

A microscopic view of several spherical cells and organoids. The largest one in the foreground is a large, translucent sphere with a textured surface, possibly a zebrafish embryo. Other smaller, more uniform spheres are scattered in the background. The overall color palette is blue and white, with a soft, ethereal glow.

CELLULES SOUCHES ET ORGANOÏDES

*Ferrand Audrey
Reuilh Nathalie
Bugarin Géraldine
17-06-24*

SOMMAIRE

1- LES CELLULES SOUCHES

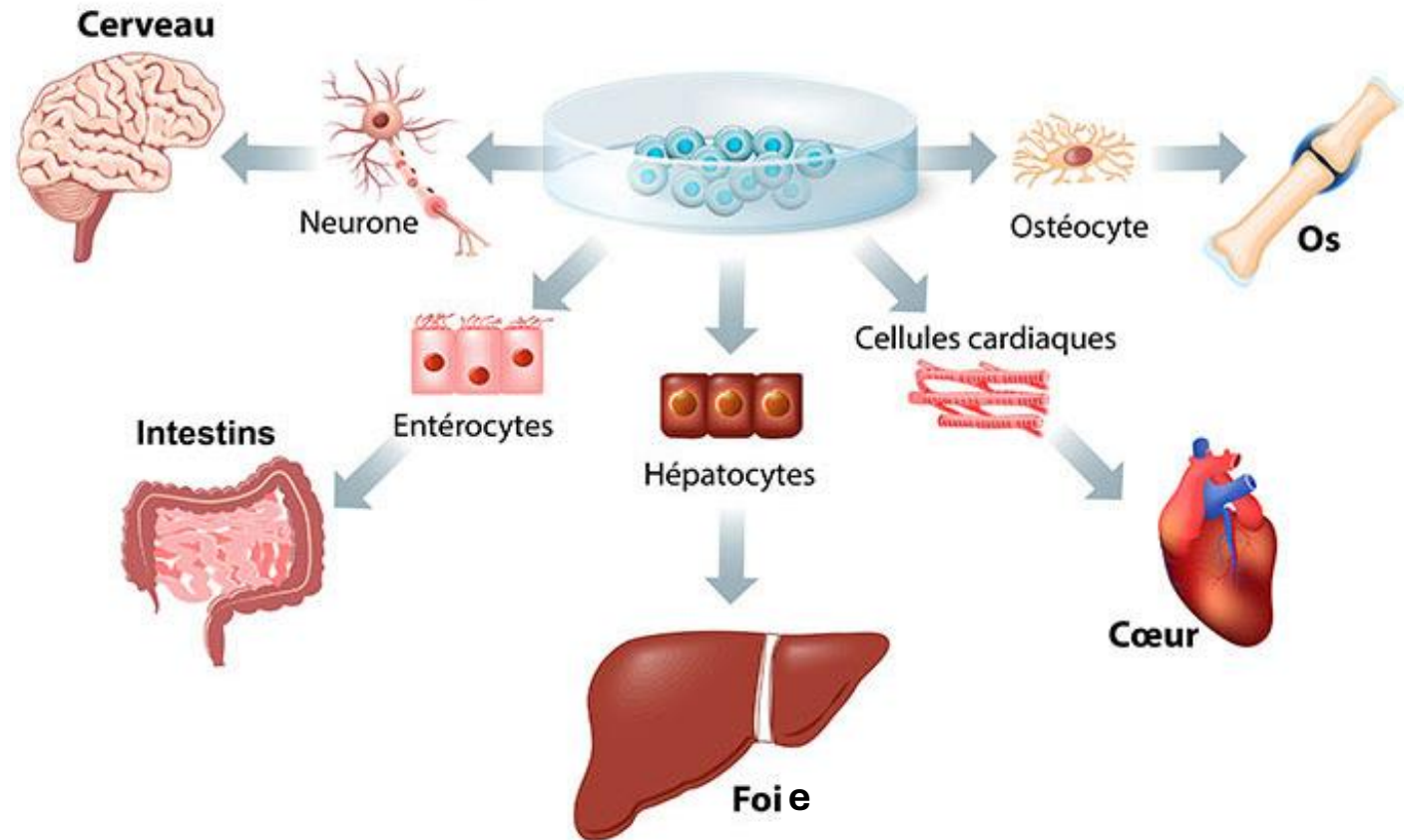
2- LES ORGANOÏDES : Veille
scientifique => veille
technologique

