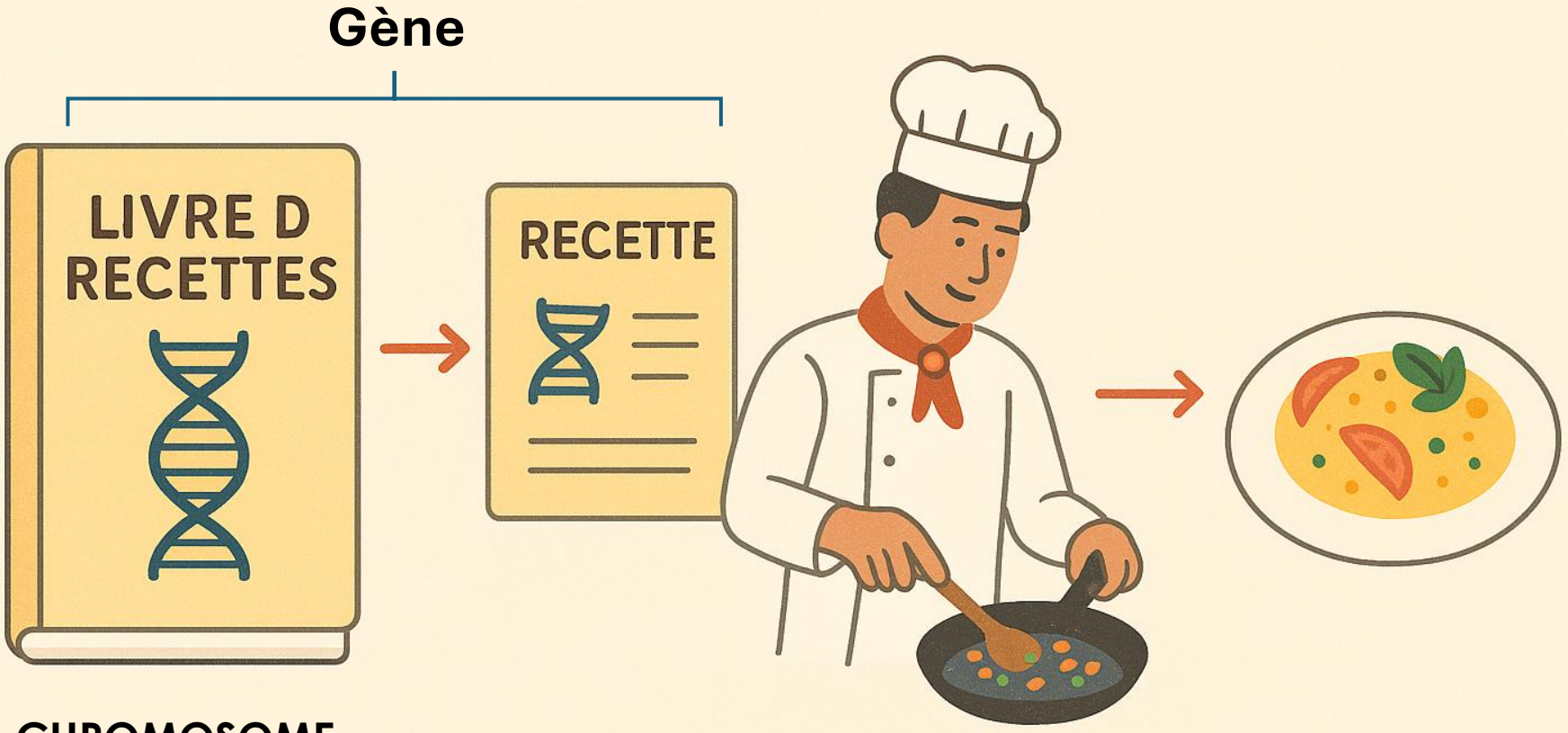
# Programme du 2ème cours

**Objectif** : des connaissances fondamentales sur l'embryogénèse à l'application en médecine

1. Rappel des principales notions du cours précédent
2. La notion de cellules souches et leur origine
3. La culture des cellules souches au laboratoire et les organoïdes via la reprogrammation de cellules
4. L'utilisation des organoïdes en médecine personnalisée
5. Autres méthodes de médecine personnalisée/de précision
6. Questions éthiques autour de ces orientations

# *Rappels du cours précédent*

# La logique du flux génétique : ADN → ARN → protéine




**CHROMOSOME / ADN**
**Chez l'homme 20.000 gènes /pages**

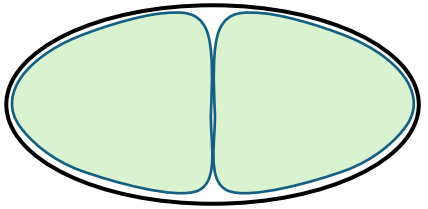
**TRANSCRIPTION → ARNmessager**

**TRADUCTION (ribosome/ code génétique)**

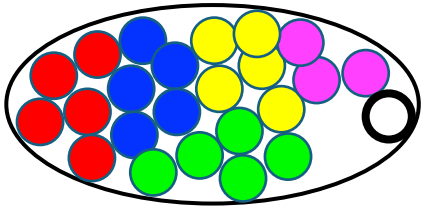
**PROTéINE**

# Quelques grands principes dans l'élaboration d'un embryon

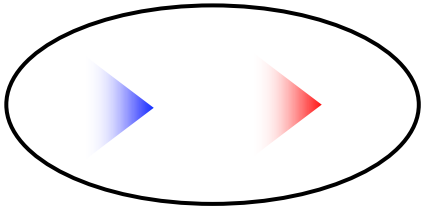
1 . De la *fécondation* aux premières *divisions*



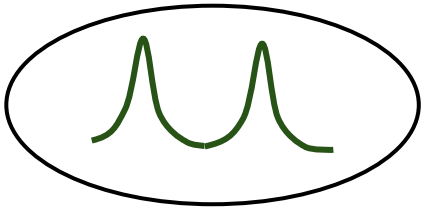
2 . Multiples cellules /*différentes identités*



