



HAL
open science

Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines

Charlotte Flatres, Élise Loffet, Michel Neunlist, Maxime Mahé

► **To cite this version:**

Charlotte Flatres, Élise Loffet, Michel Neunlist, Maxime Mahé. Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines. *Médecine/Sciences*, 2019, 35 (6-7), pp.549-555. 10.1051/med-sci/2019096 . hal-02533078

HAL Id: hal-02533078

<https://hal.science/hal-02533078>

Submitted on 6 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

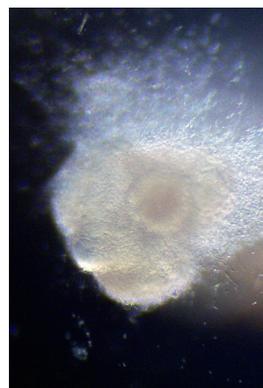
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► L'étude des maladies digestives est parfois limitée par l'accès aux tissus de patients et les modèles précliniques ne sont pas toujours fidèles aux pathologies observées chez l'homme. Dans ce contexte, le développement d'organoïdes intestinaux à partir de cellules souches pluripotentes humaines représente une avancée importante dans l'étude des processus physiologiques et des pathologies digestives. Dans cette revue, nous rappelons les étapes majeures du développement du tractus digestif chez l'homme et décrivons le rationnel de la différenciation dirigée des cellules souches pluripotentes humaines. Nous faisons également un état des lieux sur les différents types d'organoïdes intestinaux existants et leurs applications en recherche fondamentale et préclinique. Enfin, nous discutons des opportunités offertes par les organoïdes intestinaux humains dans un contexte de médecine de précision et de médecine réparatrice. ◀

L'utilisation et la maîtrise des techniques de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines a permis des avancées conséquentes dans la génération de tissus spécifiques. Il est aujourd'hui possible de différencier des cellules souches humaines pluripotentes (hPSC) en structures tridimensionnelles appelées organoïdes. Ces organoïdes sont des assemblages cellulaires capables de s'auto-renouveler et de s'auto-organiser, ce qui leur permet d'acquérir des fonctions similaires aux tissus d'origine [1]. Les hPSC peuvent ainsi être différenciées en organoïdes intestinaux qui présentent des caractéristiques similaires à celles des différentes régions du tube digestif. Ces outils ouvrent donc de nouveaux champs d'investigation dans l'étude du développement et de la physiopathologie du tube digestif, et offrent de nouvelles perspectives en médecine de précision et réparatrice [2]. Dans cette revue, nous présentons les origines développementales du tube digestif humain et les approches de différen-

Organoïdes (2) Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines

Charlotte Flatres^{1,2*}, Élise Loffet^{1*}, Michel Neunlist¹,
Maxime M. Mahé^{1,3}



ciation dirigée des cellules souches pluripotentes humaines en organoïdes intestinaux. Enfin, nous discutons les futures applications permises par les organoïdes intestinaux dans l'étude du tube digestif et des maladies associées.

¹UMR Inserm 1235, TENS (neuropathies du système nerveux entérique et pathologies digestives), Inserm, Université de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU de Nantes, 1, rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 1, France.

²Service de pédiatrie générale et génétique médicale, CHRU de Brest, Brest, France.

³Division of Pediatric General and Thoracic Surgery, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229 États-Unis.

*Contribution égale
maxime.mahe@inserm.fr

Le tractus gastro-intestinal chez l'homme

Un tube aux multiples fonctions

Le tube digestif est un organe tubulaire, complexe, responsable des fonctions de digestion et d'absorption. En contact direct avec le milieu extérieur, il joue un rôle important de barrière en permettant le passage des nutriments tout en prévenant celui de pathogènes. L'architecture du tube digestif, constituée de 4 tuniques successives, permet d'assurer l'ensemble de ces fonctions. La séreuse, la couche la plus externe du tube, est accolée à la musculature qui est composée de muscles lisses longitudinaux et circulaires. Ce compartiment intègre également un système nerveux entérique (ENS) qui contrôle le mélange et la propulsion du bol alimentaire grâce au phénomène de motricité intestinale. La sous-muqueuse forme un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les neurones et cellules gliales de l'ENS. Enfin, la muqueuse, constituée d'un épithélium en contact direct avec la lumière digestive, tapisse l'ensemble du tube digestif. Cet épithélium constitue une barrière physique entre l'organisme et le milieu extérieur où se loge le microbiote. Un système immunitaire participe également

aux échanges entre l'hôte et ce microbiote. Les fonctions de digestion et d'absorption sont assurées à différents niveaux du tube grâce à sa spécialisation en différents organes interconnectés [3]. Le tube digestif se décompose, en effet, du pôle oral vers le pôle anal en : œsophage, estomac, intestin grêle, côlon et rectum. Bien que ces organes assurent des fonctions spécialisées, ils proviennent d'une même origine embryonnaire.