3- PROPOSITION DE SÉQUENCES

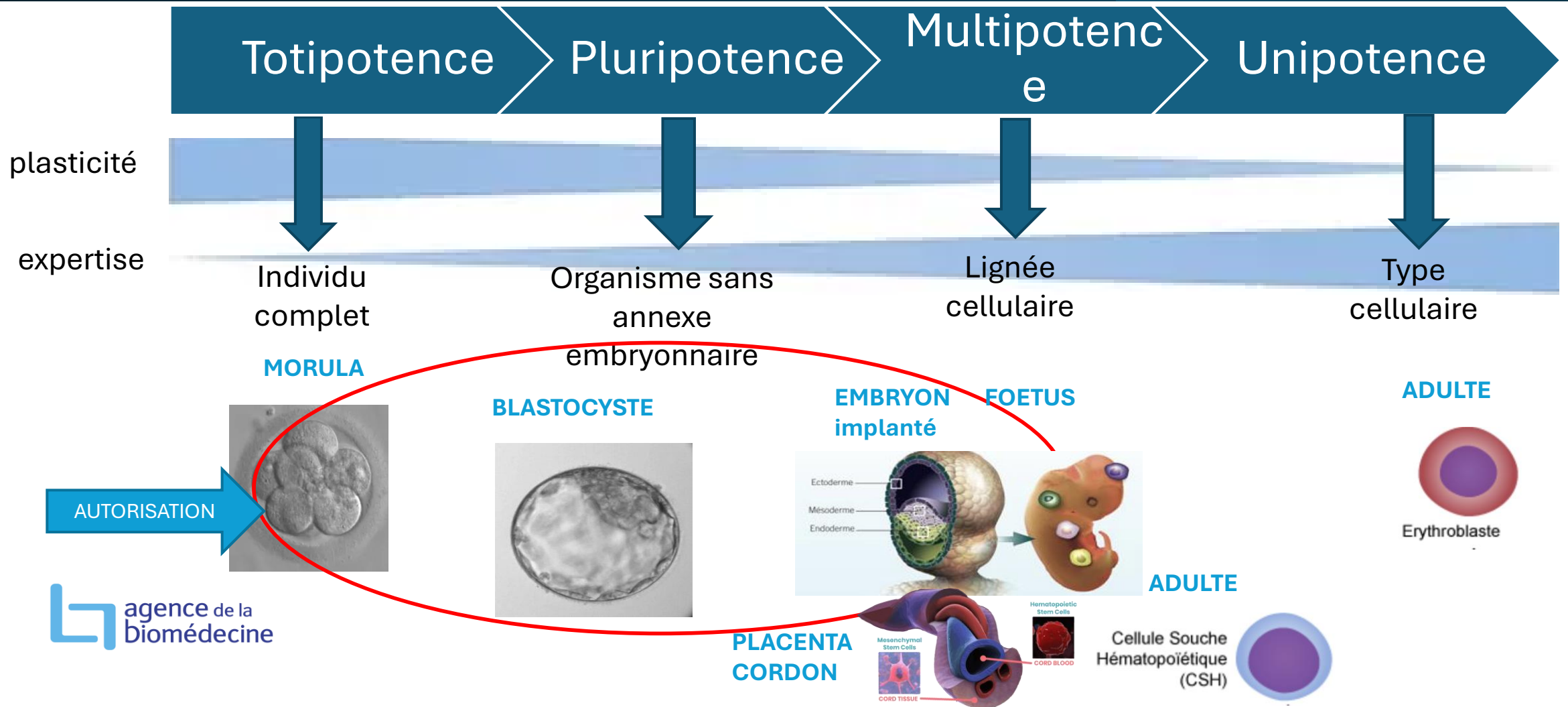
LES CELLULES SOUCHES

= Cellules indifférenciées
= douées d'auto-renouvellement

= capacité à donner des cellules
différenciées = potence

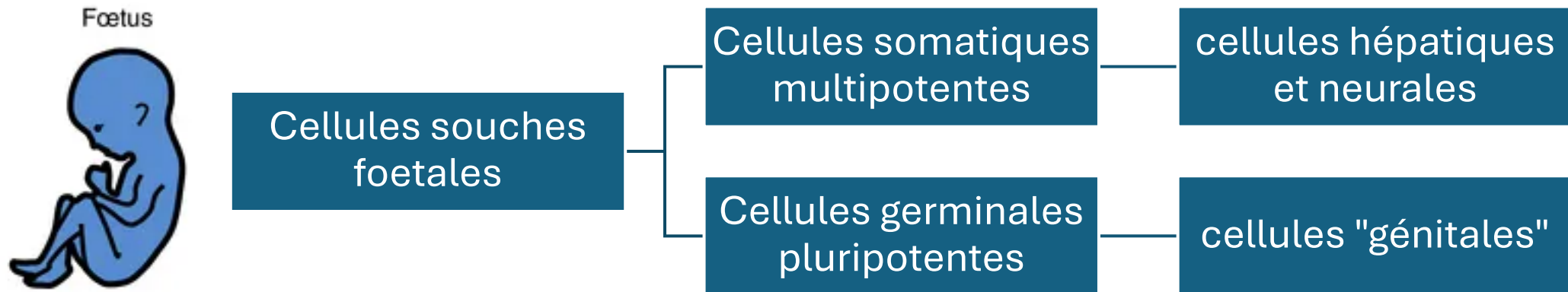


LES CELLULES SOUCHES



