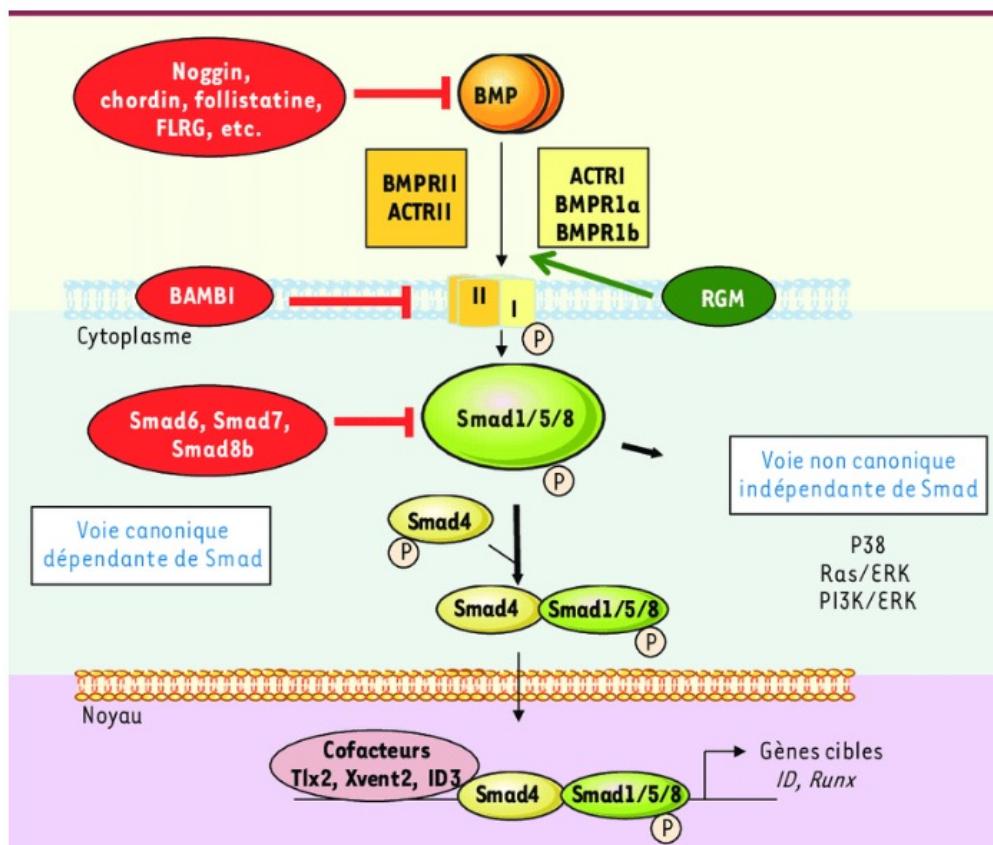
COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons



médecine/sciences 2012 ; 28 : 416-22

> Dans le contexte normal, les bone morphoge-



\*Les BMPs (dimères) agissent par l'intermédiaire de récepteurs (tétramères) induisant des cascades de phosphorylation de protéines 'Smad' qui vont rentrer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles.