Les origines embryonnaires du tube digestif humain

La formation du tube digestif commence à partir de la troisième semaine de gestation et se termine vers la douzième semaine chez l'homme. Le tractus gastro-intestinal, notamment l'épithélium digestif, est issu de la différenciation d'un feuillet embryonnaire appelé endoderme [4]. Au cours de la formation de l'endoderme, plusieurs voies de signalisation dont les voies Nodal, *fibroblast growth factor* (FGF) et *Wingless-related integration site* (WNT), sont activées [5]. Ce feuillet se replie sur lui-même pour former un tube qui deviendra l'ébauche du tractus intestinal. À ce stade, le tube digestif est composé de 3 segments : l'intestin primitif antérieur, moyen et postérieur. Sa mise en place est orchestrée par la régulation temporelle et spatiale de réseaux de gènes. Ainsi, plusieurs morphogènes sont exprimés selon un gradient de concentration cranio-caudal, induisant l'expression de facteurs de transcription spécifiques de chaque région de l'intestin primitif. Le tube digestif continuera de se développer et de s'allonger au cours du développement fœtal et pendant les premières années après la naissance (Figure 1).

Produire des organoïdes intestinaux à partir des cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes humaines

Les cellules souches pluripotentes sont caractérisées par leur capacité clonale d'auto-renouvellement et de pluripotence. En d'autres termes, elles ont la capacité de donner l'ensemble des cellules de l'organisme [6] (→). Ces propriétés uniques rendent les cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) particulièrement intéressantes dans les domaines de la biologie du développement et de l'ingénierie tissulaire [7]. Leur utilisation en recherche a été initiée à la fin des années 1990, avec l'isolement des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) à partir du blastocyste [8]. L'utilisation de ces cellules s'est par la suite étendue grâce à la découverte en 2006, de la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en cellules souches à pluripotence induite (iPSC) [9]. Grâce à leur pluripotence, il est possible d'orienter le devenir cellulaire des hPSC en les exposant à des facteurs spécifiques capables d'induire leur différenciation en cellules, organes ou tissus souhaités.

Mimer le développement du tube digestif *in vitro*

La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement intestinal permet dorénavant de les reproduire *in vitro* en utilisant le potentiel de différenciation des hPSC. Il est désormais possible d'orienter le devenir intestinal par la différenciation dirigée des hPSC grâce à l'utilisation séquentielle de facteurs de croissance qui activent les différentes

voies de signalisation impliquées dans le développement du tube digestif. La génération d'un endoderme définitif, feuillet à l'origine de l'épithélium du tube digestif, est ainsi possible par l'activation de la voie Nodal sous l'effet de l'Activine A [10], un mimétique de Nodal appartenant à la superfamille du TGFβ (*transforming growth factor β*). La formation de cet endoderme définitif est caractérisée, entre autres, par l'expression des facteurs de transcription SOX17 (*SRY [sex determining region Y]-Box 17*) et FOXA2 (*forkhead box A2*) par les cellules après leur différenciation. L'endoderme ainsi généré servira ensuite de plateforme pour la production des différentes régions du tube.

Régionalisation des organoïdes du tube digestif

En poursuivant les étapes de différenciation qui suivent la génération d'endoderme définitif, il est possible d'obtenir les différentes régions du tube digestif.

L'œsophage

La production d'organoïdes de l'œsophage (HEO) commence à partir de l'endoderme définitif obtenu, par l'activation puis l'inhibition, séquentiellement, des voies WNT, Notch, BMP (*bone morphogenetic protein*) et de l'acide rétinoïque (RA) [11,12]. Cette activation conduit à la spécialisation de l'endoderme en intestin primitif antérieur dorsal, le tissu à l'origine de l'œsophage. Les cellules expriment alors le facteur de transcription SOX2 (sans expression de CDX2 [*caudal type homeobox 2*], marqueur de l'intestin primitif moyen et postérieur), et se différencient ensuite en cellules de l'œsophage. Les HEO obtenus expriment des marqueurs spécifiques de l'œsophage, comme SOX2, la kératine 4 (KRT4) et TP63 (*tumor protein P63*) et suivent le développement de l'œsophage humain en formant un épithélium stratifié squameux [11,12] (Figure 2).