LES CELLULES SOUCHES

Les cellules souches multipotentes foetales



Encadrement

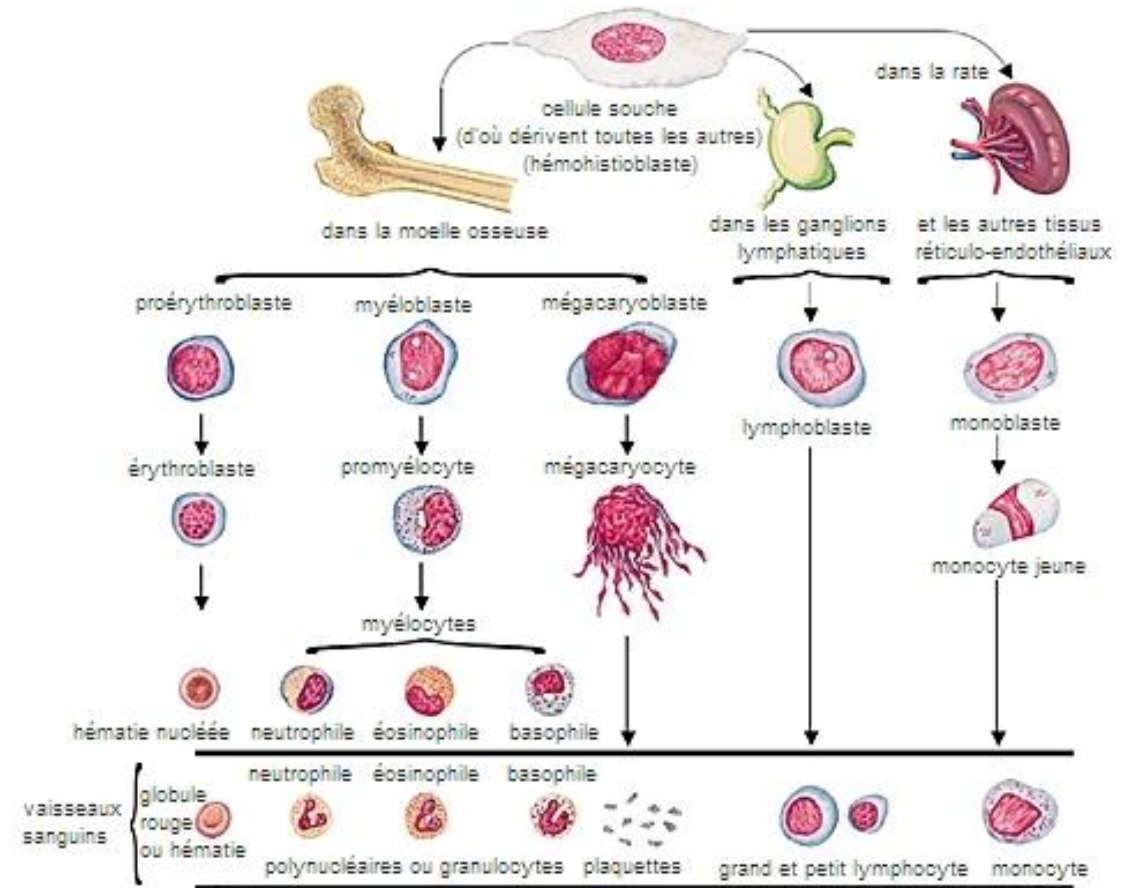
Loi de bioéthique de 2003



LES CELLULES SOUCHES

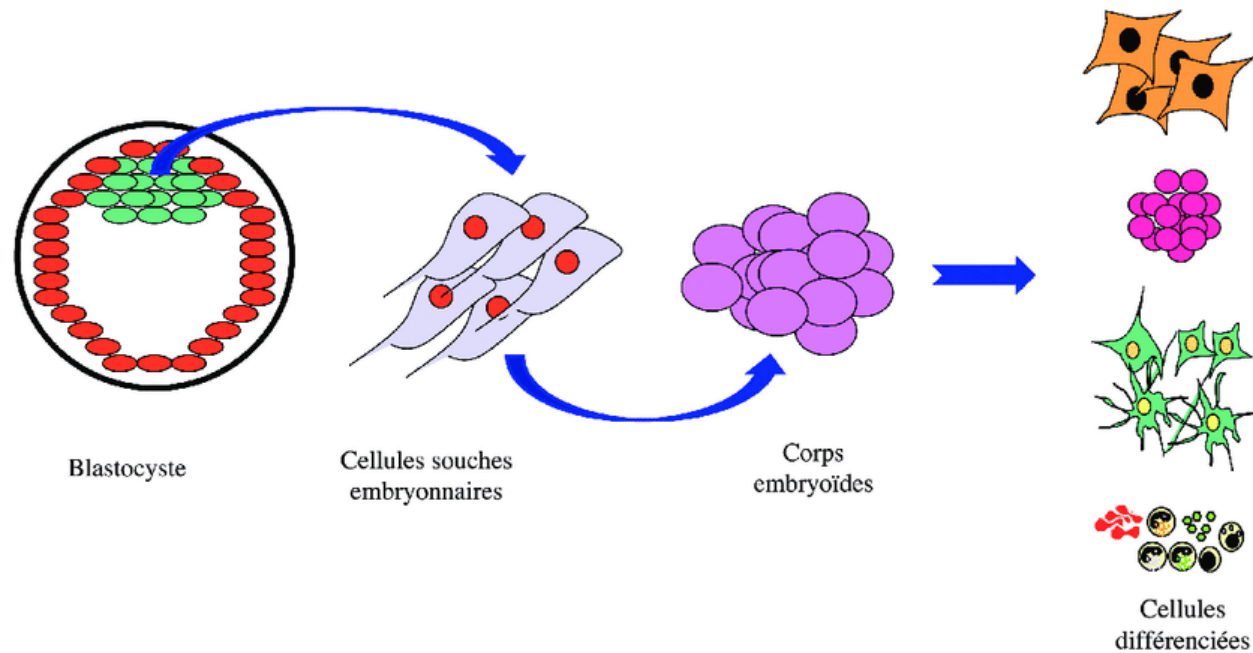
Les cellules souches multipotentes adultes