3 . Communication



3a. Régionalisation et Polarisation



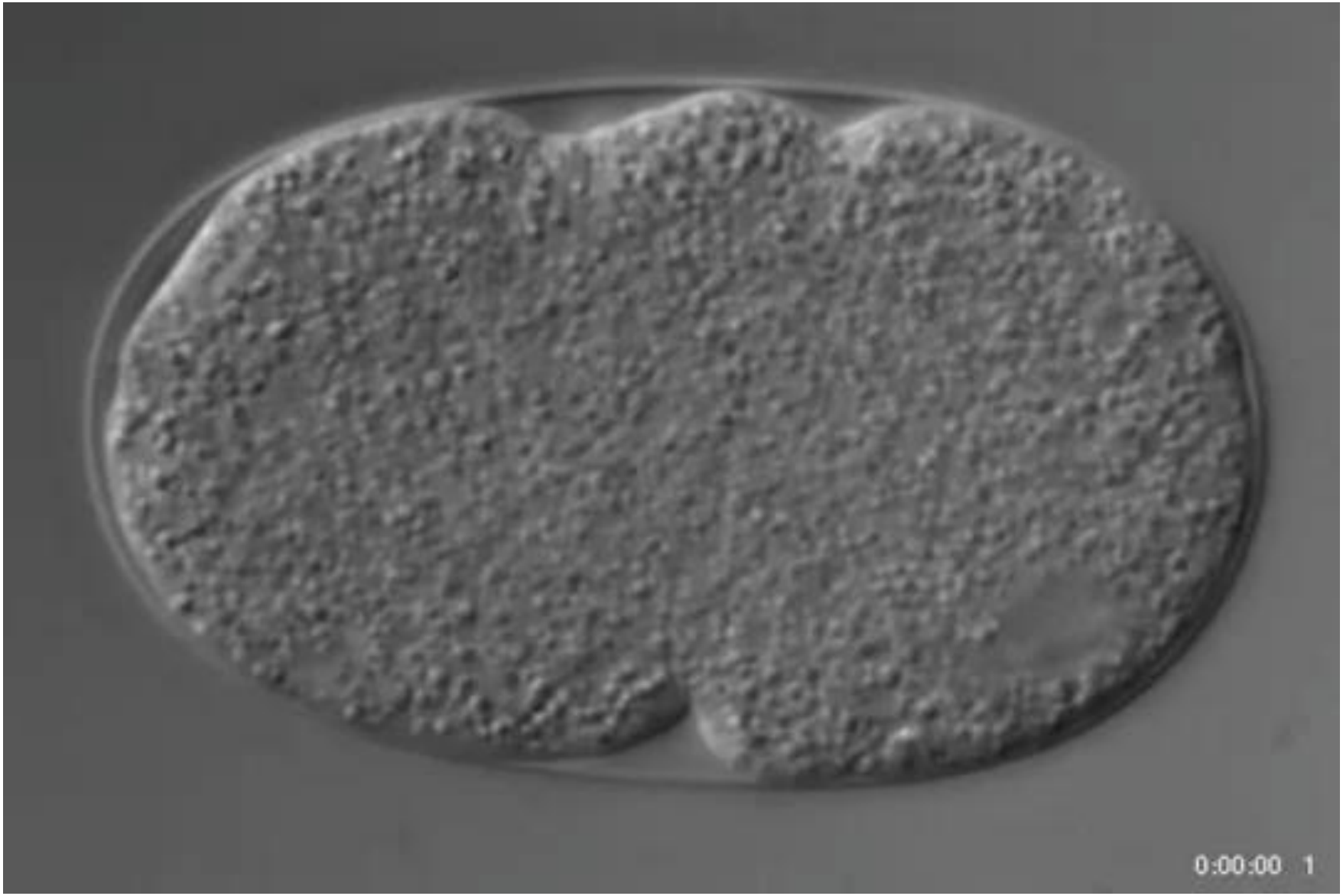
3b. Ordre des processus



4. Organisation (morphogenèse)

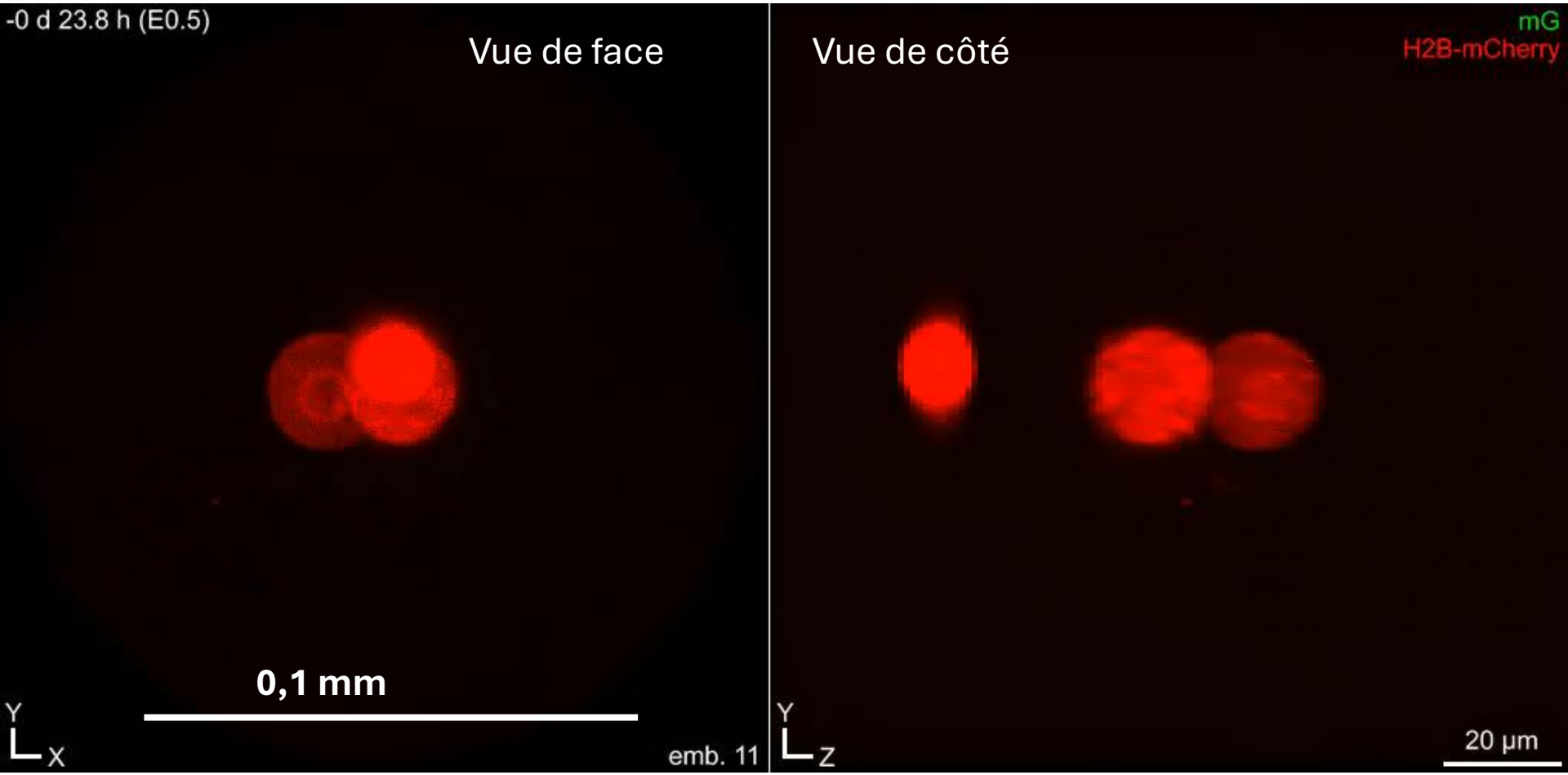
# La première division

La première division d'un embryon du nématode *Caenorhabditis elegans* après fécondation

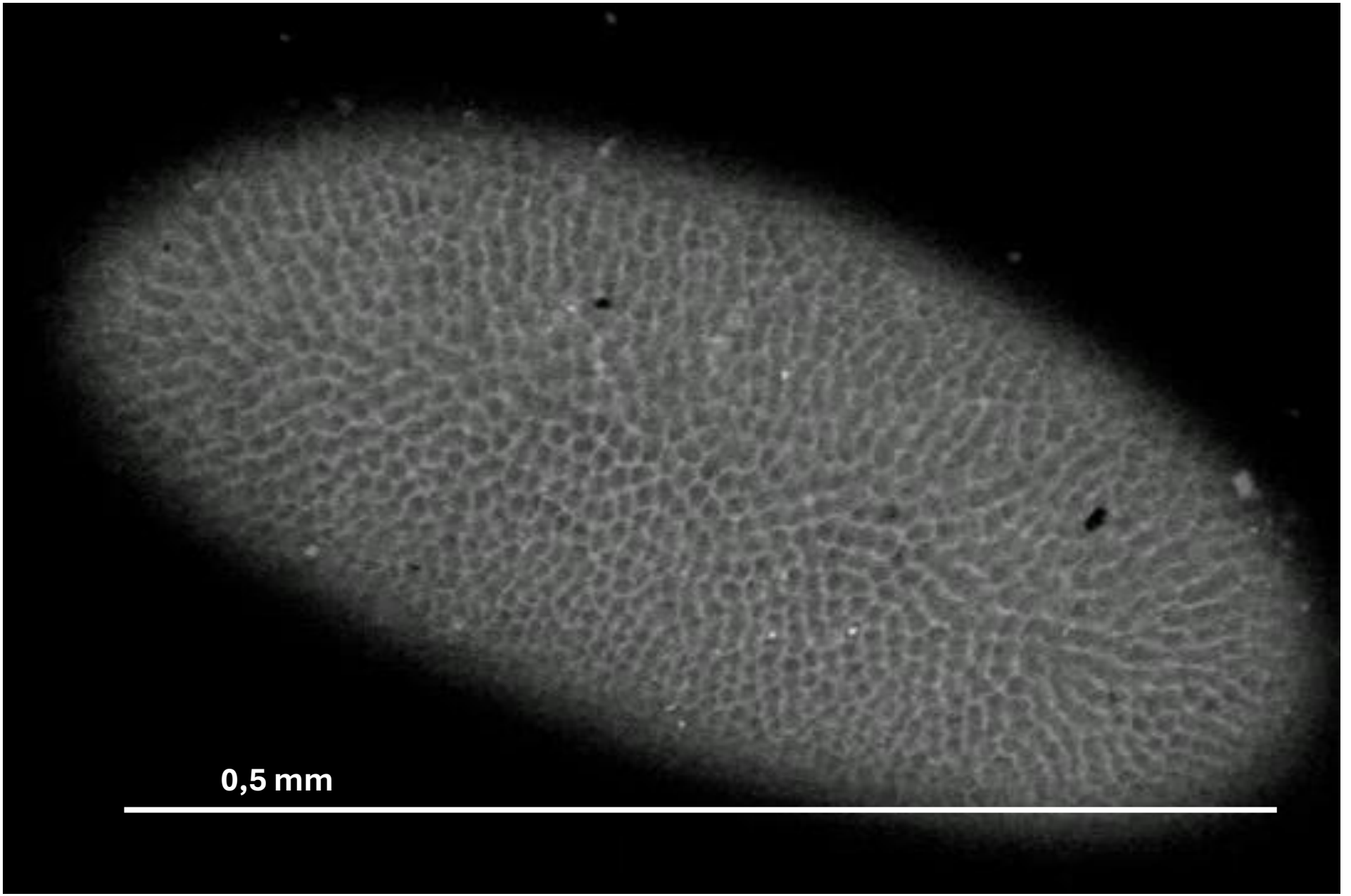


# L’apparition de cellules aux destinées distinctes est précoce

Jeune embryon de souris
Film de 30 h ; de 16 à 64 cellules



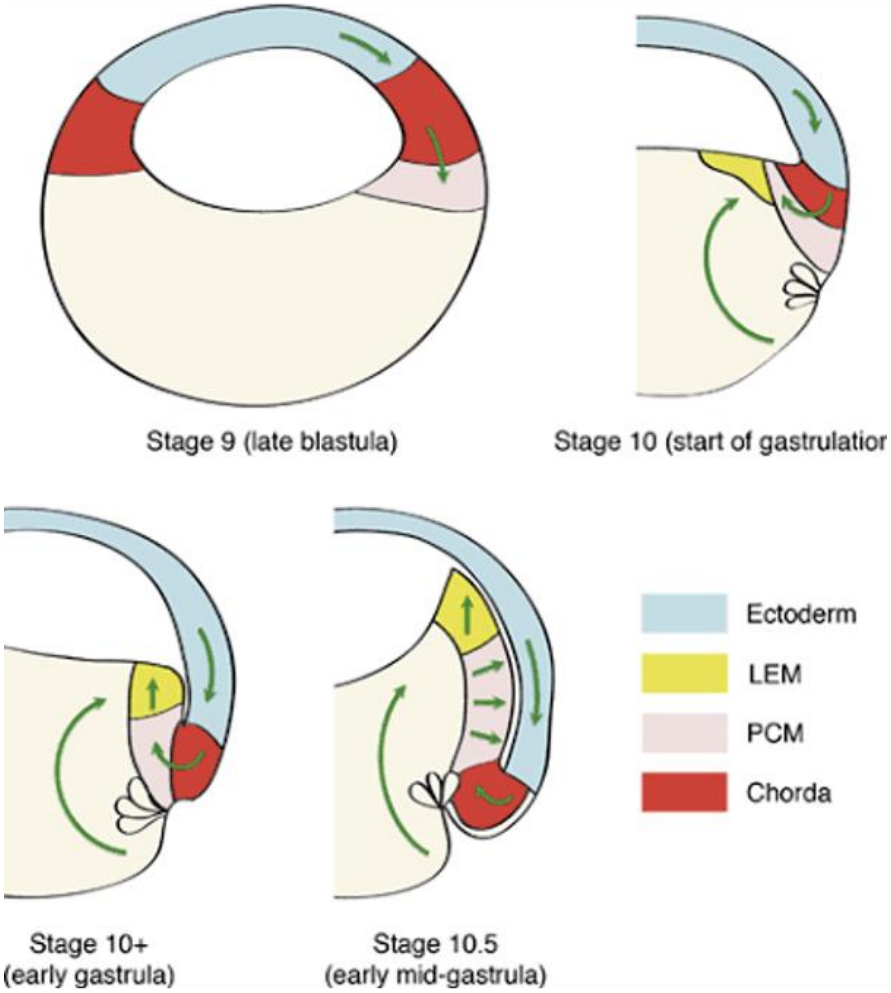
# L’évènement le plus important de notre vie : la gastrulation