L'estomac

La production d'organoïdes gastriques (HGO), caractéristiques du *fundus* ou de l'*antre*¹, est également possible [13]. Comme pour les organoïdes de l'œsophage, les cellules de l'endoderme sont spécifiées en endoderme définitif antérieur et moyen. Le tissu obtenu sera ensuite postériorisé sous l'effet de RA pour former des sphéroïdes qui expriment les facteurs de transcription SOX2 et HNF1β (*hepatocyte nuclear factor-1β*). Les régions de l'estomac se distinguent par l'expression de PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) qui est exprimé dans l'*antre* (SOX2+/PDX1+) mais pas dans le *fundus* (SOX2+/PDX1-)

¹ Correspondent aux parties haute et basse de l'estomac.

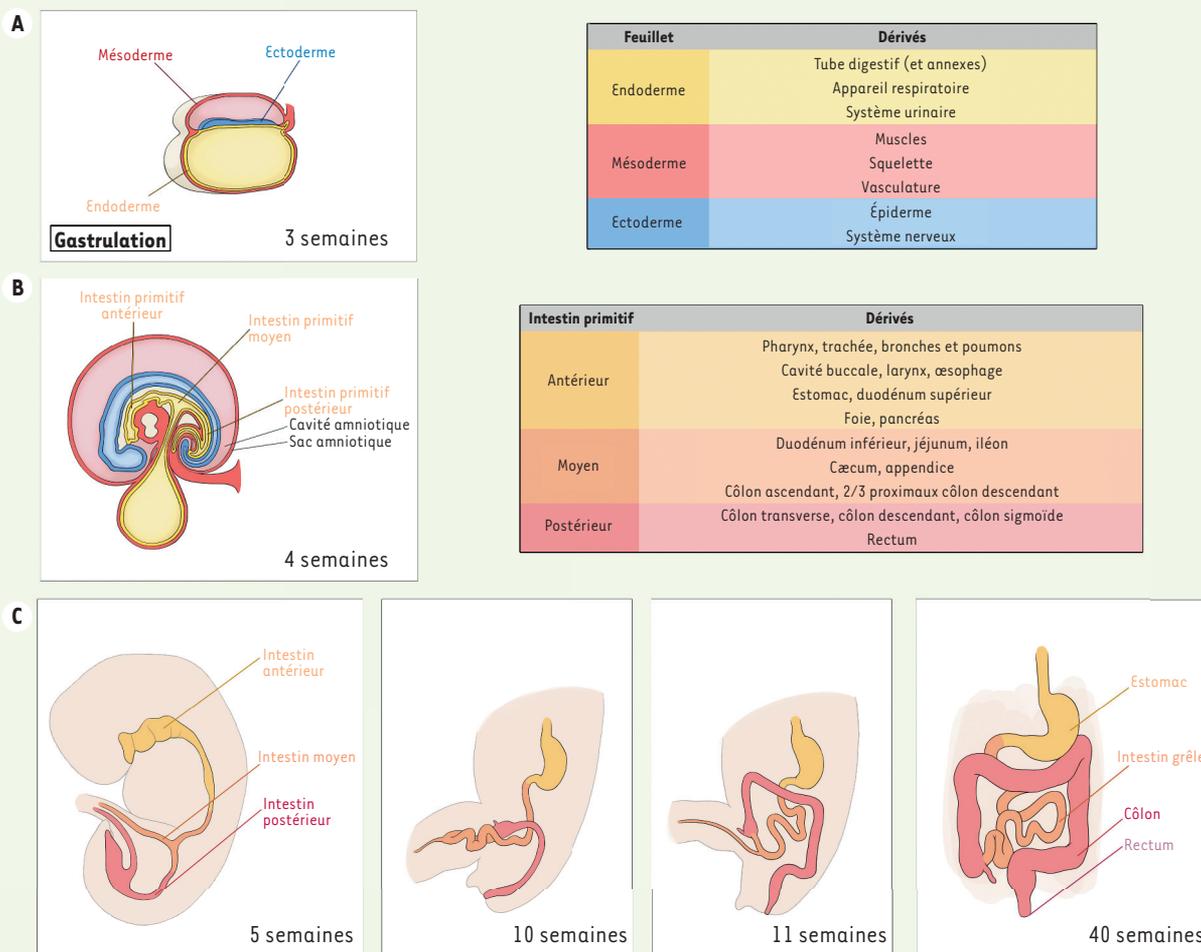


Figure 1. Développement embryonnaire de l'intestin. **A.** À 3 semaines de gestation, la gastrulation commence et donne naissance aux trois feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Les tissus dérivant de chaque feuillet sont présentés dans le tableau. **B.** L'intestin primitif se développe à partir de l'endoderme et apparaît vers la quatrième semaine de gestation. **C.** Organogenèse du tube digestif au cours du développement embryonnaire : le tube digestif se développe en s'allongeant progressivement.

[14,15]. Au stade précoce de culture *in vitro* (13 jours), l'épithélium des HGO est pseudostratifié. À un stade plus tardif (entre 13 et 34 jours), l'épithélium de l'antra devient cylindrique, simple et organisé sous forme de glandes. Selon