Adulte



LES CELLULES SOUCHES

Les cellules souches embryonnaires CSE



Encadrement

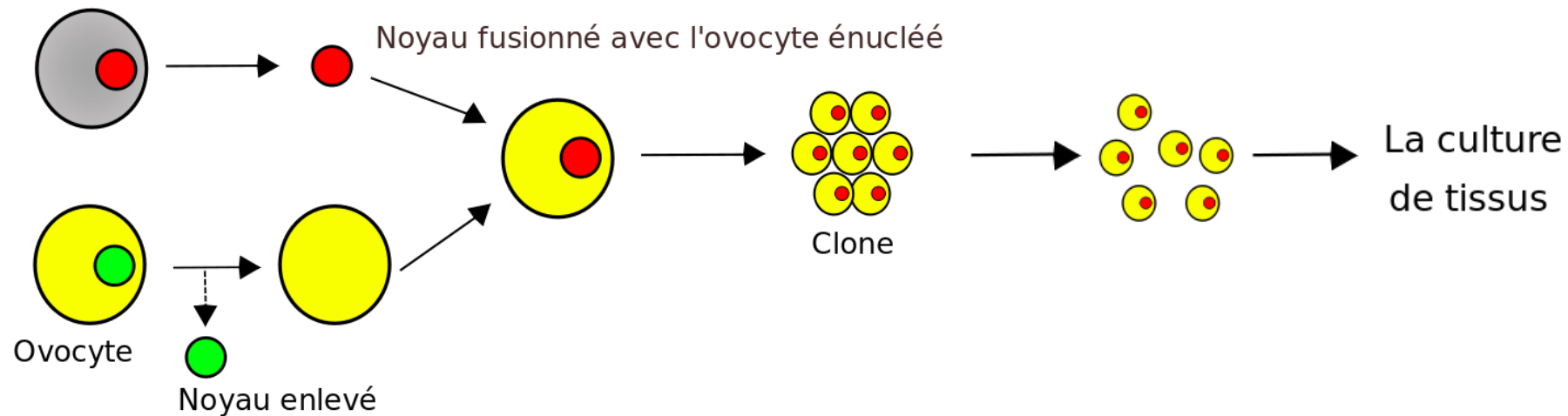
Loi de bioéthique de 2003



LES CELLULES SOUCHES

Les cellules souches pluripotentes embryonnaires par clonage

Le corps cellulaire somatique avec gènes souhaités



INTERDICTION

Loi de bioéthique de 2003



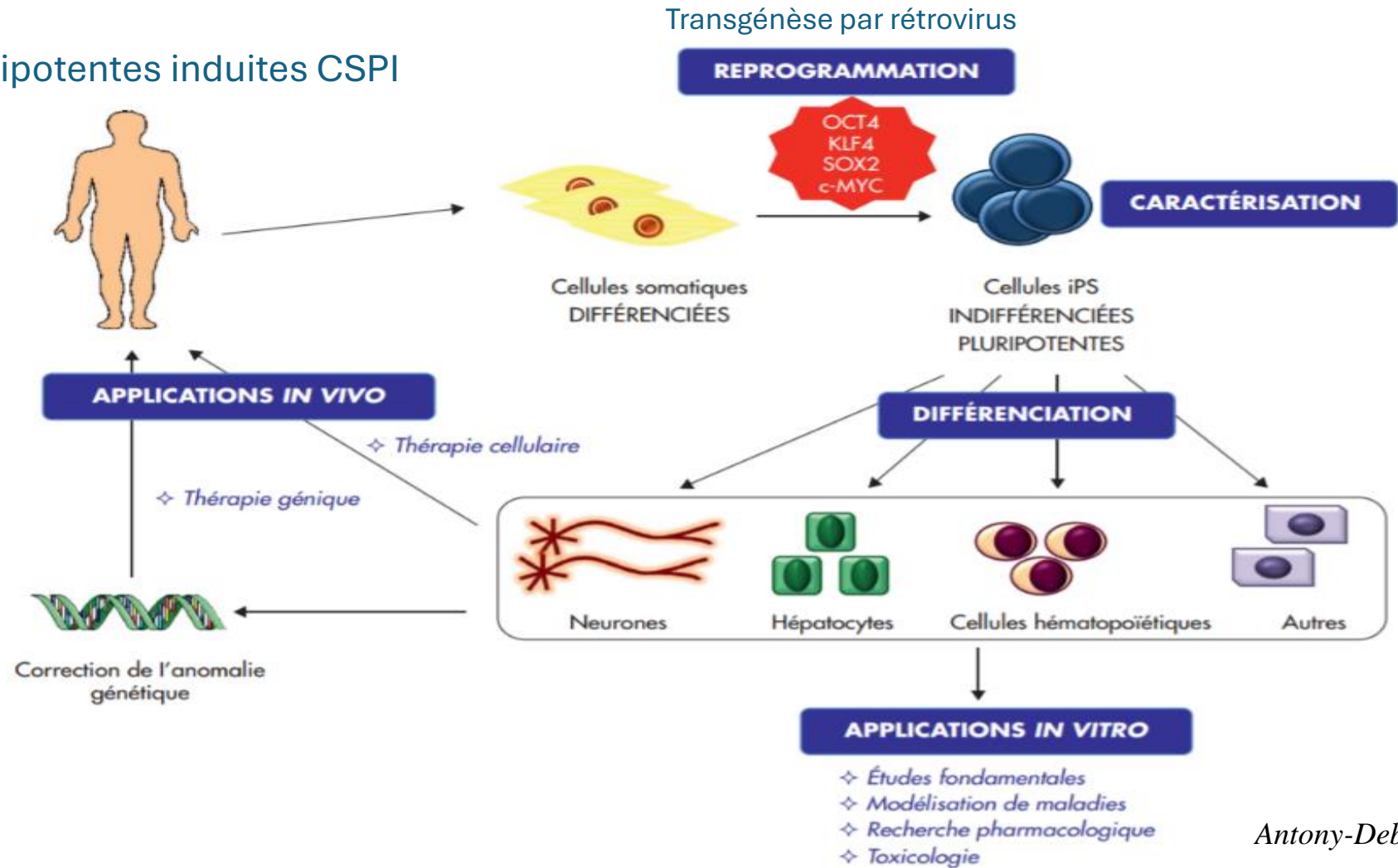
LES CELLULES SOUCHES

Les cellules souches pluripotentes induites CSPI



Shinya Yamanaka

Prix Nobel 2012



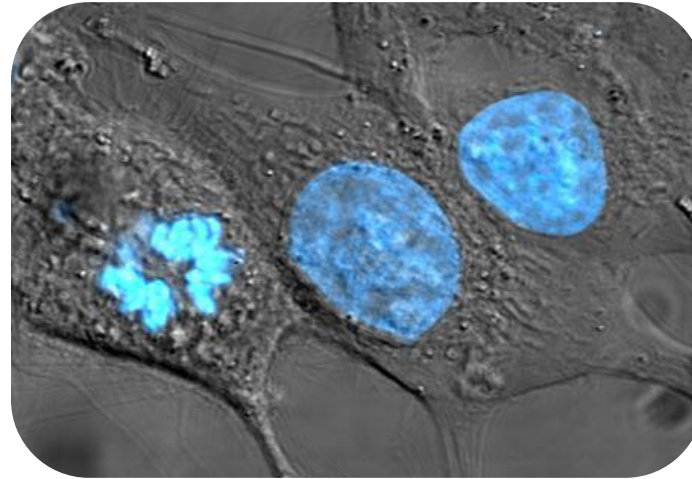
LES CELLULES SOUCHES

Intérêts



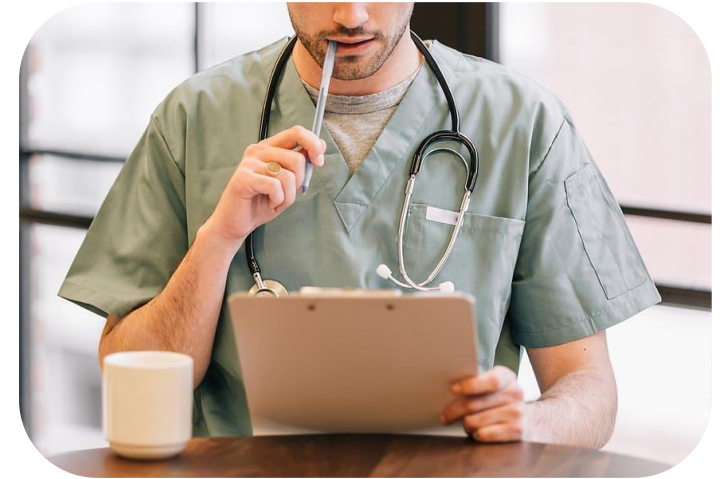
Recherche fondamentale

- Toxicologie
- Modèle pathologie



Thérapie cellulaire

- maladie génétique



Médecine régénérative

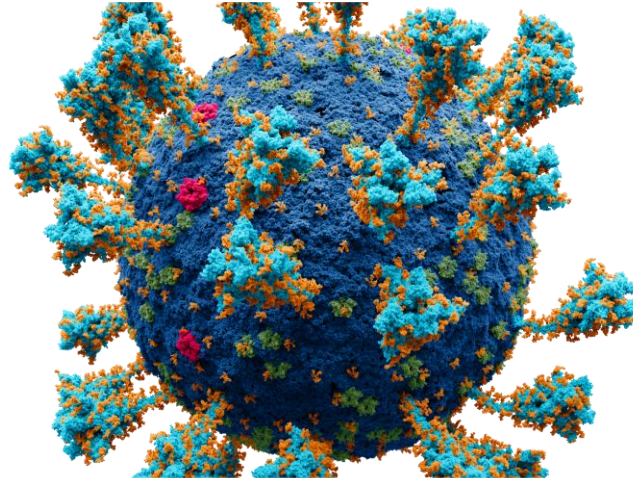
LES CELLULES SOUCHES

Limites



Technique

- Cellule capable de proliférer seulement utilisable



Utilisation Rétrovirus

- Mutation ?



Régénération limitée

LES ORGANOÏDES

DÉFINITION

- Structure 3D
- Etabli à partir de cellules souches : s'auto-renouvellent et s'auto-organisent
- Reproduit *in vitro* les différents types cellulaires et les aspects architecturaux & fonctionnels des tissus natifs