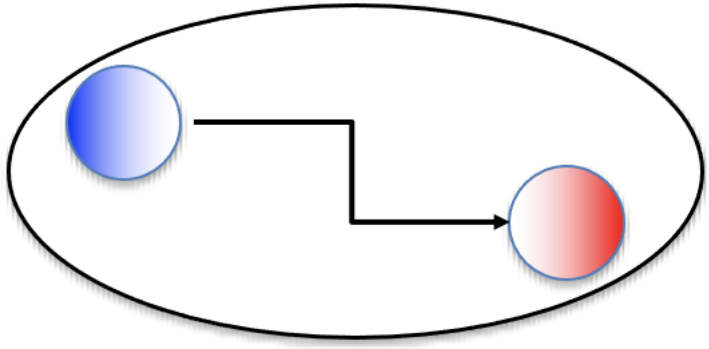


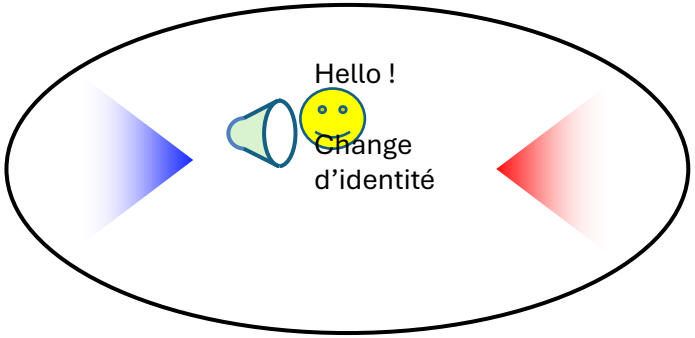
# L’évènement le plus important de notre vie : la gastrulation

**Embryon du crapaud africain *Xenopus laevis***
(environ 9h après la fécondation – film d’environ 15h)

# Gastrulation et migration : les cellules se déplacent et envoient des signaux





# La notion de voie de signalisation

**Visiteur**



**Sonnette**



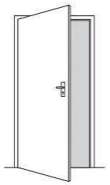
**Fil électrique**



**Amplification**

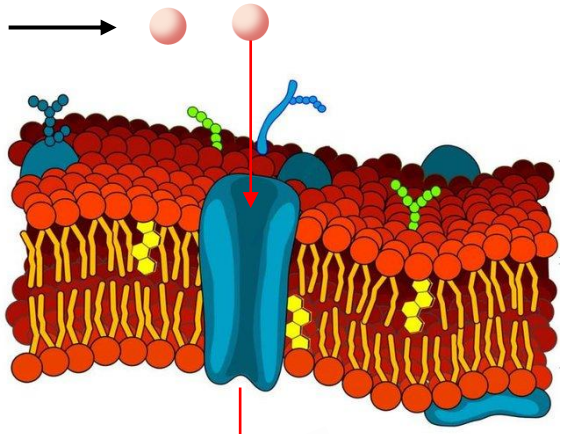


**Réponse : ouverture porte**



**Hormone**

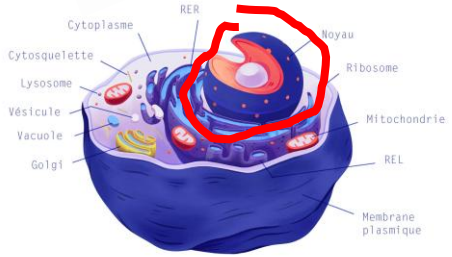
**Membrane cellule**



**Relais**



**Amplification**




**Réponse cellulaire/ générale**

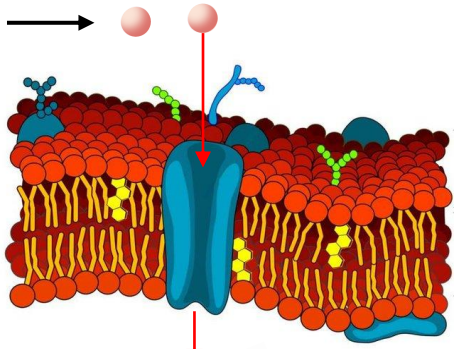
Par exemple :

- changement métabolique
- changement de destinée

# L'activité d'un gène

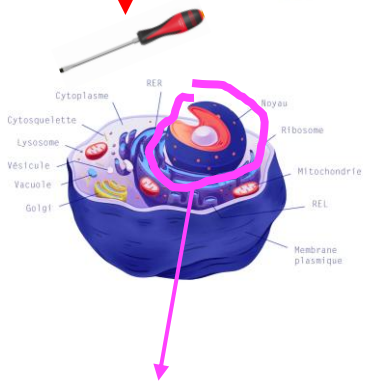
**Signal = Protéine**

**Membrane cellule**



**Relais**

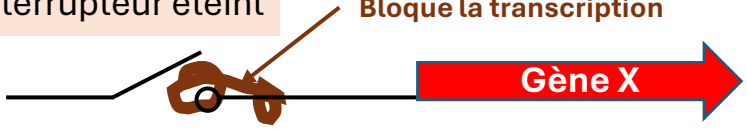
**Amplification**




Le signal rend des facteurs de transcription spécifiques actifs

Interrupteur éteint

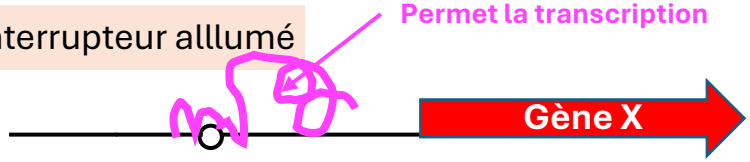
Bloque la transcription




Pas de protéine

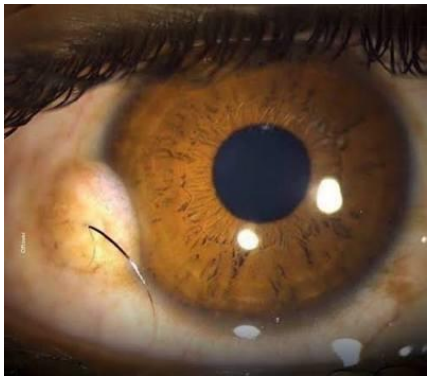
Interrupteur alllumé

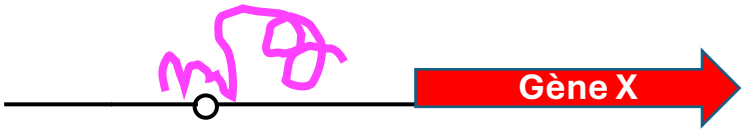
Permet la transcription



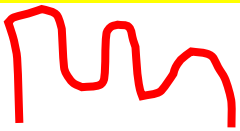

Protéine X produite





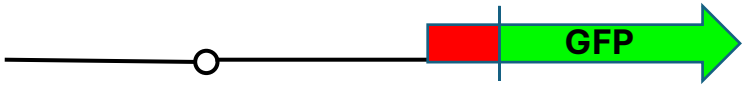



Protéine X produite



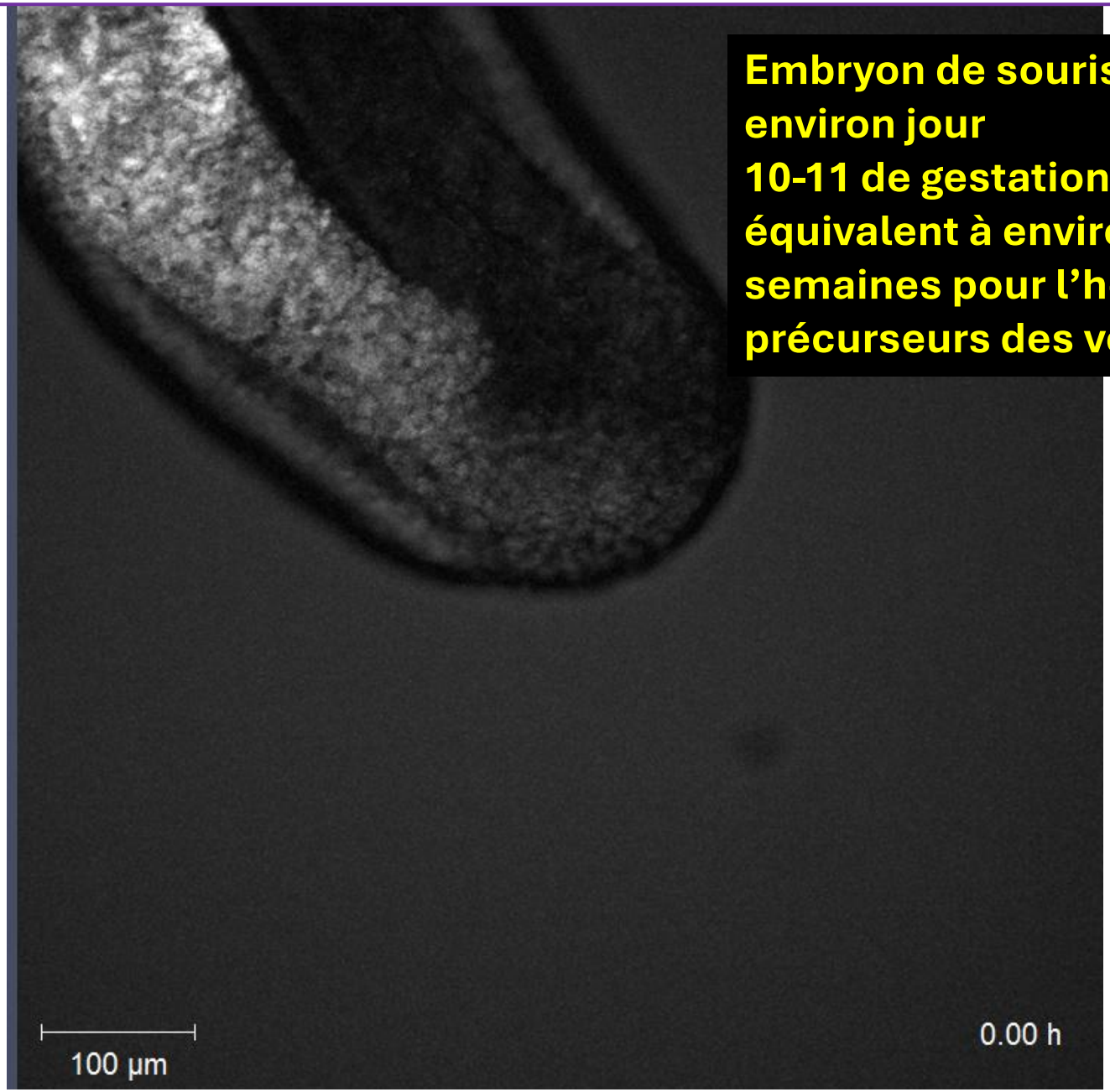
Méduse






Cellule verte

# La morphogenèse : notre colonne vertébrale




**Embryon de souris à environ jour 10-11 de gestation, équivalent à environ 3 semaines pour l'homme : précurseurs des vertèbres**