la région de l'organoïde, l'épithélium gastrique est composé de cellules à mucus, de cellules endocrines, de cellules G (sécrétant de la gastrine), de cellules pariétales et de cellules principales, sécrétrices de pepsinogène. Les HGO constituent un modèle robuste d'étude du développement et de la fonction de l'estomac en condition physiologique mais aussi dans un contexte d'infection, par exemple par la bactérie *Helicobacter pylori* [14] (Figure 2).

Intestin grêle et côlon

La génération d'organoïdes intestinaux *in vitro* à partir de hPSC a été obtenue en 2011 par Spence *et al.* [16]. Elle est initiée à partir de l'endoderme définitif par l'activation des voies WNT et FGF, et se tra-

duit par la formation de sphéroïdes intestinaux. Après inclusion dans un gel de matrice extracellulaire (*Matrigel*), les sphéroïdes forment des structures intestinales complexes, les organoïdes intestinaux humains (HIO). Ces HIO se caractérisent par la formation d'une lumière intestinale centrale délimitée par une monocouche épithéliale constituée d'entérocytes et de cellules sécrétrices, dont les cellules de Paneth (impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière intestinale), les cellules calciformes (ou cellules de Goblet, qui sécrètent le mucus), et les cellules entéroendocrines. Bien que les HIO soient issus de l'endoderme définitif, ils présentent autour de leur épithélium une couche de cellules mésenchymateuses qui sont générées au cours du processus de différen-