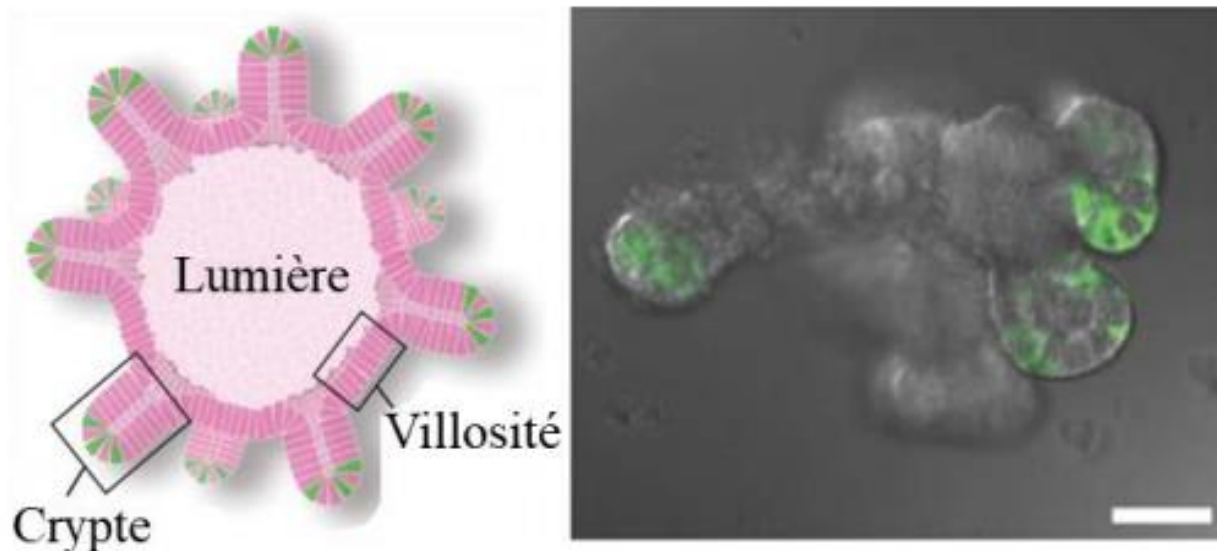


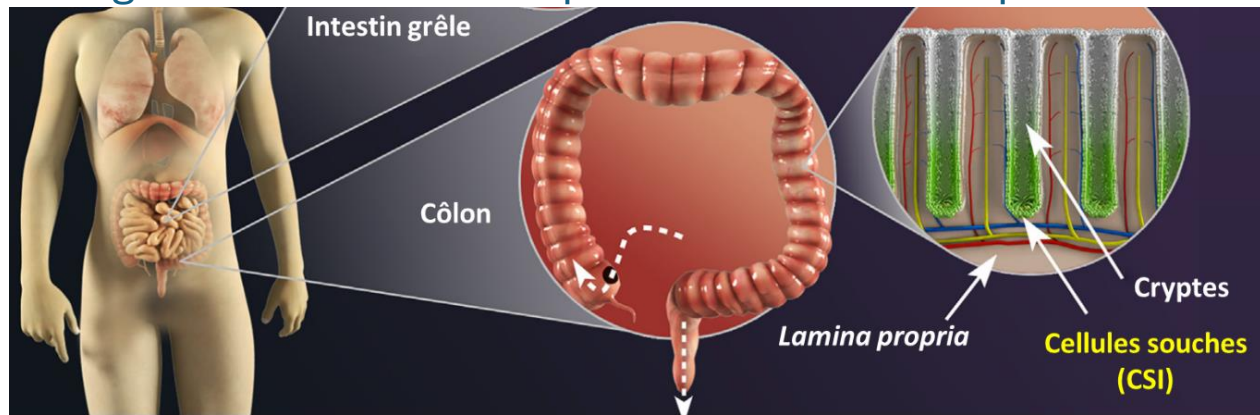
Schéma & micrographie au microscope à fluorescence d'un organoïde de colon humain obtenu à partir de cellules souches intestinales Lgr5+ (en vert)

Barre d'échelle = 50 μ m

(Source : adapté de Sato T. et al 2009)

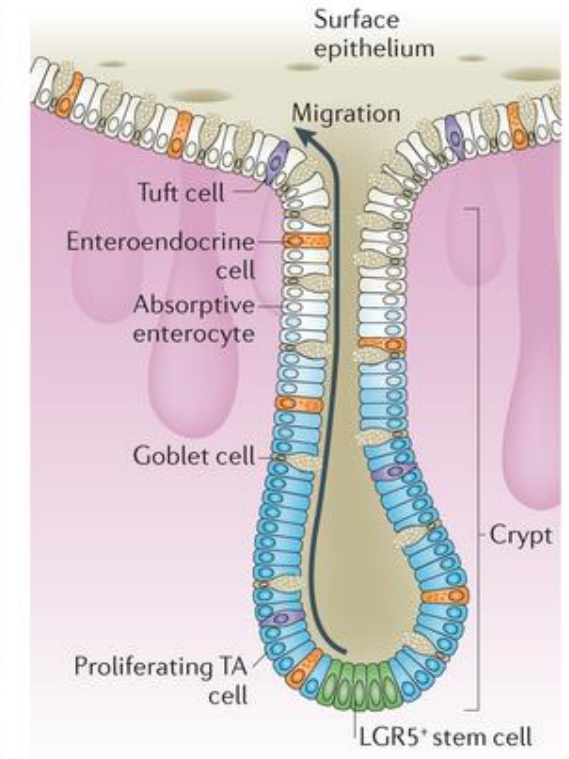
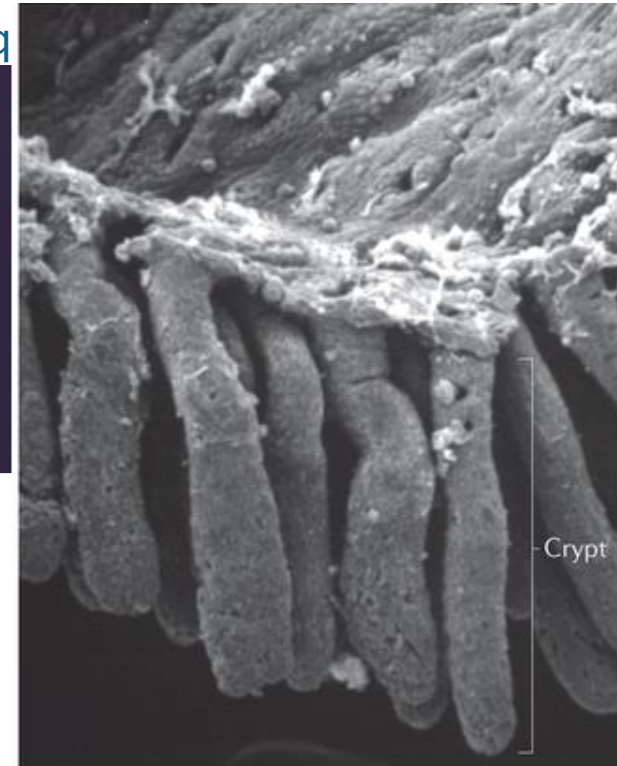
LES ORGANOÏDES

Organoïdes de côlon : reproduction du tissu épithélial colique



Du colon à l'épithélium colique

(Source : Figure adaptée de Dutton et al., 2019)



Micrographie en microscopie électronique à balayage et représentation schématique associée de l'épithélium colique

(Source : adapté de Nick Baker - Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15, 19–33 (2014))