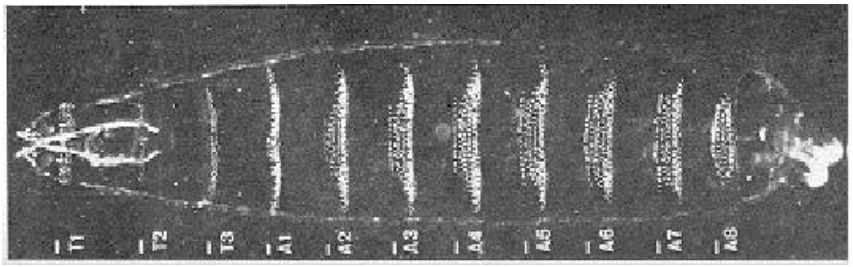
# Deux signaux très importants




Courtesy of American Philosophical Society, Curt Stern Papers. Noncommercial, educational use only.

Gène "***wingless***" – sans ailes






Gène "***hedgehog***" – hérisson




Chez l'homme les équivalents sont appelés :

***Wnt*** ***Sonic hedgehog*** ou ***Shh***

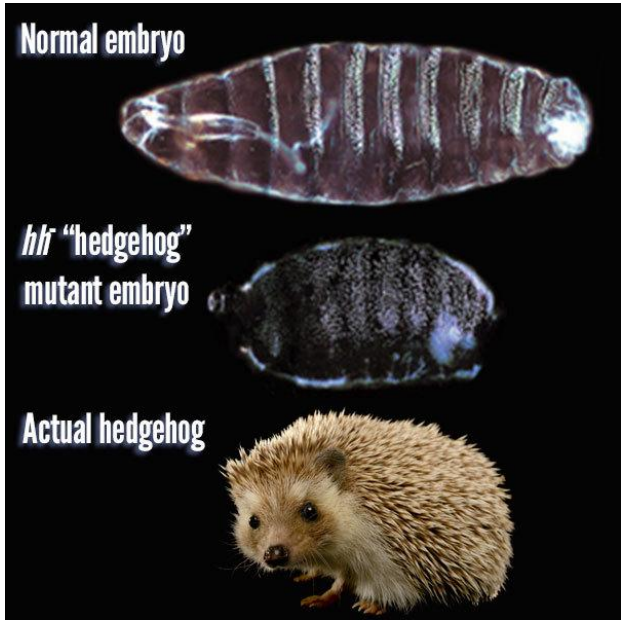
Dans l'embryon : *Wnt* est important pour permettre à l'endoderme et l'intestin d'émerger

Shh est important pour permettre à l'ectoderme d'emerger

Chez l'adulte : Si Wnt est trop actif cancer colorectal

Si Shh est trop actif médulloblastome et cancer de la peau

# Le cyclope








1 naissance sur 100.000

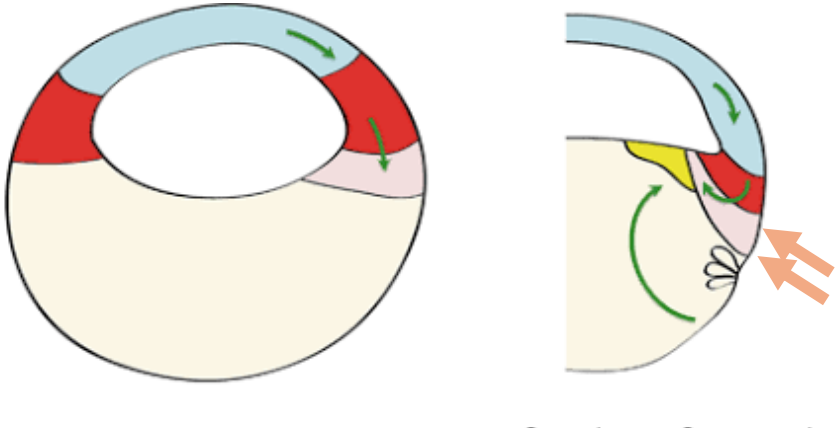
**Les** mutations
chez l'équivalent humain de ce gène sont associées à de graves malformations
et les mutations
affectant des composants de la voie de signalisation en aval de Hh/hérisson
entrainent des cancers de la peau
et/ou un médulloblastome



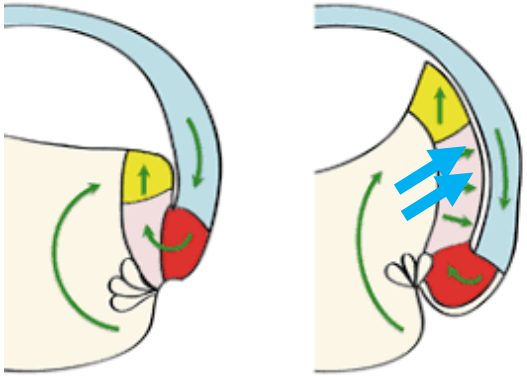


# *Les cellules souches*

# La gastrulation, source de signaux à l'origine des organes



**Les trois feuillets :**
Ectoderme : peau, système nerveux
Mésoderme : muscles, cœur, rein, os
Endoderme : organes respiration et digestion

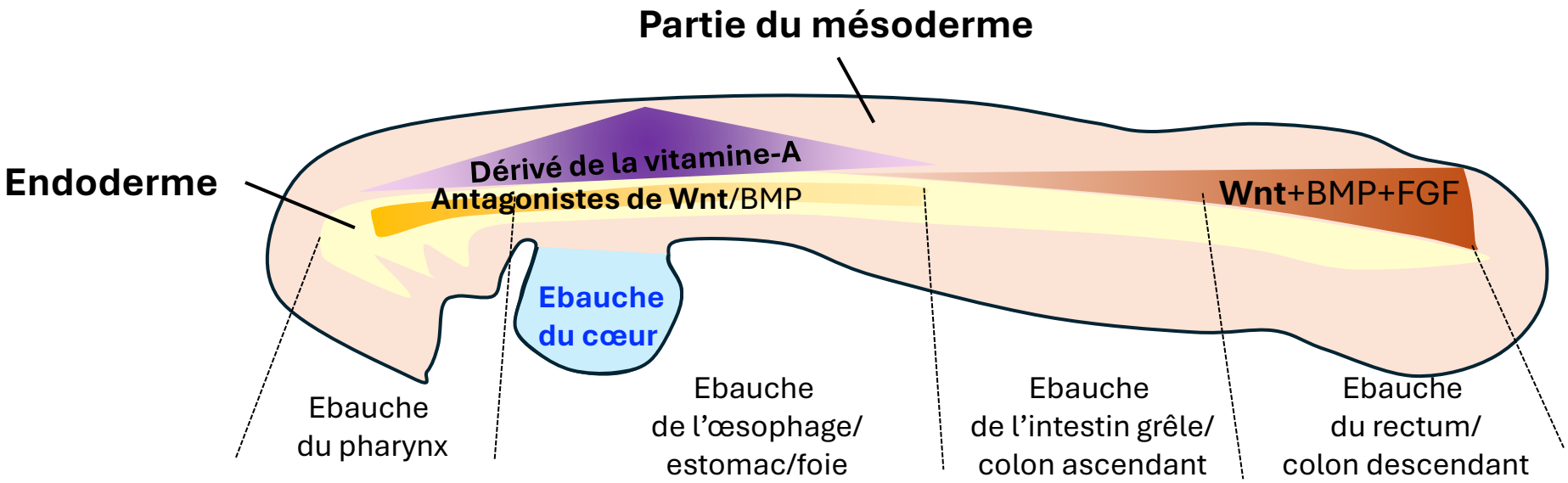


Signaux émis au moment où les cellules s'invaginent à l'intérieur de l'embryon

Signaux émis entre les feuillets

La **nature** des signaux reçus, leur **durée** définit quel sous-type d'organe se développera à une position donnée

# La gastrulation, source de signaux à l'origine des organes

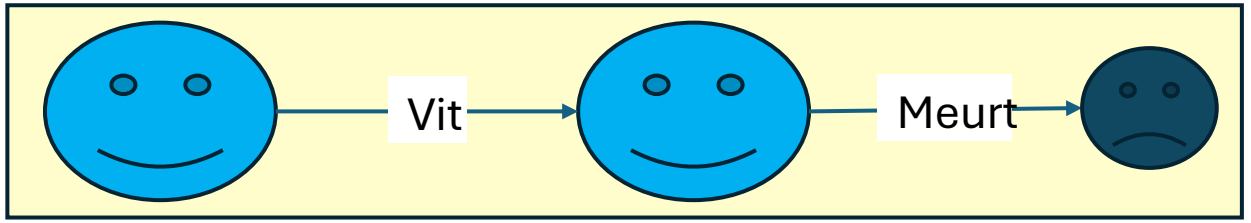



Une variété de signaux et de leurs antagonistes (qui bloquent les précédents) dictent la nature des organes qui vont émerger, par exemple pour l'endoderme