# Gastruloides comme objets d'études (exemple)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

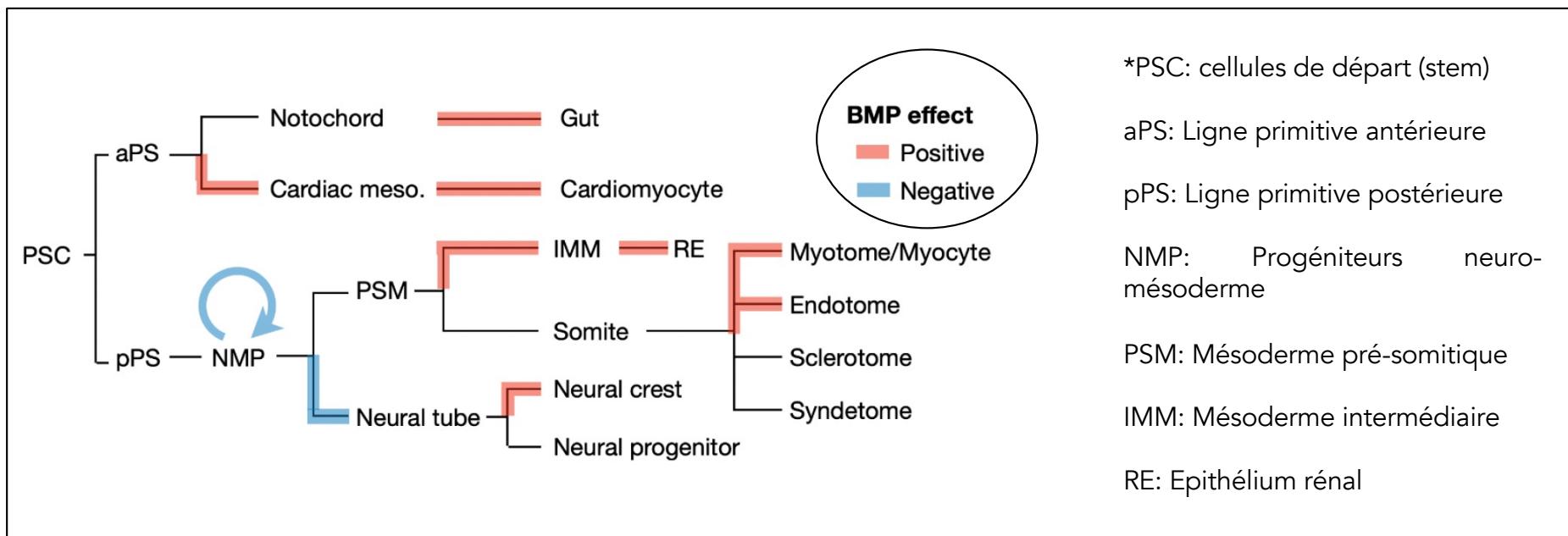
> bioRxiv [Preprint]. 2024 Feb 12:2024.02.10.579769. doi: 10.1101/2024.02.10.579769.

## Induction and *in silico* staging of human gastruloids with neural tube, segmented somites & advanced cell types

Nobuhiko Hamazaki <sup>1 2</sup>, Wei Yang <sup>1</sup>, Connor Kubo <sup>1</sup>, Chengxiang Qiu <sup>1</sup>, Beth K Martin <sup>1</sup>,  
Riddhiman K Garge <sup>1 3</sup>, Samuel G Regalado <sup>1 4</sup>, Eva Nichols <sup>1</sup>, Choli Lee <sup>1</sup>, Riza M Daza <sup>1</sup>,  
Sanjay Srivatsan <sup>1 4</sup>, Jay Shendure <sup>1 2 3 5</sup>

\*La signalisation par les BMPs (TGFbeta-like) est très importante pendant le développement, en particulier pour la ségrégation des linéages cellulaires et leur maintenance.

\*Utilisation des gastruloides pour étudier les effets variés des BMPs, soit après traitement avec du BMP4, soit après l'utilisation d'un inhibiteur de BMPs (LDN 193189), dès 48h.



# Importance du RA dans le développement précoce

## Comment contrôler le temps, l'endroit et la dose?

\*Des mutations provoquant des surplus ou des manques de RA pendant cette période embryonnaire produisent des effets tératologiques variés, selon les doses et l'âge des embryons chez les rongeurs.

\*Contre-indication absolue des crèmes pour la peau (acné etc) à base de rétinol/RA pour les femmes enceintes.

Accutane, 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), entered the U.S. market in 1982 for the treatment of severe cystic acne. In 1985, Lammer *et al.* reported the findings of the first prospective study that clearly defined its high teratogenic potency.

Risks associated with human exposure to the therapeutic dose during embryogenesis were reported to be 40% for spontaneous abortion, 4-5% for perinatal mortality, 16% for premature birth, and 25% for major malformation.