LES ORGANOÏDES

Destin des CSI dicté par la NICHE

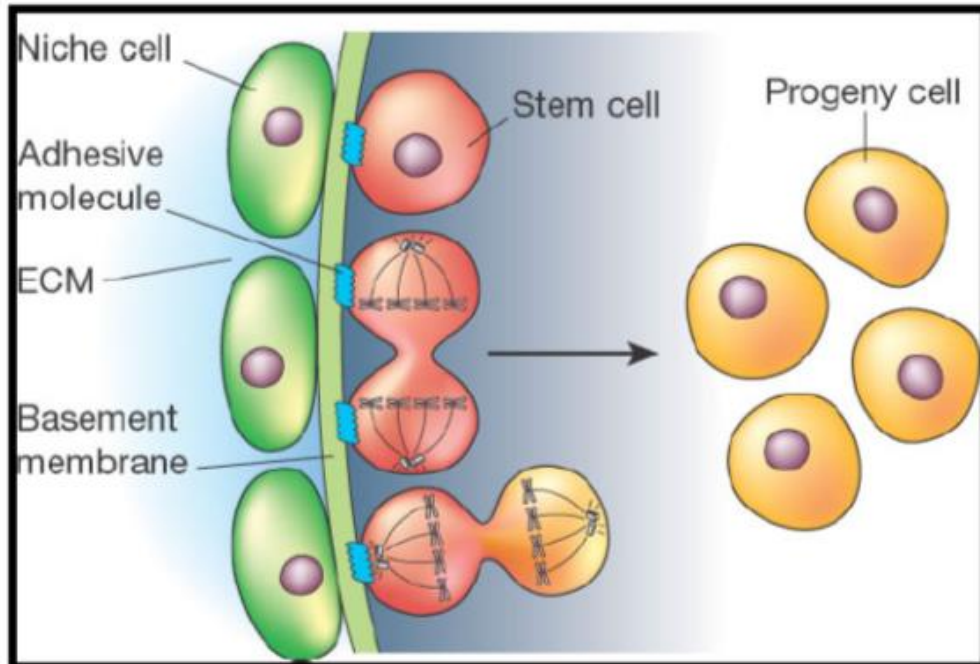
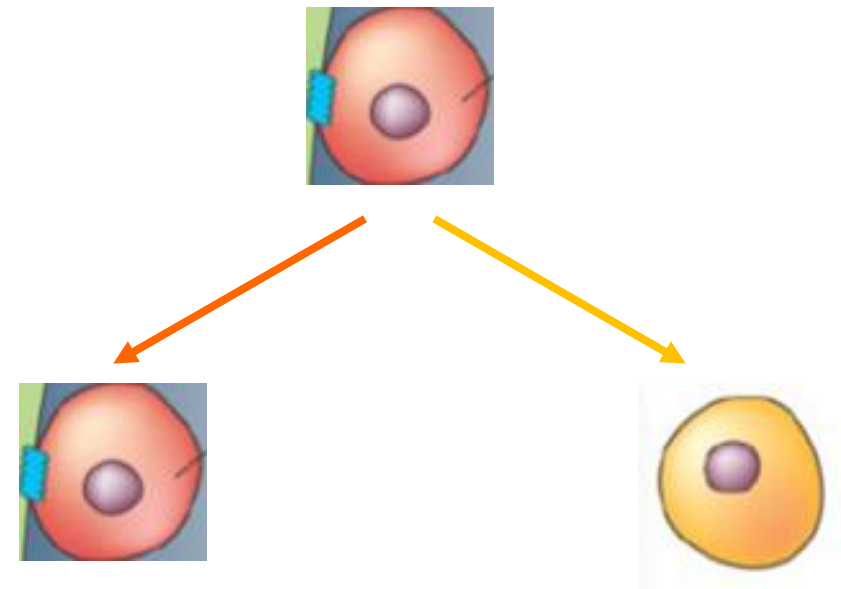


Figure : Les divisions symétriques et asymétriques des CSI

(Source : Spradling et al, nature 2001)

**Voie de signalisation Wnt
activée dans les CSI**

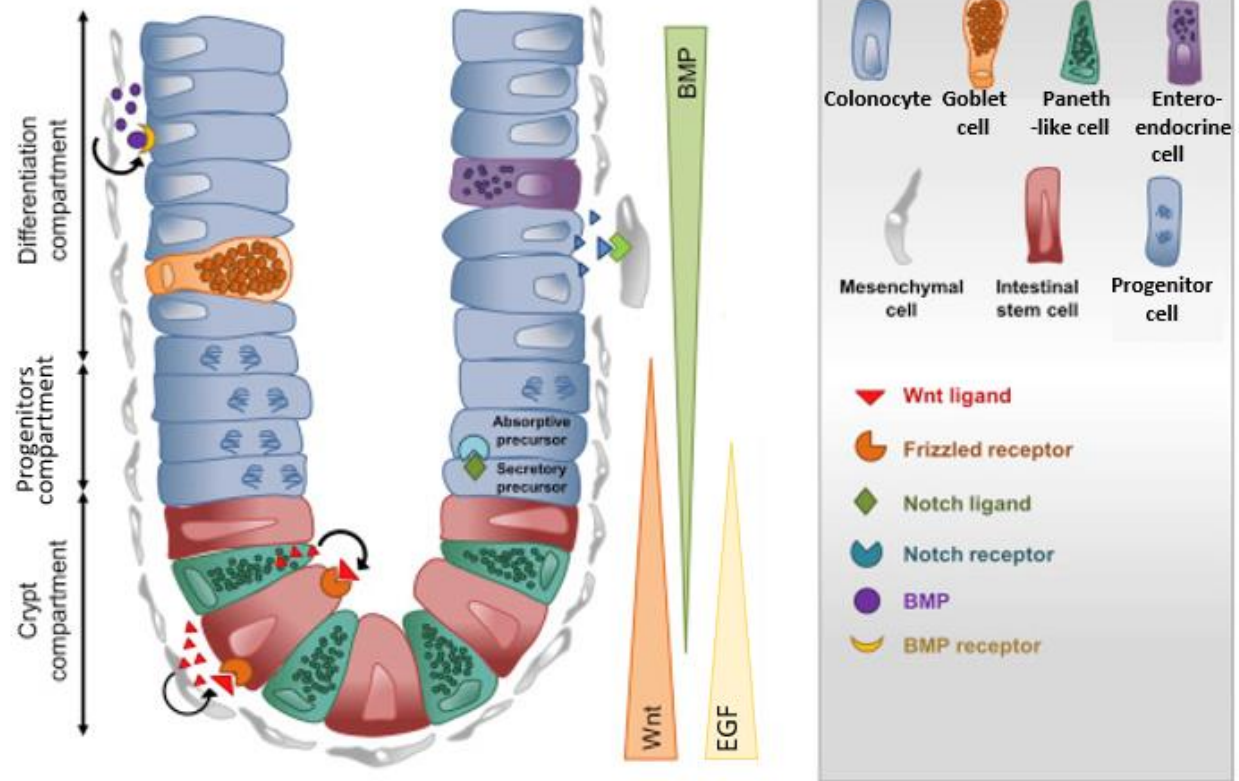


LES ORGANOÏDES

Les Fibroblastes de la niche : contrôle paracrine des CSI

Facteurs de niche sécrétés par les fibroblastes :