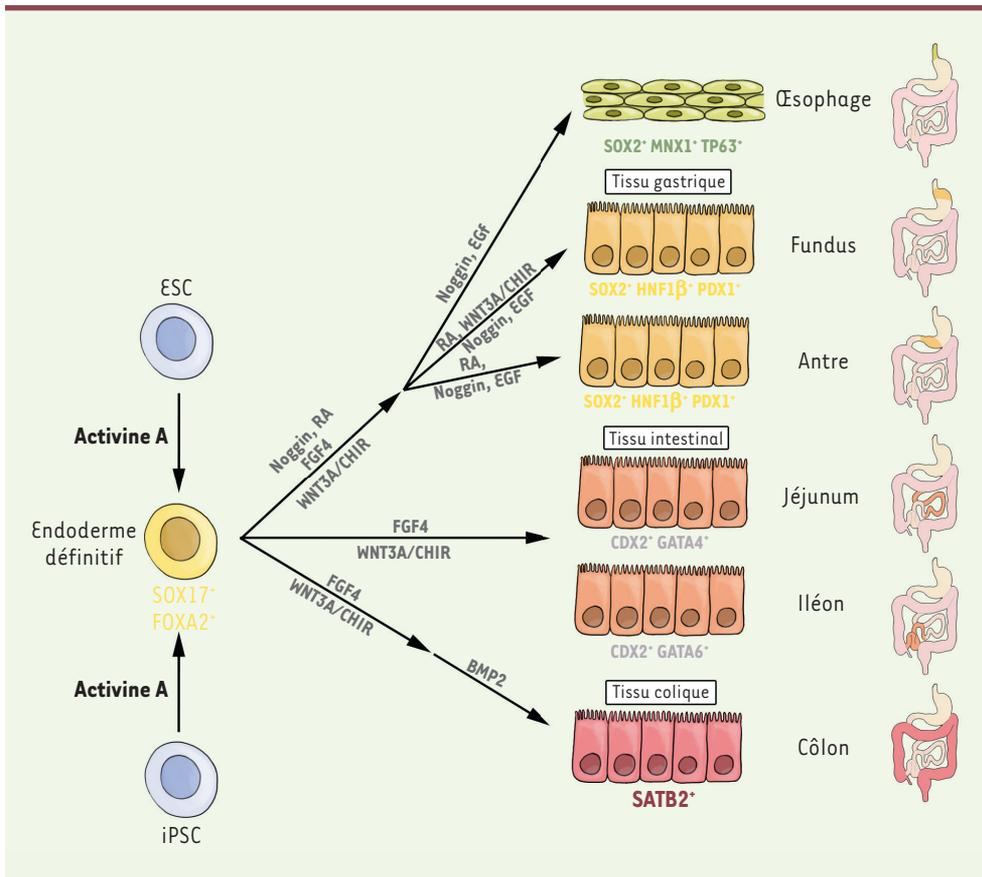


Figure 2. Différenciation de différents tissus intestinaux in vitro à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ou embryonnaires (hESC). Les cellules sont différenciées en cellules de l'endoderme. Il est possible de générer des organoïdes à l'identité œsophagienne, gastrique, intestinale ou colique en les cultivant avec différents facteurs de différenciation.

l'intestin humain. L'un des composants majeurs du tube digestif est le système nerveux entérique (ENS), un réseau neuro-glial qui l'innerve. Les cellules de l'ENS dérivent de la migration des cellules de la crête neurale vagale à partir du tube neural, d'origine

ectodermique. Afin de reproduire l'ENS *in vitro*, les hPSC sont donc tout d'abord différenciées en ectoderme puis en cellules de la crête neurale. Les cellules obtenues sont ensuite postériorisées en activant la voie RA, afin de leur donner une identité vagale [20]. Cultivées avec les sphéroïdes intestinaux, ces cellules vont s'associer au mésenchyme des organoïdes. Ces progéniteurs de l'ENS vont ensuite se différencier et donner des neurones et des cellules gliales. Ce processus permet la mise en place d'un ENS fonctionnel avec la formation de réseaux neuro-gliaux similaires aux plexus myentériques et sous-muqueux retrouvés chez l'homme [20,21]. Après xéno-transplantation, ces organoïdes intestinaux pourvus d'un ENS présentent des réflexes neuromusculaires reproduisant des mouvements similaires à l'activité péristaltique du tube digestif [20]. Les organoïdes intestinaux innervés permettent donc l'étude des interactions entre l'ENS et les populations cellulaires du tube digestif et constituent un nouveau modèle d'étude en neurogastroentérologie [22].

ciation. Le tissu obtenu est en fait similaire à un intestin fœtal [17]. Transplanté chez des souris immunodéprimées, il se développera pour former un tissu intestinal similaire à celui de l'intestin grêle humain adulte [18]. L'acquisition de l'identité colique par les organoïdes est également possible. Elle est réalisée par l'activation de la voie BMP afin de dériver les cellules en intestin primitif postérieur, le tissu à l'origine du tissu colique [18]. Le tissu obtenu présente alors une morphologie semblable à celle du côlon humain. Il exprime, entre autres, SATB2 (*special AT-rich sequence-binding protein 2*), un marqueur distal spécifique. Après xéno-transplantation dans des souris, l'épithélium des organoïdes coliques humains (HCO) s'organise en cryptes similaires à celles du tissu colique humain. On retrouve au niveau de l'épithélium, des cellules à mucus (qui sécrètent la mucine MUC2 spécifique du côlon), des cellules entéroendocrines coliques (qui produisent le GLP1 [*glucagon-like peptide 1*], le peptide YY [PYY], le préproglucagon [GCG], et l'INSL5 [*insulin-like peptide 5*], une hormone spécifique du côlon), mais, comme dans le côlon humain, pas de cellules de Paneth [19] (Figure 2).