This striking teratogenic potency was not anticipated, because earlier as well as later research documented that in rodent models, isotretinoin had lower teratogenic potency than all-trans-retinoic acid and other retinoids"

Références : Lammer *et al.*, 1985 (Isotréтиnoïne: Accutane®)  
deDie-Smulders *et al.*, 1995 (Acitretin)  
Revue : Adams, Birth Defects Research, 2010

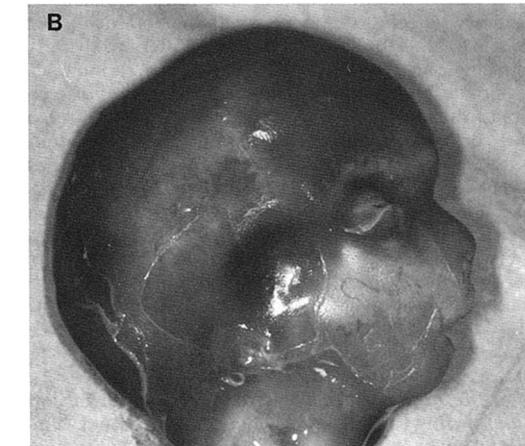


Fig. 5. A,B: Craniofacial anomalies in the fetus. Underdevelopment of maxilla and mandibula, microtia, and preauricular tags.

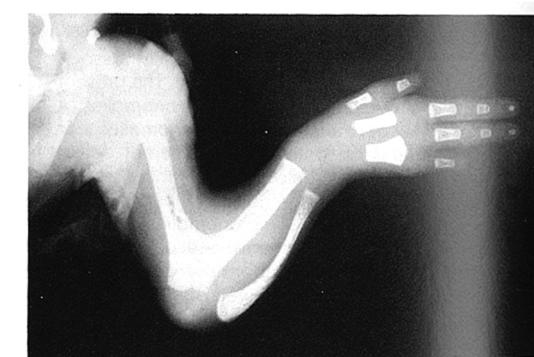


Fig. 3. Radiography of the left arm. Humeroradial synostosis and only four rays in the hands. For further details see text.

# Gastruloides comme tubes à essai (exemple)



COLLÈGE  
DE FRANCE  
1530

Denis Duboule/2024  
La Fabrique des Embryons

Journal of Molecular  
Endocrinology

M Berenguer and G Duester

69:4

THEMATIC REVIEW

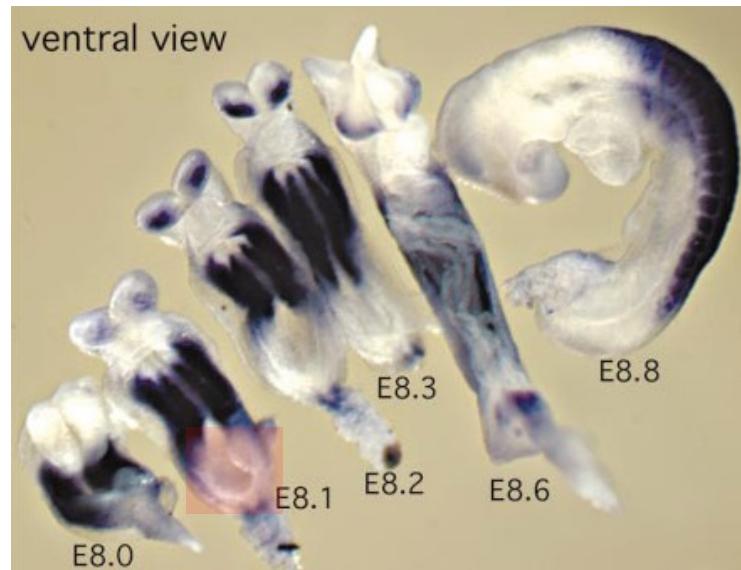
## Retinoic acid, RARs and early development