- Ligands Wnt
- Noggin = antagoniste des ligands BMP
- EGF

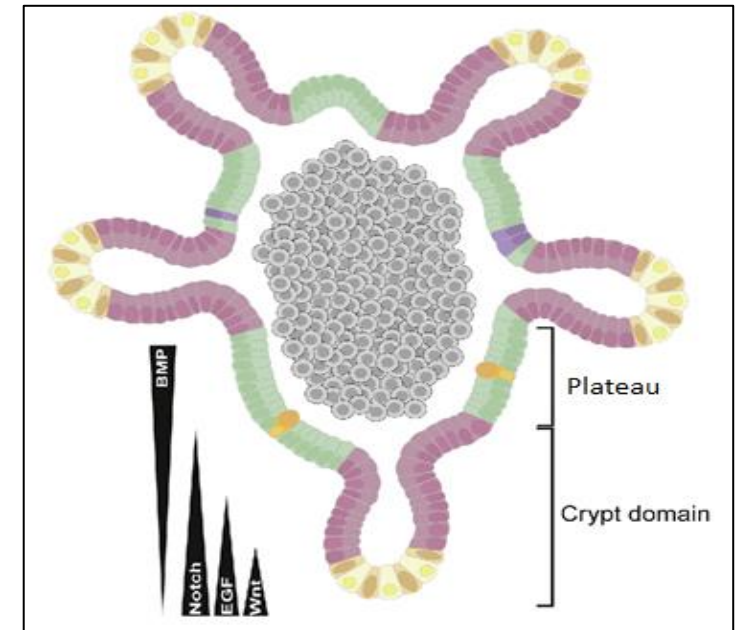
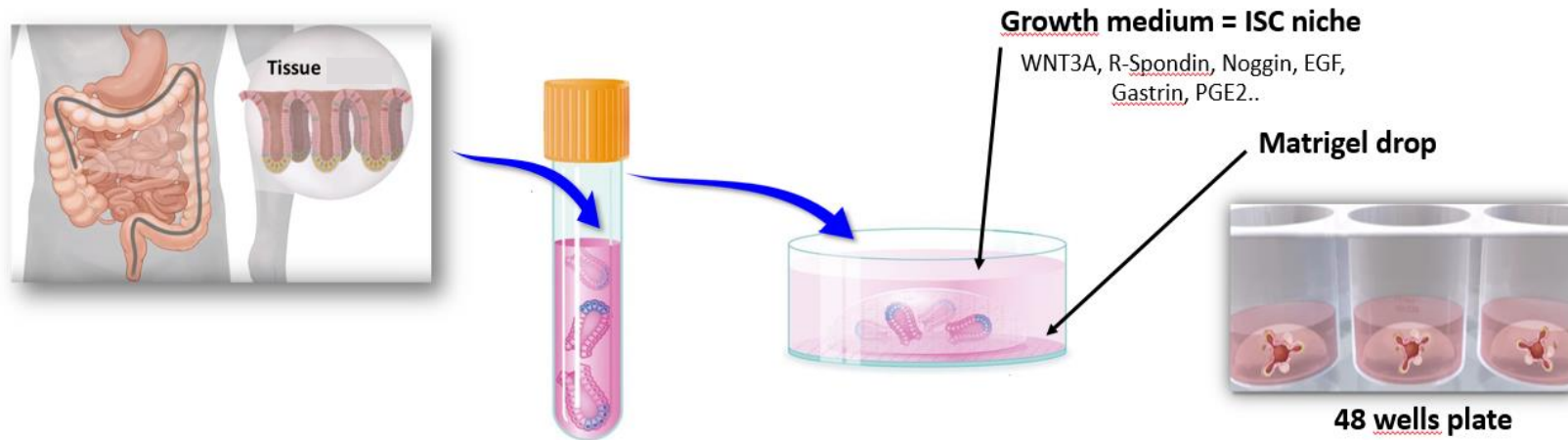


Les gradients d'action des facteurs de niche dans la crypte

(Adapté de Martini, Krug et al. 2017)

LES ORGANOÏDES

Elaboration d'organoïde colique humain à partir de CSI



- Colonocyte
- Enteroendocrine cell
- Progenitor
- Goblet cell
- Stem cell
- Paneth like cell
- Dead cell

(Source : adapté de <https://www.biorxiv.org/> et adapté de <https://www.semanticscholar.org/>)

LES ORGANOÏDES

Croissance des organoïdes de côlon humain dans le Matrigel™

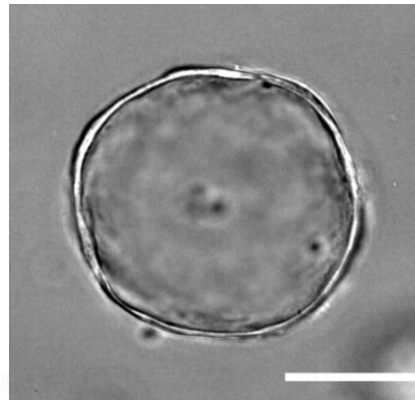
Imagerie au microscope inversé des organoïdes de côlon humain :

Caractérisation des cellules épithéliales d'un organoïde au microscope confocal :

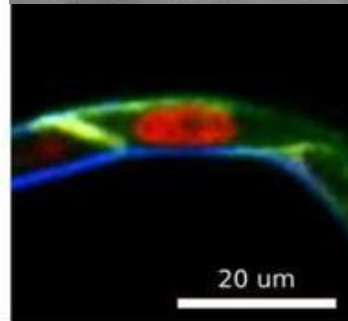
- **phalloïdine** (marqueur de l'actine)
- anticorps anti **EpCAM**
- marqueur nucléaire **Draq5**



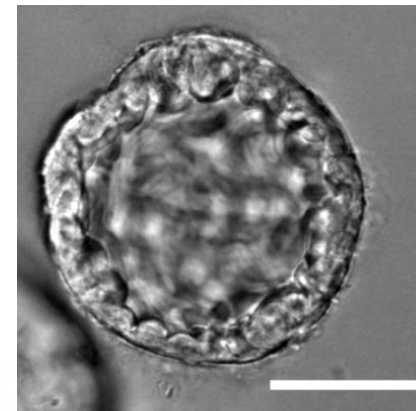
Organoïde cystique



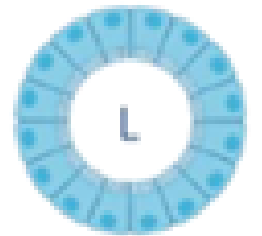
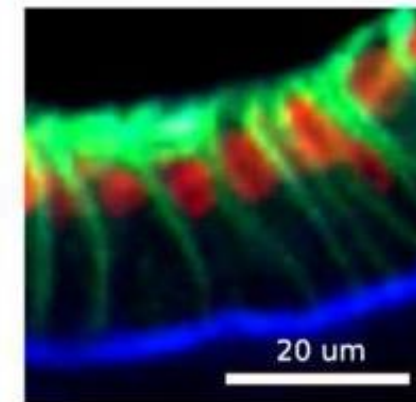
EpCAM/Phalloïdine/DRAQ5



Organoïde colonnaire (+24h)



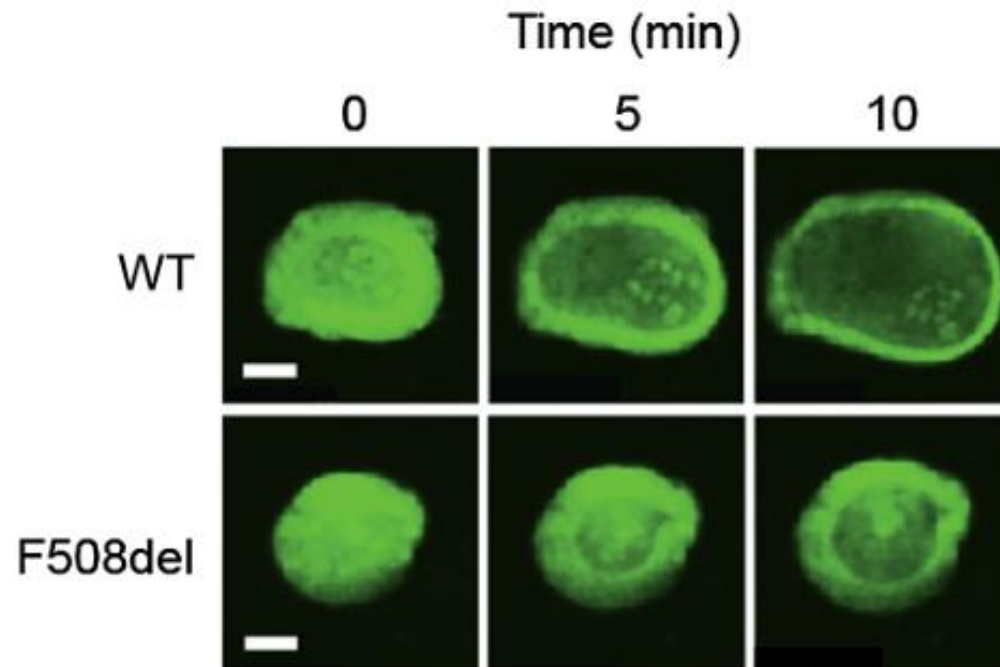
EpCAM/Phalloïdine/DRAQ5



(Source : Audrey Ferrand)