Ajouter de la complexité aux organoïdes intestinaux

Le système nerveux entérique

Bien qu'il soit possible de produire des régions spécifiques du tube digestif à partir des hPSC, le tissu obtenu ne comporte pas l'ensemble des composants du microenvironnement cellulaire observés dans

ectodermique. Afin de reproduire l'ENS *in vitro*, les hPSC sont donc tout d'abord différenciées en ectoderme puis en cellules de la crête neurale. Les cellules obtenues sont ensuite postériorisées en activant la voie RA, afin de leur donner une identité vagale [20]. Cultivées avec les sphéroïdes intestinaux, ces cellules vont s'associer au mésenchyme des organoïdes. Ces progéniteurs de l'ENS vont ensuite se différencier et donner des neurones et des cellules gliales. Ce processus permet la mise en place d'un ENS fonctionnel avec la formation de réseaux neuro-gliaux similaires aux plexus myentériques et sous-muqueux retrouvés chez l'homme [20,21]. Après xéno-transplantation, ces organoïdes intestinaux pourvus d'un ENS présentent des réflexes neuromusculaires reproduisant des mouvements similaires à l'activité péristaltique du tube digestif [20]. Les organoïdes intestinaux innervés permettent donc l'étude des interactions entre l'ENS et les populations cellulaires du tube digestif et constituent un nouveau modèle d'étude en neurogastroentérologie [22].

Les cellules immunitaires

L'approche par différenciation dirigée ne permet pas de produire tous les types cellulaires retrouvés dans le tissu intestinal. Les organoïdes gastro-intestinaux