Journal of Molecular  
Endocrinology  
(2022) 69, T59-T67

Marie Berenguer and Gregg Duester

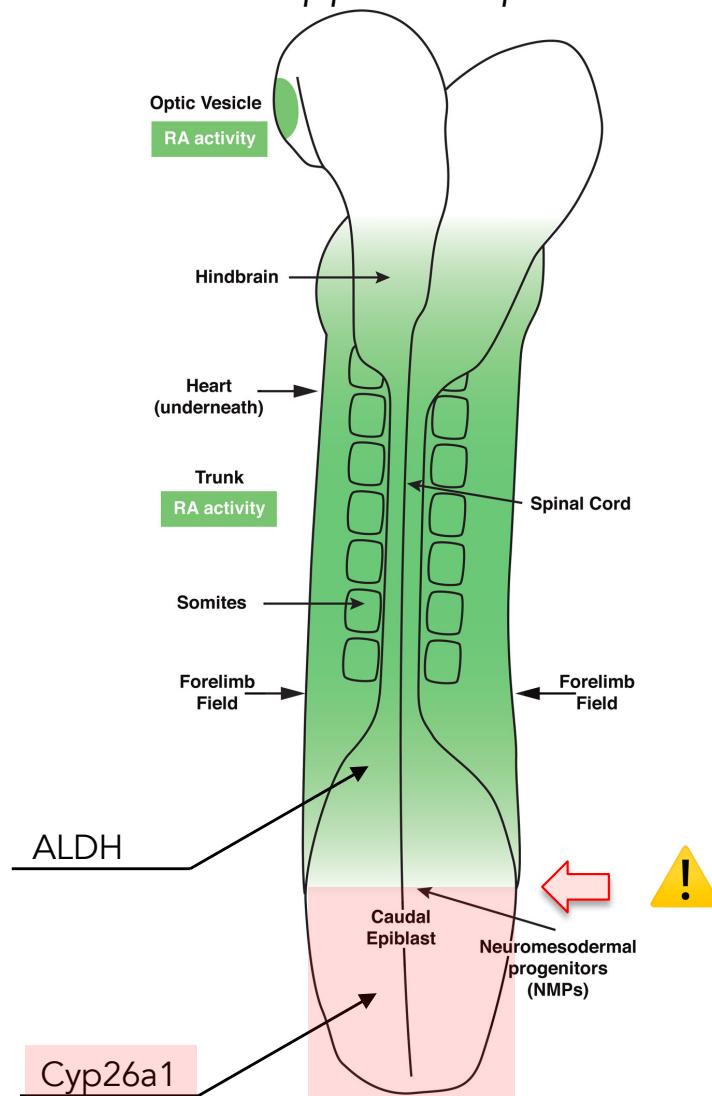
Development, Aging, and Regeneration Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California, USA

\*Le RA est actif principalement dans les régions plus matures du tronc et son action est exclue de la partie contenant les cellules NMPs (souches) et plus généralement de la partie représentée dans la région 'postérieure' des gastruloides... Donc son application devrait intuitivement conduire à une 'maturation' supplémentaire des gastruloides...