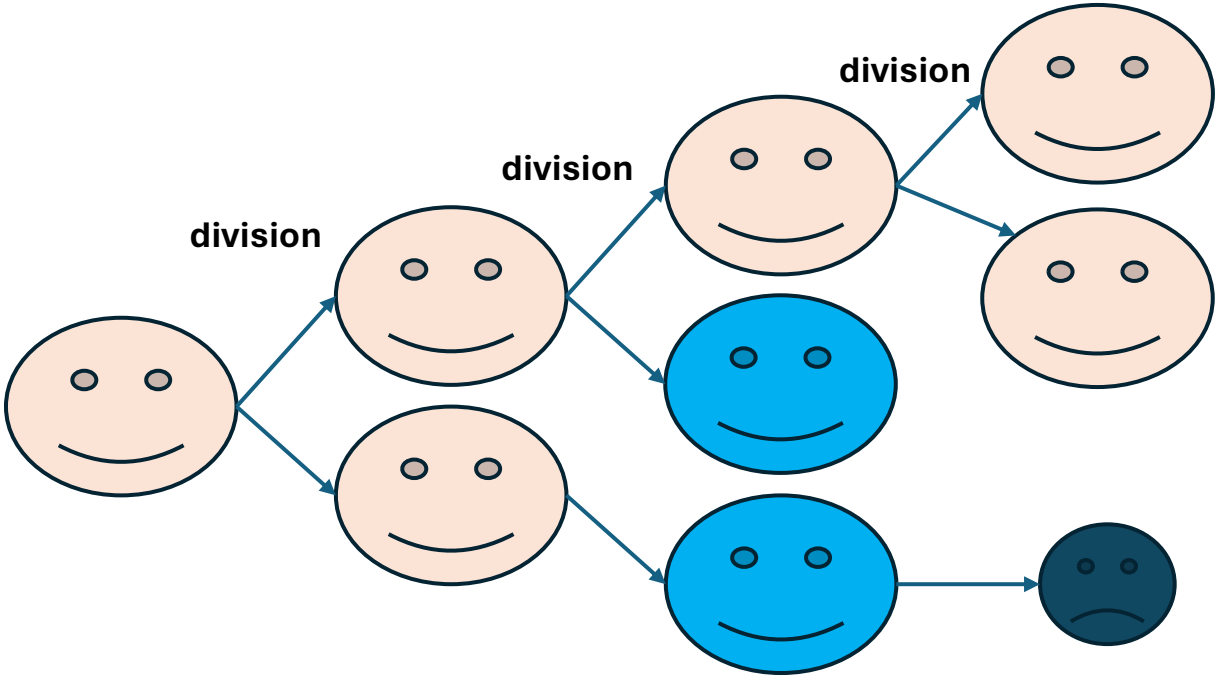
Ces signaux définissent avant tout une petite population de cellules, appelées **cellules souches**, qui vont donner naissance aux organes

# Les cellules souches

**Cellule “standard” dite différenciée**




**Cellule “souche” capable de s’auto-renouveler**



# A propos des cellules souches

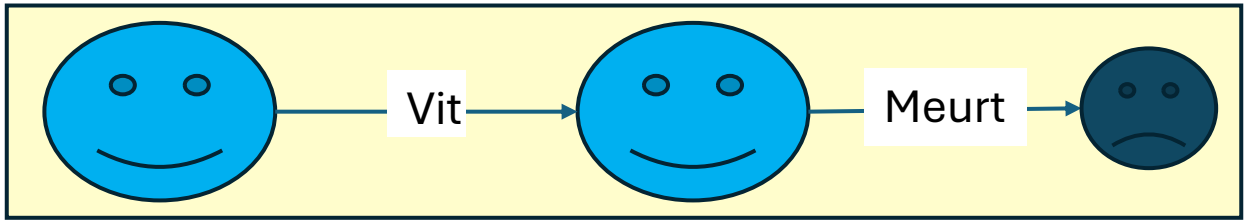
1. **Elles sont à l'origine des organes**

2. **Elles permettent aux organes de se réparer**

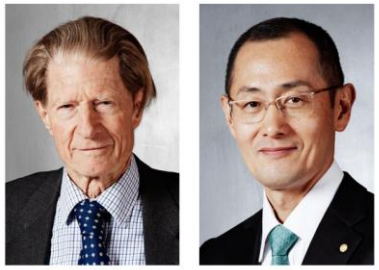
3. **Leur taux de renouvellement est très controllé**

# Les cellules reprogrammées

Cellule “standard”




Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



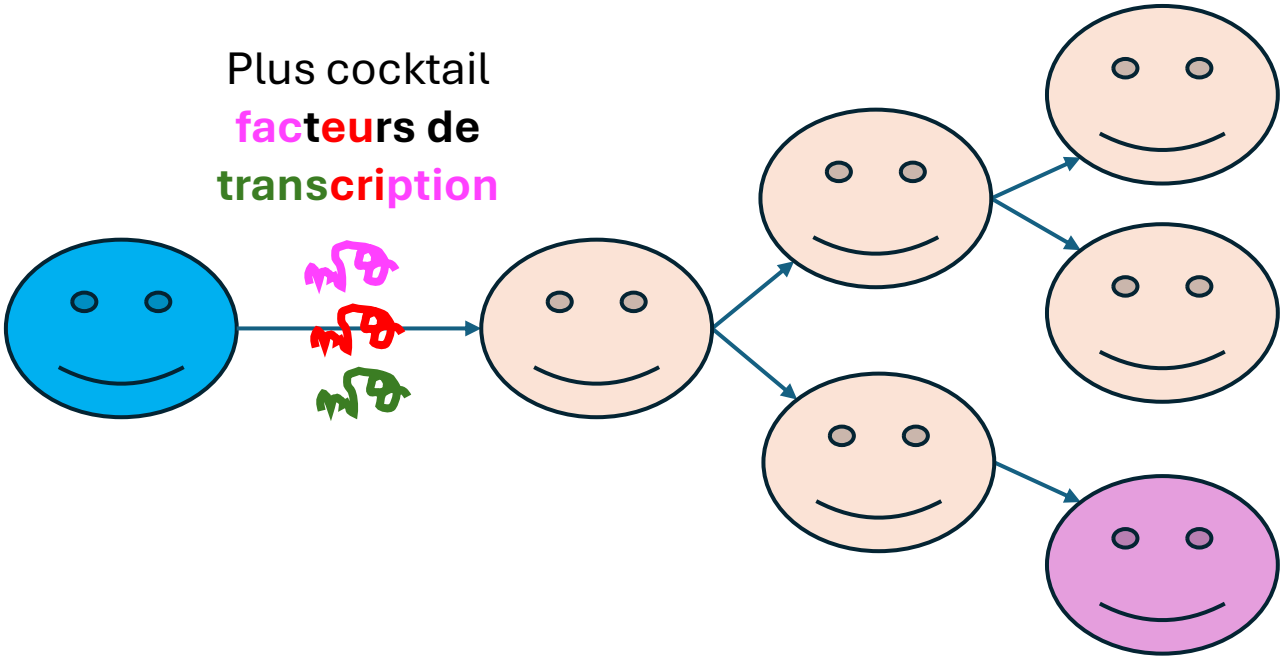
© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Sir John B. Gurdon
Prize share: 1/2



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Shinya Yamanaka
Prize share: 1/2

Cellule “standard” peut redevenir une cellule souche

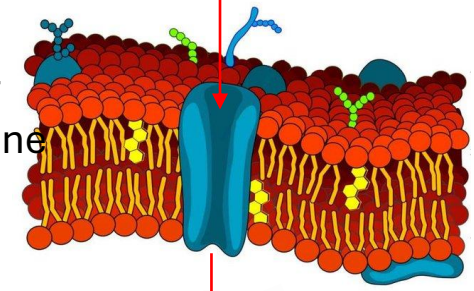
Plus cocktail
facteurs de
transcription



# Le mécanisme d'action de Wnt

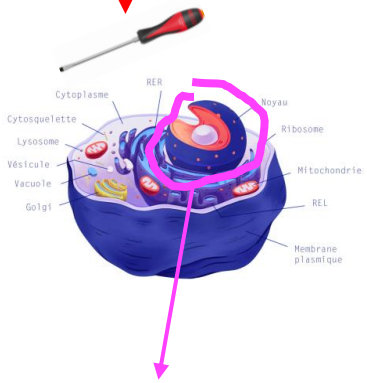
Signal=**Wnt**

Récepteur à la membrane cellule= **Lgr5**



Relais=**APC**

Amplification= **Facteur de transcription**



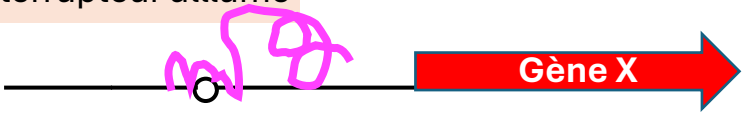

Division des cellules souches

Interrupteur éteint

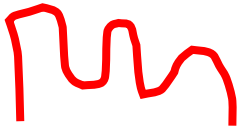


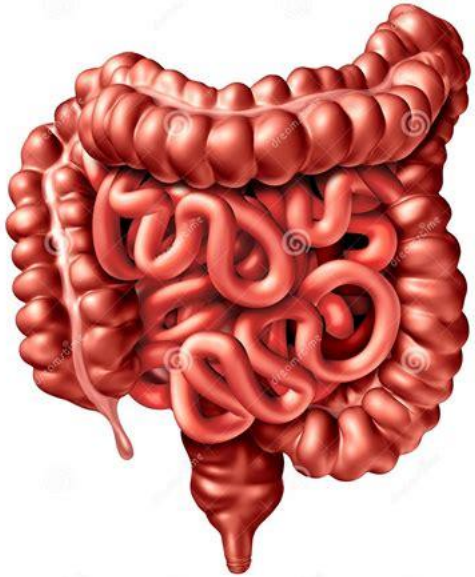

Pas de protéine

Interrupteur alllumé



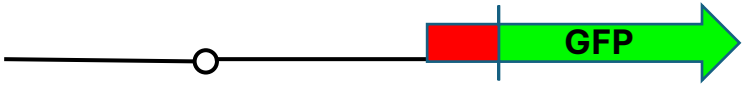

Protéine X produite





Méduse






Cellule souche verte

# *Les organoïdes*

# L’intestin



Hans Clevers



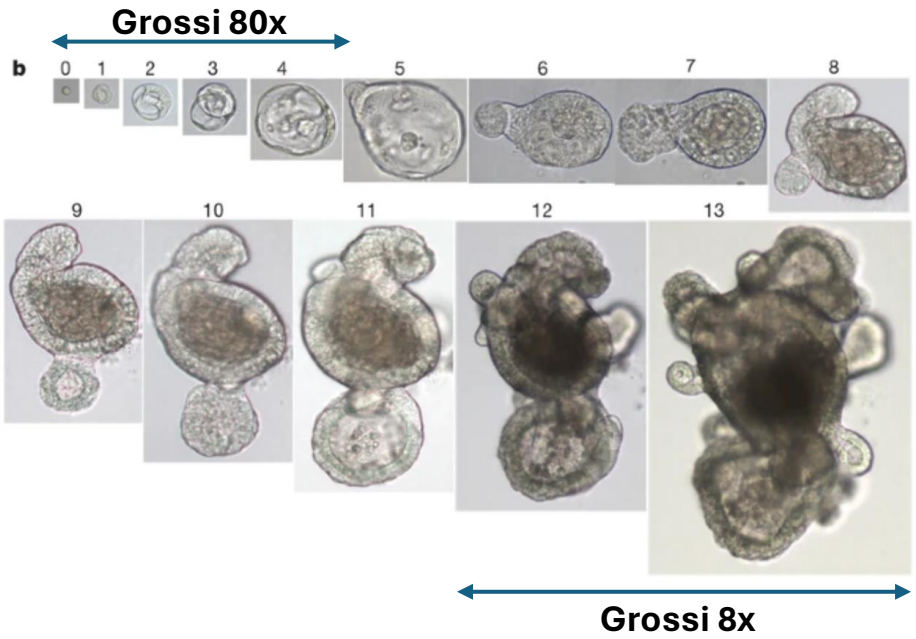



# Le premier organoïde



Hans Clevers

1. Isolation des cellules souches intestinales
2. Incubation avec cocktail adapté de “signaux”
3. Après quelques jours apparition d’un mini-intestin