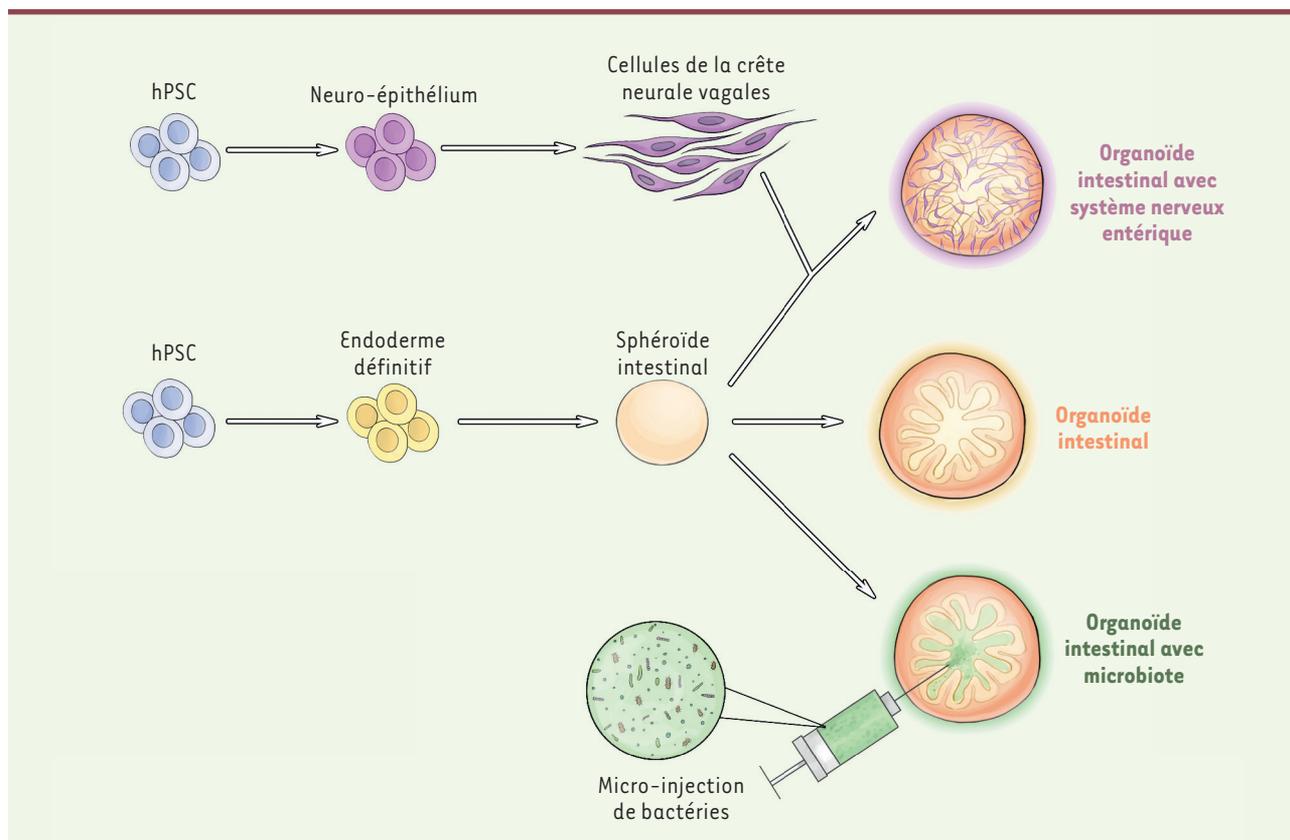


Figure 3. Complexification du modèle organoïde. À partir des cellules souches pluripotentes humaines (hPSC), les organoïdes gastro-intestinaux peuvent être complexifiés par l'ajout de cellules du microenvironnement comme le système nerveux entérique. L'étude des interactions hôte-pathogènes est également possible par micro-injection de bactéries dans le lumen des organoïdes.

ne comportent en effet pas de cellules immunitaires qui ont une origine différente. Il est cependant possible de cultiver des organoïdes intestinaux en présence de ces cellules et une étude récente a montré l'effet positif de cellules lymphoïdes sur la maturation de ces organoïdes. La production d'interleukine 2 (IL-2) par les cellules immunitaires en co-culture induit en effet une augmentation de l'expression, par les organoïdes, des marqueurs de l'épithélium digestif adulte dont des facteurs de transcription (CDX2, SOX9 et ISX [*intestine specific homeobox*]), des marqueurs spécifiques de types cellulaires (entérocytes, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth et calciformes), et une activité fonctionnelle accrue [23]. Il est ainsi possible d'obtenir des organoïdes intestinaux complexes pouvant associer toutes les interactions du tissu intestinal avec son microenvironnement.

Le microbiote intestinal

Le microbiote est un constituant majeur de l'environnement intestinal. Il est cependant absent des organoïdes produits *in vitro*. La culture de ces structures étant réalisée en conditions stériles, il n'est pas possible d'introduire un microbiote dans les organoïdes, ce qui les rend équivalent à un intestin fœtal humain qui n'est pas encore colonisé. L'organoïde représente néanmoins un modèle d'interactions

hôte-pathogènes intéressant pour étudier l'effet de bactéries sur le développement intestinal ou au cours d'infections entériques [24]. Des bactéries ou des virus peuvent ainsi être micro-injectés dans la lumière des organoïdes. On peut alors évaluer leurs effets sur les fonctions de la barrière épithéliale, comme la perméabilité intestinale [14,25-28]. Hill *et al.* ont ainsi mis en évidence dans des organoïdes colonisés avec une souche d'*Escherichia coli*, une augmentation de la production de peptides antimicrobiens, la maturation de la couche de mucus et une augmentation de la fonction de barrière [27]. L'inoculation de *Clostridium difficile* ou l'injection des toxines A et B de ce pathogène, entraîne également une augmentation de la perméabilité paracellulaire dans les organoïdes intestinaux [28]. L'ajout progressif de ces composants du microenvironnement intestinal permet ainsi de découvrir leurs rôles et leurs fonctions sur la maturation des tissus intestinaux (Figure 3). De nombreux acteurs du microenvironnement intestinal, comme les vaisseaux sanguins, restent néanmoins encore à construire afin de complexifier les organoïdes dérivés des hPSC.