RALDH mRNAs, Wagner et al., Dev. Biol., 2000

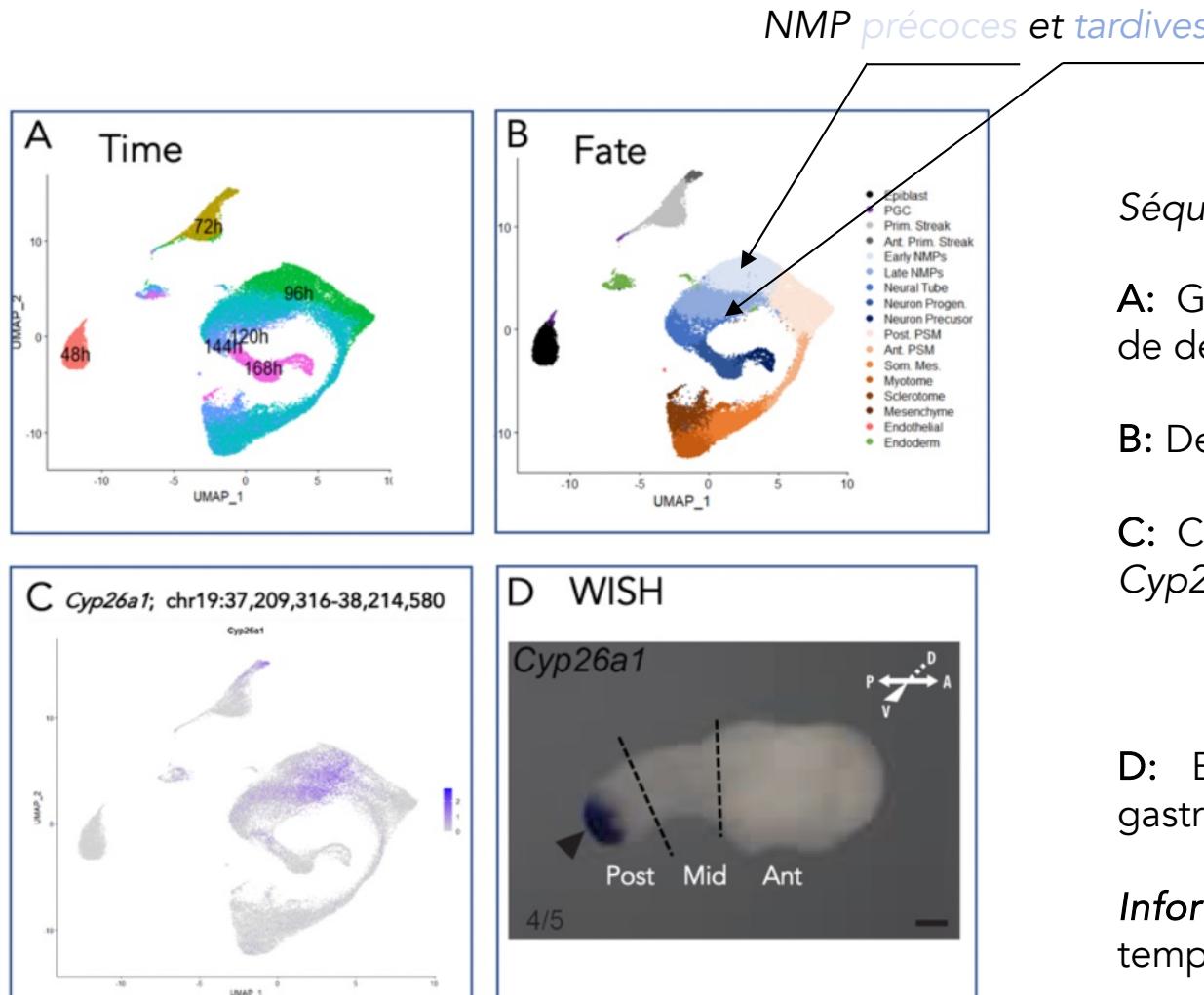
Importance du RA dans le développement précoce



# Gastruloïdes comme tubes à essai (exemple)

Régulation critique du gène *Cyp26a1*, en particulier de sa limite d'expression A-P

Les NMPs doivent être protégées de l'acide rétinoïque...



Séquençage d'ARNs en cellules uniques

**A:** Groupement des cellules par stades de développement des gastruloïdes.

**B:** Destins des groupes de cellules.

**C:** Cellules positives pour les ARNs de *Cyp26a1*.

**D:** Expression de *Cyp26a1* dans un gastruloïde de 120h (NMPs)

**Informations** sur la \*dynamique temporelle et les types cellulaires...

ATAC-seq: Mesure de l'accessibilité de la chromatine par l'effet (ou non) d'une activité enzymatique enzyme coupant l'ADN couplée au transposome Tn5... Le transposome fragmente l'ADN accessible et y transfère ses 'étiquettes'... utilisée pour l'amplification et la séquence.