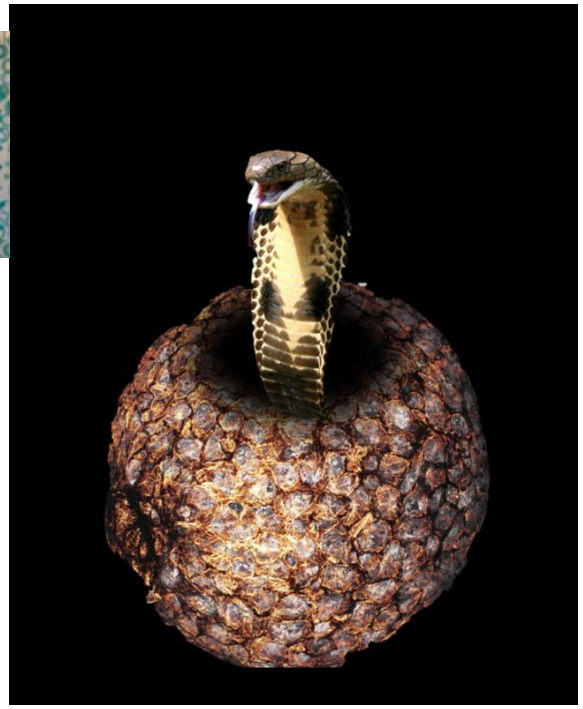



Ce mini-intestin n’est composé que de cellules épithéliales et sécrétrices. Il est dépourvu de cellules immunitaires, nerfs, muscles, vaisseaux sanguins, tout comme de bactéries (microbiote) qu’on retrouve autour d’un intestin normal.

# Les organoïdes

Poumon, estomac, foie, colon, intestin grêle, pancréas, prostate, ovaire, glande mammaire, glande salivaire, langue, glande vénimeuse des serpents, cerveau et ses sous-parties

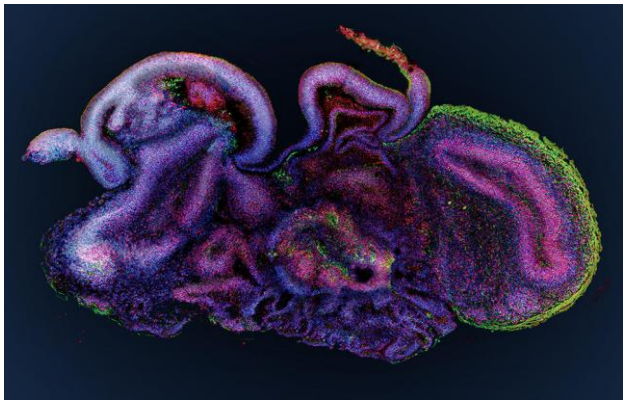




- Des cellules souches extraites de la glande vénimeuse d'un bébé serpent
- Incubées avec le même cocktail qui permet de générer un mini-intestin
- Les mini-glandes venimeuses produisent les mêmes principes actifs que le serpent adulte
- Cela permet de mieux étudier ces venins
- Cela permet de produit des sérums neutralisants

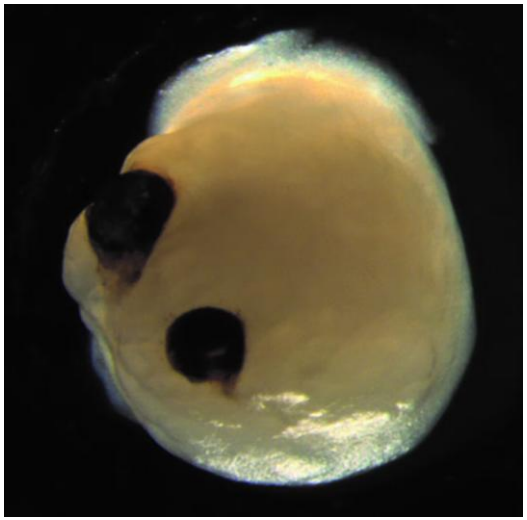
# Les organoïdes cérébraux

- Des cellules souches sont produites à partir d'un corps embryoïde que l'on force à produire du neurectoderme
- Ces cellules sont mises à pousser dans un gel
- On ajoute différents facteurs de croissance pour aboutir à la formation de différentes parties du cerveau



Organoïde cérébral

- Les chercheurs tentent de modéliser des processus normaux, certaines maladies (microcéphalie, autisme, sclérose en plaques, Alzheimer) ou infection (virus Zika)
- Pas de résultat spectaculaire encore, mais à surveiller
- Problèmes éthiques nombreux

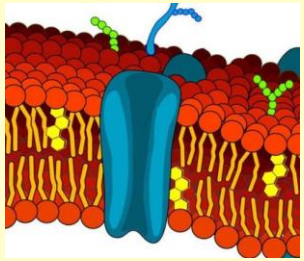


Mini-cerveau avec "yeux"

# *Utilisation des organoïdes en médecine*

# L’utilisation des mini-intestins pour la mucoviscidose

La mucoviscidose: maladie génétique la plus fréquente dans la population européene (maladie du “baiser salé”). Il existe environ 2000 variants en Europe et en Amérique.



Elle est due à un déficit du transport de l’ion chlorure et se traduit par une plus grande viscosité du mucus sécrétée par de nombreux tissus (dont poumon, intestin).

Espérance de vie aujourd’hui 35-40 ans. Il est possible que cette maladie ait favorisé la résistance au choléra pendant le Moyen Age.



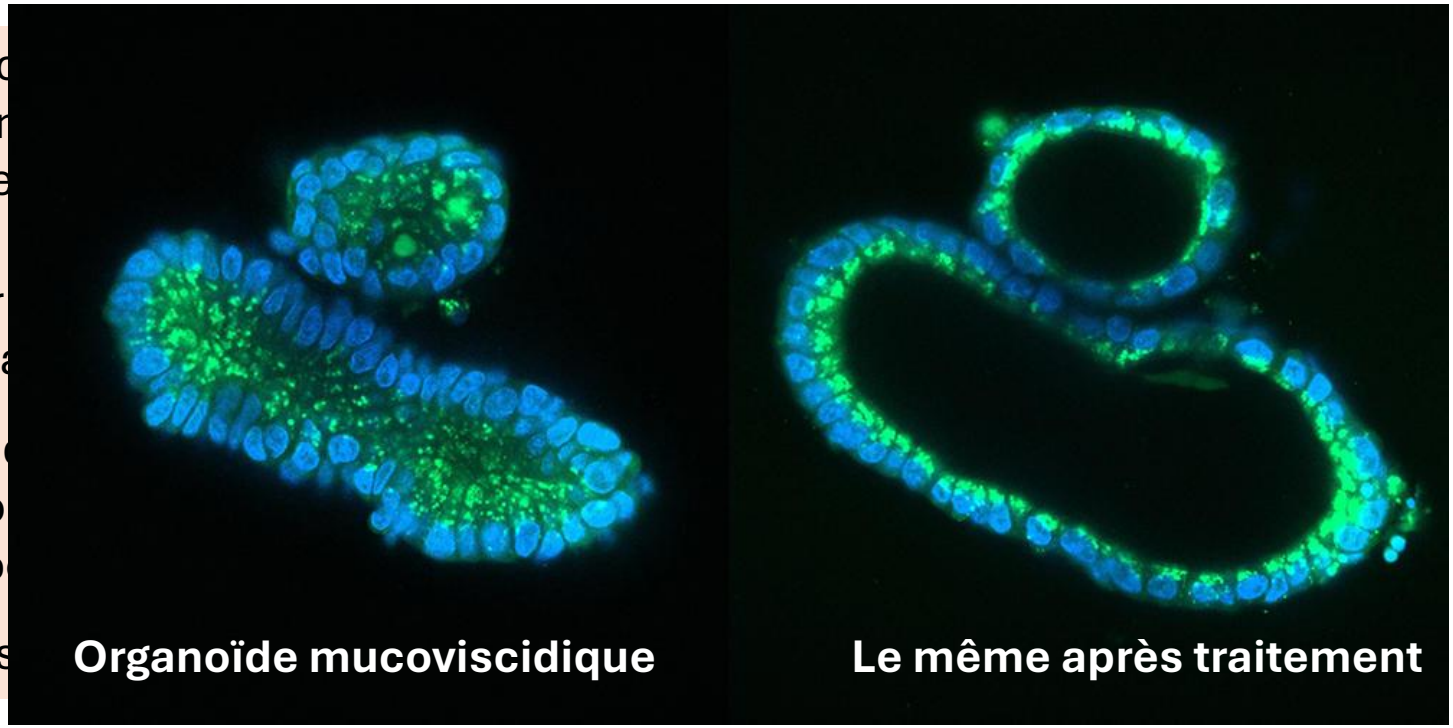
Hans Clevers

La co
soign
appe

Pour
du pa

Test
savo
remb

Dans



**Organoïde mucoviscidique** **Le même après traitement**

# L'utilisation des mini-intestins dans le cancer colorectal

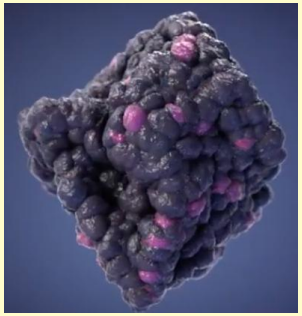
Sur le même principe, test de drogues anti-tumeur sur un mini-intestin généré à partir de cellules d'un patient atteint d'un cancer colorectal pour voir si cette tumeur réagit à la/les drogues.