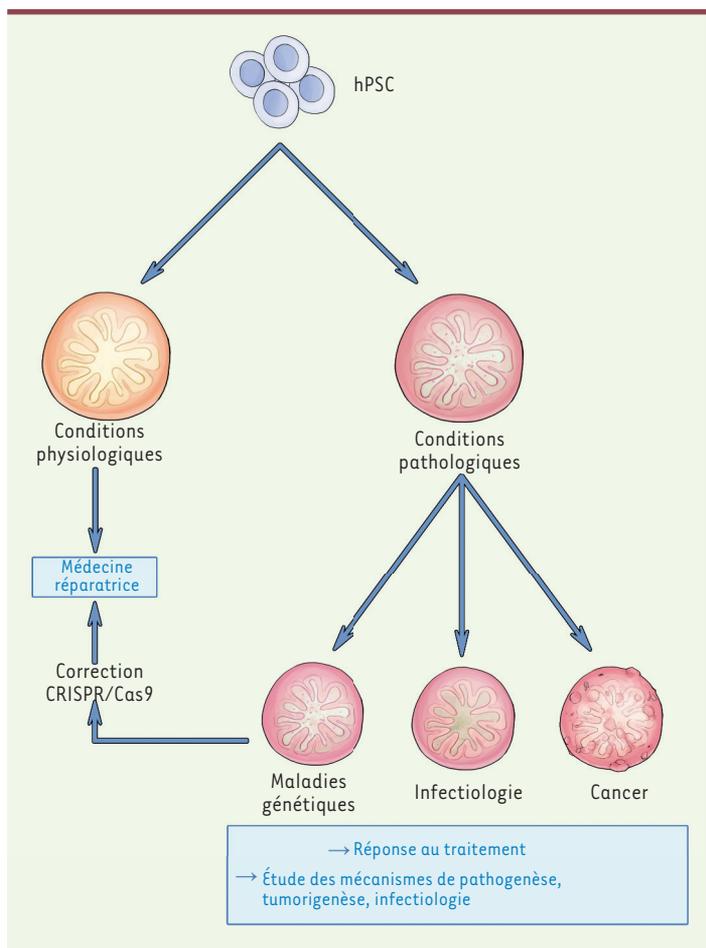


Figure 4. Applications du modèle organoïde gastro-intestinal. L'utilisation des organoïdes peut répondre à plusieurs problématiques. Les organoïdes reproduisant les conditions physiologiques peuvent être utilisés en recherche fondamentale et en médecine réparatrice. Les organoïdes peuvent également être utilisés pour modéliser et étudier de multiples pathologies. La production de modèles associés aux maladies génétiques permet d'étudier le développement de ces maladies et leur réponse aux traitements. La correction génétique (CRISPR/Cas9) est également envisageable pour rétablir un phénotype normal. hPSC : cellules souches pluripotentes humaines.

Conclusion

Le modèle des organoïdes gastro-intestinaux dérivés des hPSC permet la production *in vitro* de tissu intestinal, non seulement de manière tissu-spécifique, mais également avec une complexité ajustable. L'ajout modulable d'un certain nombre de composants du microenvironnement (*i.e.* ENS, système immunitaire et microbiote) favorise l'étude des interactions cellulaires et moléculaires entre les différents éléments du tube digestif. Outre l'étude du développement intestinal, les organoïdes intestinaux offrent de nouvelles applications dans plusieurs domaines. En recherche clinique, ils permettent notamment de modéliser des maladies spécifiques de patients. Les organoïdes peuvent

en effet être produits à partir des cellules de patients qui sont reprogrammées (iPSC) mais qui conservent le génotype étudié [29]. Les organoïdes représentent ainsi un modèle intégré pour l'étude de nombreuses pathologies humaines, comme les entéropathies congénitales (e.g. dysplasie épithéliale intestinale, maladie des inclusions microvillositaires), la maladie de Hirschsprung [20], ou encore les cancers colorectaux [30,31]. Ils constituent également un modèle d'interaction hôte-pathogène pertinent pour l'étude des mécanismes d'infection à *Clostridium difficile* [28] ou *Helicobacter pylori* [14,32]. Il est aussi possible de modifier génétiquement les organoïdes en corrigeant des mutations grâce à la technologie CRISPR/Cas. Enfin, les organoïdes gastro-intestinaux dérivés des hPSC représentent un intérêt majeur en ingénierie tissulaire et en médecine réparatrice [33] (Figure 4). La combinaison de plusieurs types d'organoïdes (intestinaux, hépatiques, cérébraux, etc.) constitue une piste intéressante pour le développement de ces modèles. En particulier, l'utilisation des techniques de microfabrication et de microfluidique conduisant à la création d'*organ-on-chip*, permet de reproduire le fonctionnement physiologique d'un tissu ou d'un système entier [34]. L'utilisation des organoïdes dérivés des hPSC offre donc des perspectives prometteuses quant à la compréhension des maladies humaines et la découverte de traitements efficaces. ♦

SUMMARY

From human pluripotent stem cells to custom-made intestinal organoids

The study of gut diseases is often limited by the access to human biological tissues and animal models that do not faithfully mimic the human pathologies. In this context, the development of intestinal organoids from human pluripotent stem cells is paving the way of gastro-intestinal physiology and digestive disease study. In this review, we recall the embryonic development of the digestive tract and its translation to human pluripotent stem cell differentiation. We also present the different types of intestinal organoids that can be generated, as well as their applications in research. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 2016 ; 18 : 246-54.
2. Picollet-D'hahan N, Dolega ME, Freida D, et al. Deciphering cell intrinsic properties: A key issue for robust organoid production. *Trends Biotechnol* 2017 ; 35 : 1035-48.