## L'approche ATAC globale (X milliers-ions de cellules)



in Molecular Biology

2015

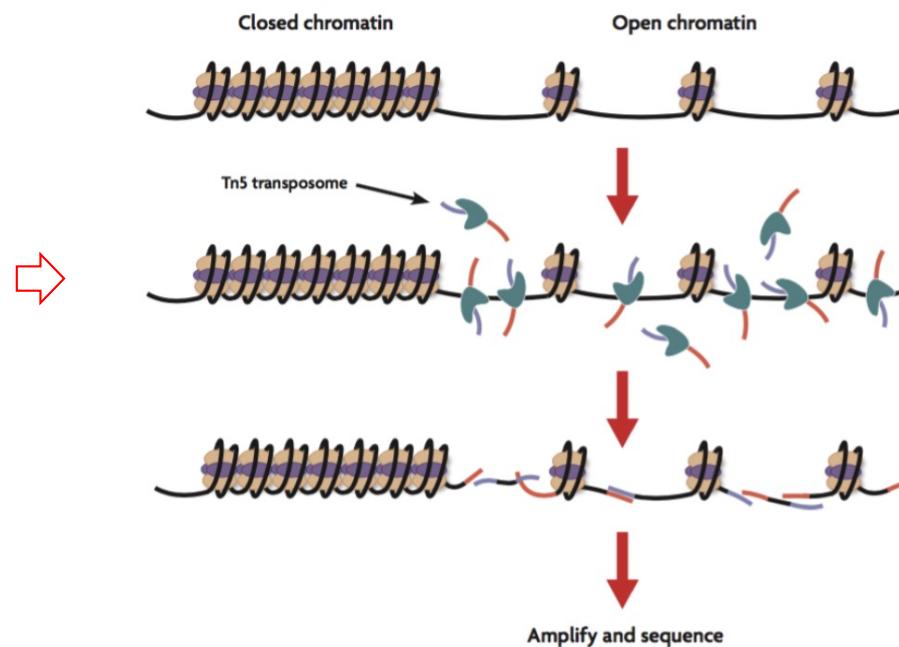
UNIT

### ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide

Jason D. Buenrostro, Beijing Wu, Howard Y. Chang, William J. Greenleaf

First published: 05 January 2015 | <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109> | Citations: 1,512

L'approche **ATACseq** mesure l'accessibilité à la chromatine, donc les endroits 'actifs' (là où des facteurs sont déposés, ou où la chromatine est modifiée etc..)