Cette procédure évite de soumettre un patient à de nombreuse drogues sans effets et réduit aussi les coûts.

Mini-intestin sain



Mini-intestin tumoral

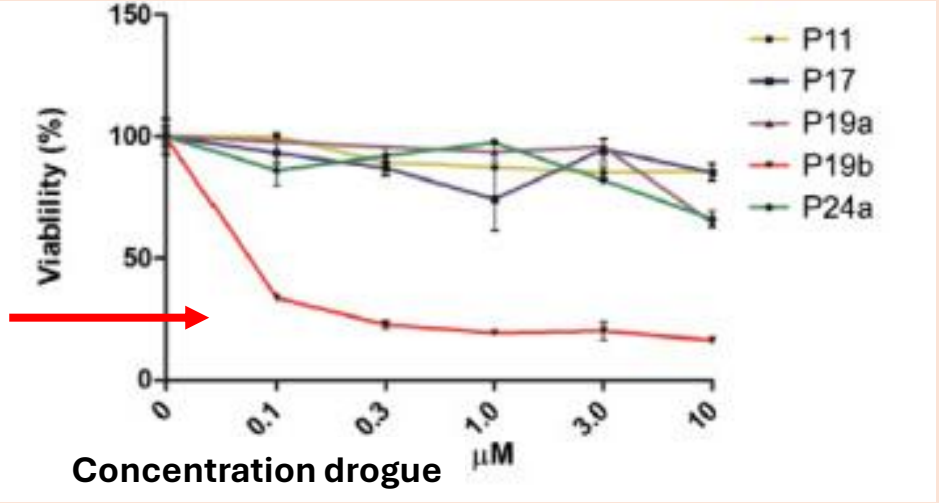




Hans Clevers

Exemple de cinq mini-intestins issus de malades ayant un cancer colorectal soumis à un composé réputé anti-tumoral.

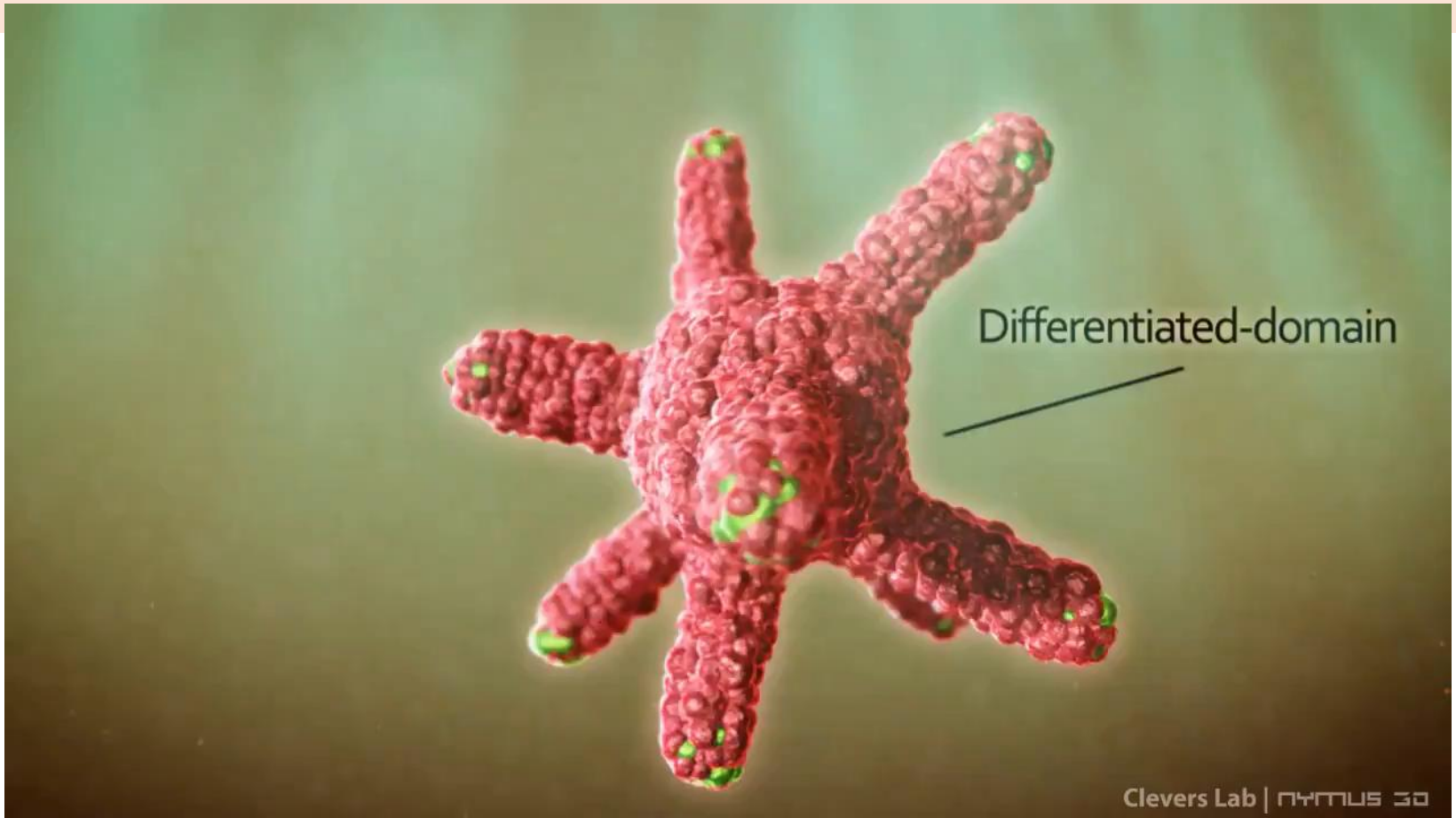
Seul un mini-intestin a réagi (**courbe rouge**)



# Des espoirs pour soigner la maladie de Crohn et la rectocolite hémorrhagique à l'aide de mini-intestins

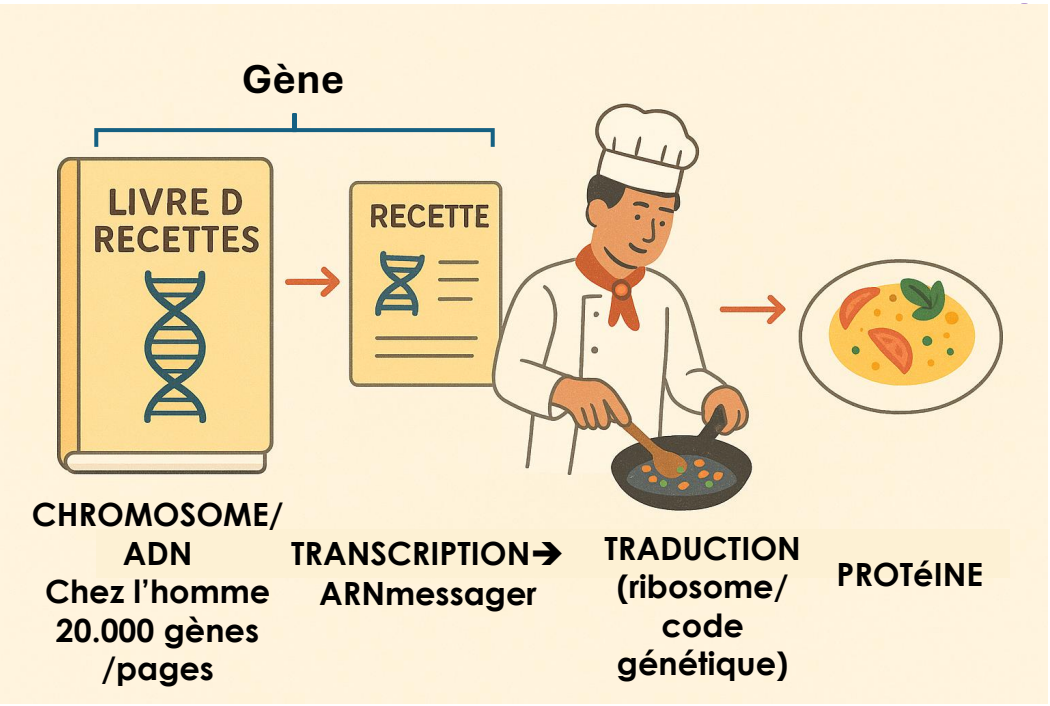
Injection de mini-intestins sains dans le colon de souris atteintes d'un équivalent de rectocolite hémorrhagique

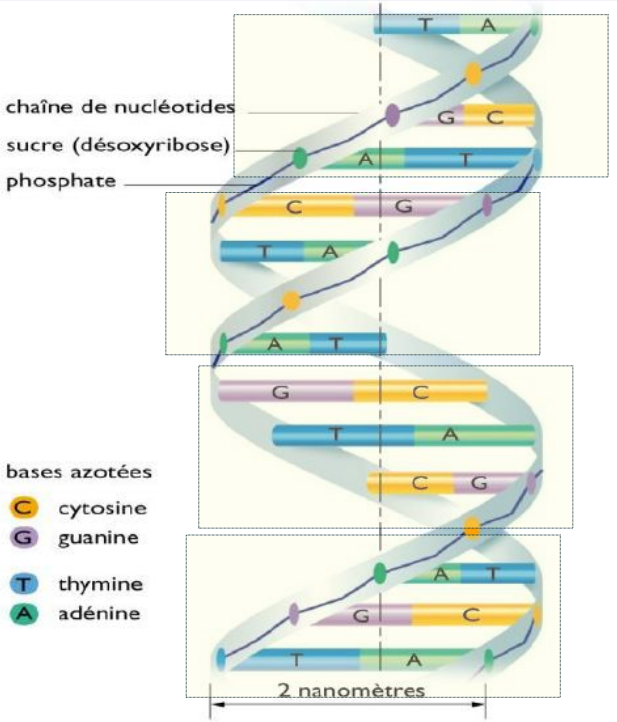
On observe un début de cicatrisation



*Autres aspects de la médecine personnalisée pour la détection de maladies ou la susceptibilité à certaines drogues*