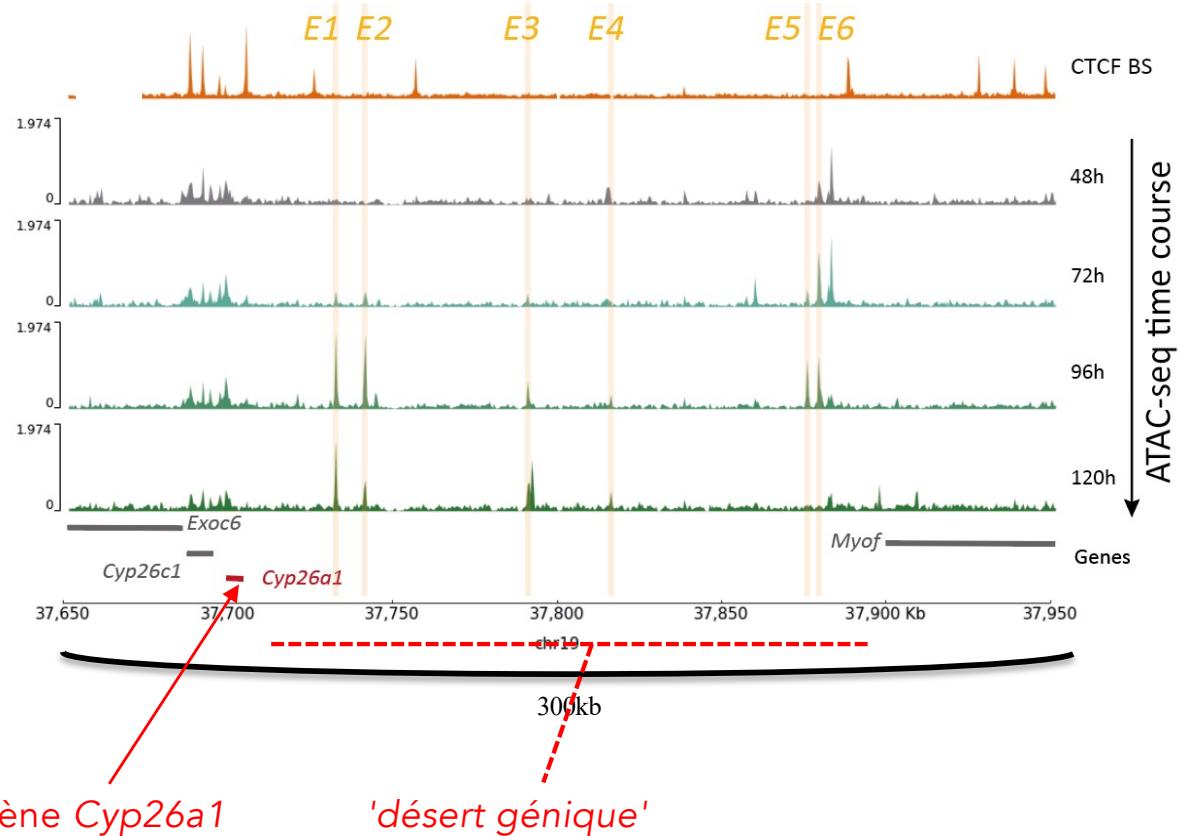
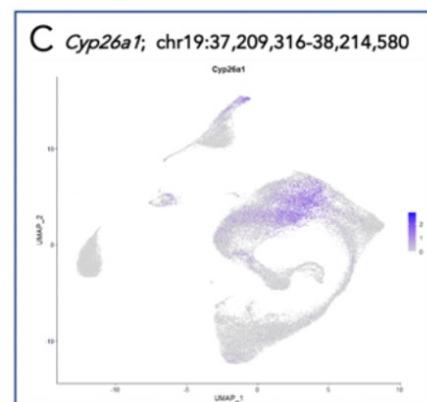
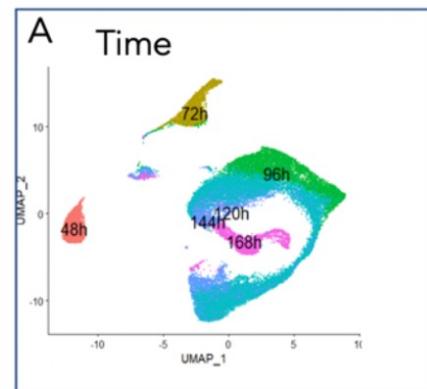


# Gastruloïdes comme tubes à essai (exemple)

Séquences d'ADN candidates pour la régulation de *Cyp26a1* (enhancers, ATAC-seq)  
Les pics indiquent les endroits de l'ADN où celui-ci est 'accessible' (ouvert, fonctionnel...)

\*Analyse temporelle des pics ATACs.

\*Certains pics apparaissent aux mêmes stades que les ARNs, ce qui suggère la présence d'une séquence de régulation (enhancer, exemple la séquence E2)