# Détermination partielle du génome (séquençage

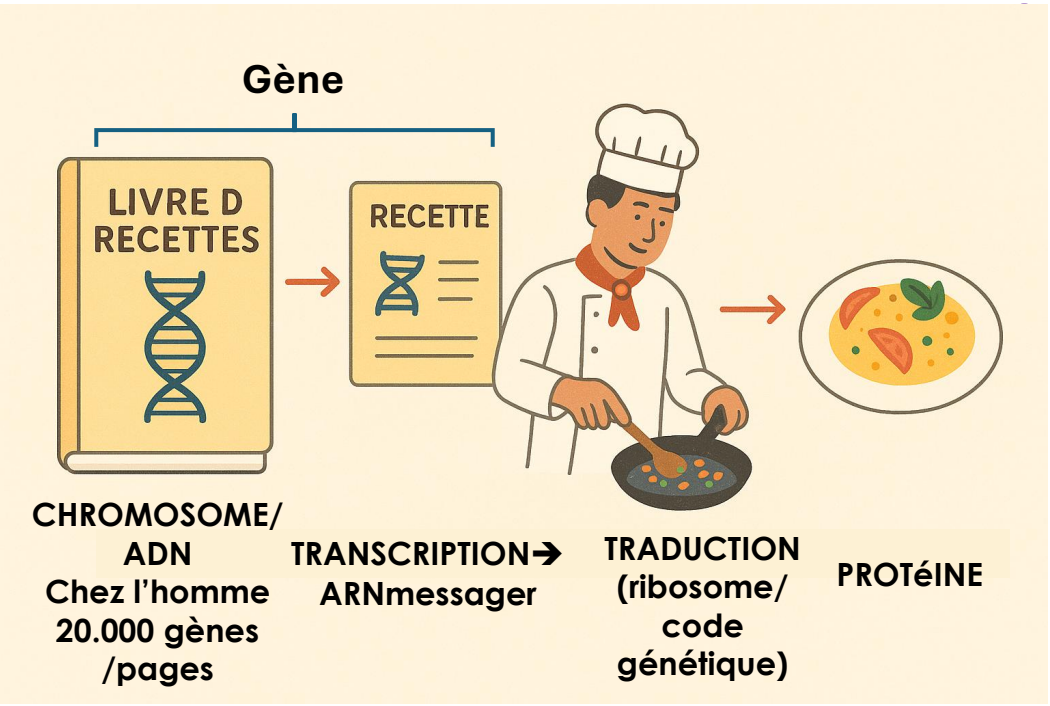


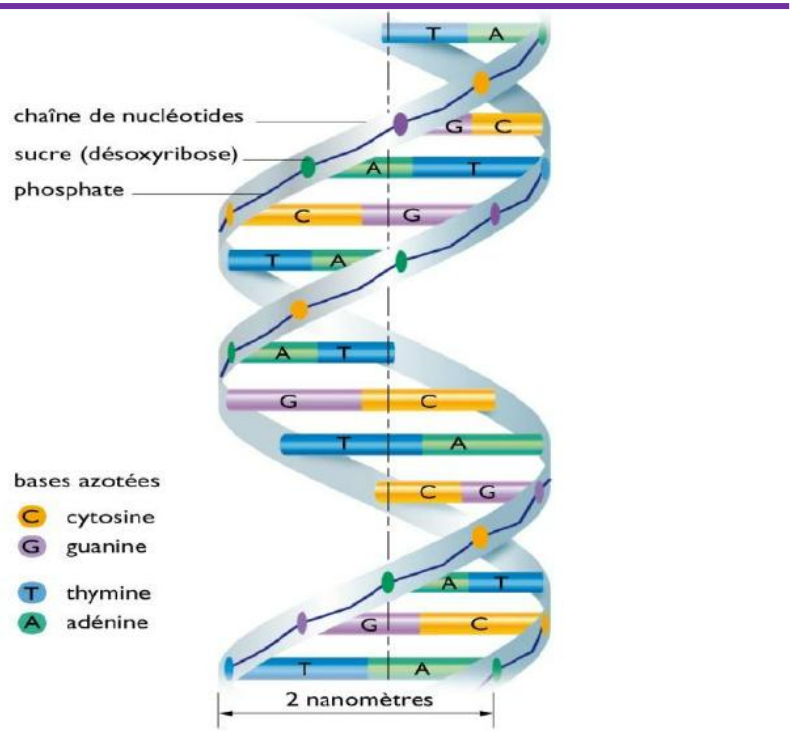




Un exemple concret avec le gène BRCA1 dont les mutations entraînent des cancers

| | |
|---|---|
| Positions 5302-5319 du gène normal | TGC.TAT.GGG.CCC.TTC.ACC |
| Positions 1768-1773 de la protéine normale | C Y G P F T |
| Positions 5302-5319 du gène mutant | TGC.TAT.GTG.CCC.TTC.ACC |
| Positions 1768-1773 de la protéine mutée | C Y V P F T |

# Détermination partielle du génome (séquençage




**1-** Séquence de gènes connus pour être impliqués dans des maladies ou cancers

**Rapide (1-2 semaines) – coût 800-1500€ en général remboursé – échantillons peuvent être sales**

**2-** Séquence des 20.000 gènes

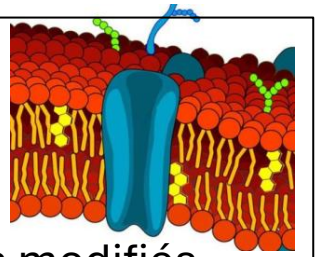
**Coût et rapidité intermédiaire (3-6 semaines) – 2000-4000€ pris en charge pour certaines pathologies – nécessite un échantillon de bonne qualité – résultats plus complexes**

**3-** Séquence de tout le génome

**Long (4-8 semaines) – cher et peu accessible (essais cliniques) – résultats très complexes – nécessite un gros échantillon de haute qualité**

# Pharmacogénomique

**Que devient un médicament dans notre corps ?**



- Il effectue son action, mais entre dans toutes les cellules (pas seulement celles ciblées)
- Il est en général chimiquement modifié dans les cellules ; les produits modifiés peuvent être toxiques
- Le foie a une fonction centrale pour détoxifier les produits et les éliminer

**Quels peuvent être les "accidents" ?**

- Elimination trop lente entraînant un effet de la drogue trop long ou toxique (ex. neuroleptiques)
- Atteinte d'un organe spécifique (muscles et statines ; cardiotoxicité en cancérologie)
- Certaines drogues peuvent être reconnues par le système immunitaire comme "étrangère au corps" et déclencher une réponse immune explosive

**Test de pharmacogénomique**

- Séquence des gènes prédits pour être impliqués dans le transport et la détoxification

**Rapide (1-2 semaines) – 300-800€ en général remboursé – échantillons peuvent être sales**

# La médecine personnalisée en France

**Les tests de génomique** ne sont réalisés que dans les Centres Hopitaliers Universitaires (CHU) ou les Centres de Lutte Contre le Cancer (CLCC), tels que :

- Institut Gustave Roussy à Paris
- Institut Curie à Paris
- Hôpital Necker-Enfants-Malades à Paris
- Hôpital Européen Georges Pompidou à Paris
- AP-HM La Timone et Institut Paoli Calmettes à Marseille
- Hospices Civils de Lyon et Centre Léon Berard à Lyon
- CHU Paris, Strasbourg, Clermont-Ferrand, Grenoble, Nancy, Toulouse, Montpellier, Lille, Nantes, Nice

**Les tests avec organoïdes** sont pratiqués dans un nombre restreint d'hôpitaux :

- Institut Gustave Roussy est chef de file en France
- Institut Curie, Centre Léon Bérard, CHU Toulouse, Nantes, Bordeaux, Caen
- L'AP-HM et l'Institut Paoli Calmettes (organoïdes digestifs et pancréatiques)
- CHU de Nice (organoïdes cutanés, sein, cou)

# Résumé

- Les cellules souches ont la particularité de se renouveler quasi indéfiniment tout en générant des cellules spécialisées.
- Elles surviennent pendant la gastrulation sous l'effet de nombreux signaux auxquels les cellules de l'embryon sont soumises de manière transitoire, et sont à l'origine des organes.
- Leur production est très controlée ; la perte de ce contrôle conduit à un cancer.
- On peut en partant de cellules souches spécifiques d'un organe créer des mini-organes ressemblant en partie à l'organe d'origine, appelés organoïdes qui restent très simples.
- Ces mini-organes commencent à être utilisés à des visées de diagnostique pour certaines maladies génétiques et pour le cancer.
- L'émergence des organoïde soulève des questions éthiques.
- Les tests par séquençage complète l'offre en médecine personnalisée

# *Les problèmes éthiques*

# Avantages et problèmes des organoïdes

- Evite aux patients des essais infructueux avec de nouvelles drogues
- Réduit les coûts des expérimentations animales
- Evite les souffrances pour les animaux tests
- Permet de faire avancer la recherche médicale

- Il manque aux organoïdes nombre des attributs d'un organe normal
- Pour le moment la technique des organoïdes est coûteuse (3000 à 10000€) : risque d'une médecine à deux vitesses
- Le devenir et l'utilisation des organoïdes humains n'est pas encadré
- Leur statut moral, en particulier les organoïdes cérébraux et embryoïdes, n'a pas été tranché
- Question pour les xénogreffes en cas de recours à un organoïde animal

# Questions posées par les méthodes de séquençage

- Les coûts sont non-négligeables et les analyses ne peuvent être entrepris que dans des centres spécialisés, d'où encore un risque de médecine à deux vitesses.

- Les données de séquence sont ce qui définit notre identité, plus que nos documents d'identité ou notre numéro de compte bancaire.

- En raison de leur caractère il faut que ces données restent strictement confidentielles et ne soient pas siphonnées par d'autres, en particulier les compagnies d'assurance.

- Des question légales sont aussi étroitement associées à nos données génétiques (paternité, héritage).



Embryon humain de 3 semaines