# Gastruloïdes comme tubes à essai (exemple)

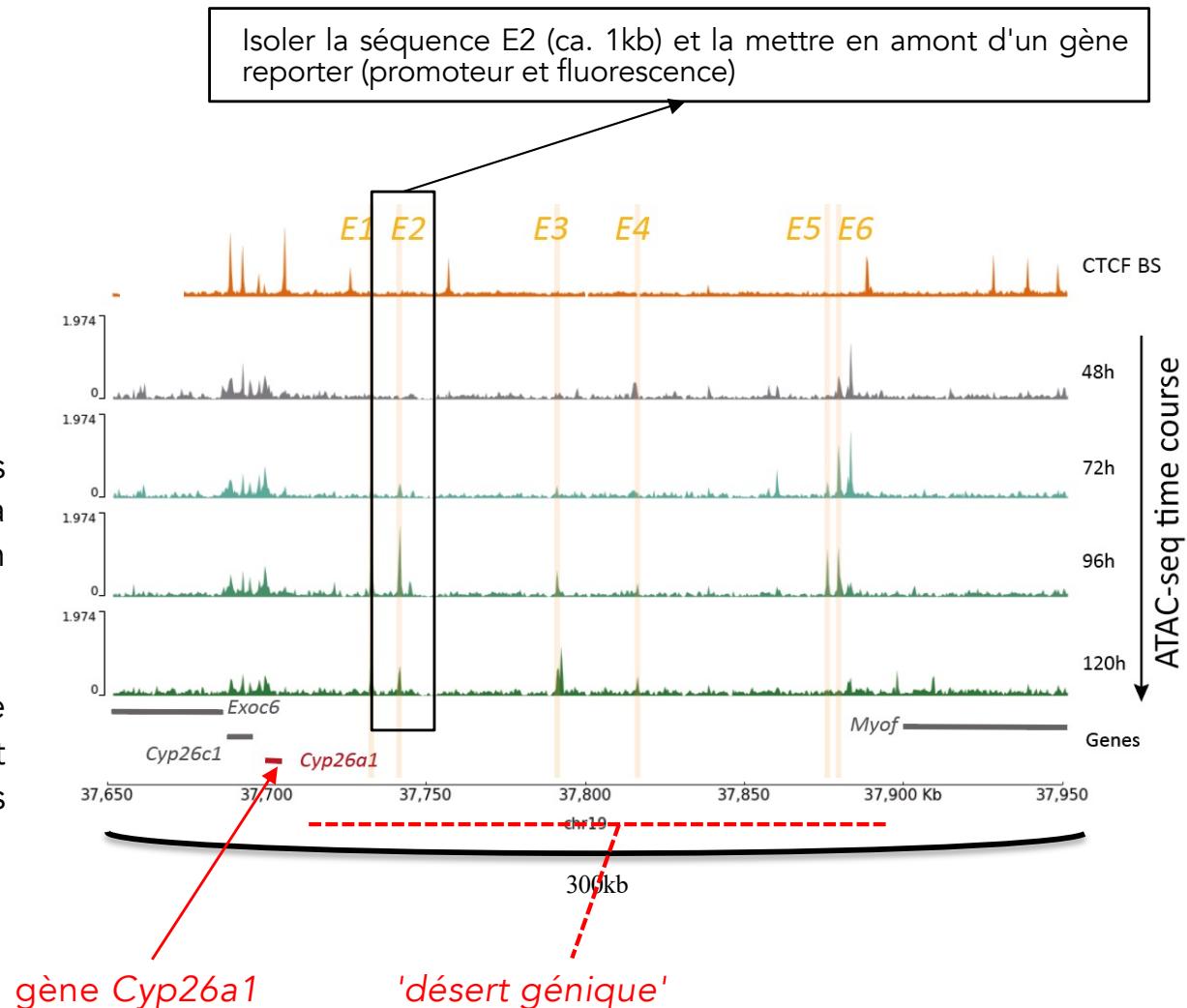
Séquences d'ADN candidates pour la régulation de *Cyp26a1* (enhancers, ATAC-seq)

Les pics indiquent les endroits de l'ADN où celui-ci est 'accessible' (ouvert, fonctionnel...)

\*Analyse temporelle des pics ATACs.

\*Certains pics apparaissent aux mêmes stades que les ARNs, ce qui suggère la présence d'une séquence de régulation (enhancer, exemple la séquence E2).

\*Tester la potentialité fonctionnelle d'une séquence par un gène reporter introduit dans des cellules ES, puis gastruloïdes etc.



# Gastruloïdes comme tubes à essai (exemple)

Apparition de la fluorescence indiquant les cellules qui ont exprimé le gène rapporteur sous le contrôle de l'enhancer E2.