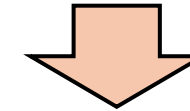
LES ORGANOÏDES

Applications médicales : modélisation de pathologies pour le criblage de médicaments

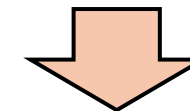


Test de fonctionnalité des canaux
CFTR utilisant la forskoline (active le

CFTR)



Criblage de médicaments



Médecine personnalisée

Organoïdes d'intestin observés au microscope confocal provenant de : WT : individu en bonne santé ; F508del : patient atteint de mucoviscidose *Calcéine pour visualiser les cellules vivantes*

(Source : Cell Stem Cell 19, October 6, 2016)

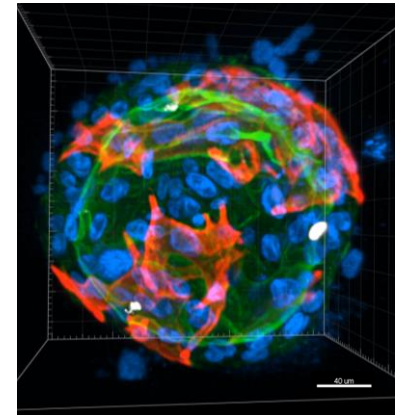
PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Du laboratoire de recherche au laboratoire STL

Placer les élèves dans une situation authentique

= **MISSION CONFIEE PAR UNE CHERCHEUSE**

PROJET ORGANOÏDES



Organoïdes = outils => Responsabiliser, permettre de **conscientiser l'intérêt d'acquérir les compétences du programme de biotechnologies et biochimie biologie**



PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 1 : Engagement dans le projet

Cours Biochimie Biologie : classe entière, 2h
C1

Préparer la conférence du Dr Audrey Ferrand

Séance 2 : Caractérisation du projet

Conférence : classe entière, 2h
C6

Présenter les organoïdes d'intestin et le projet de collaboration => mission

Séance 3 : Réalisation de la MISSION

AT Biotechnologies : ½ groupe, 4h
C1 à C6

Maîtriser les compétences pour réussir la mission de collaboration avec la chercheuse

Séance 4 : Réflexion sur les compétences du projet

AT Biotechnologies : ½ groupe, 1h
C5 C6

Prendre conscience de la nécessité de maîtriser les compétences

Séance 5 : Finalisation du projet

Visite IRSD : classe entière, 4h
C5 C6

Observer les organoïdes et faire communiquer les élèves sur les cellules souches

Séance 6 : Clôture du projet

AT Biotechnologie : ½ groupe, 2h
C3

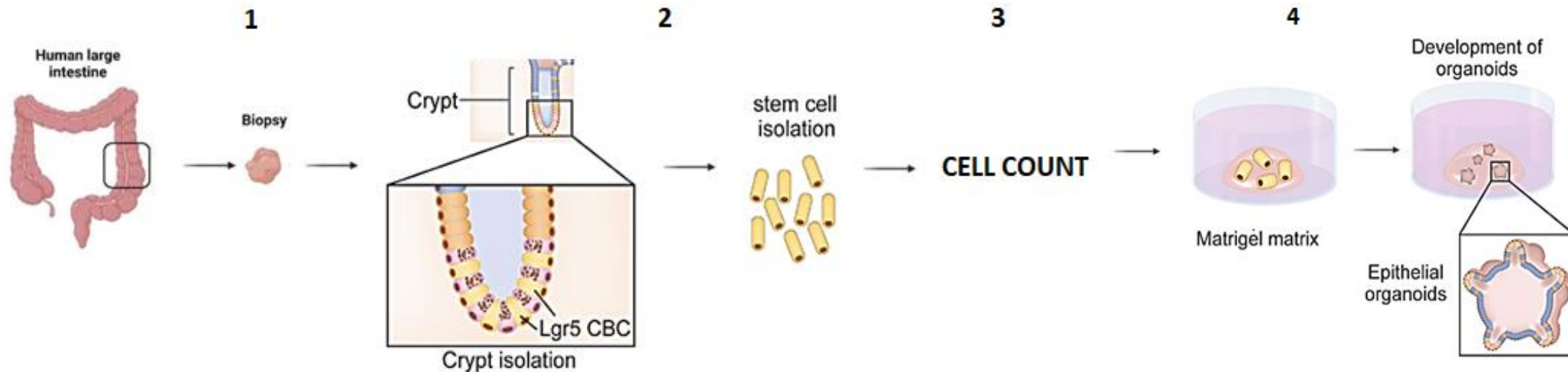
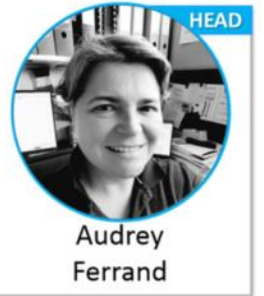
Bilan de la réalisation du projet (analyse réflexive) et questionnement éthique

PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 3 : Réalisation de la MISSION

OBJECTIF ? Maîtriser les compétences pour réussir la mission de collaboration avec la chercheuse

Les grandes étapes du protocole de création d'organoïdes utilisé à l'IRSD INSERM consistent à :



PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 3 : Réalisation de la MISSION

Étapes 1 à 4 : dissection, lavage colon, découpage

Étape 5 : introduction du fragment de colon dans le Tp dissociation

Étape 6 : vortexer 30 à 60 min

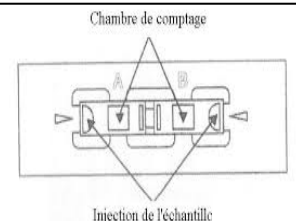
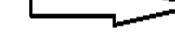
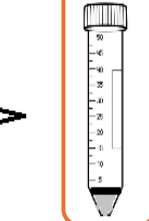
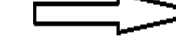
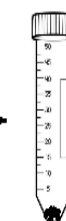
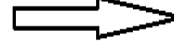
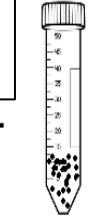
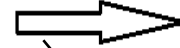
Étape 7 : enlever colon

Étape 8 : centrifuger (5 min, 1000 rpm)

Étape 9 : éliminer surnageant

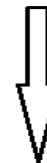
Étape 10 : Rajouter 1 à 3 mL Tp PBS

Étape 11 : Numérer en hématimètre de Malassez



Tube à centrifuger de 50 mL contenant Vtp dissociation = 5 mL

Suspension S



Étape 12 : centrifuger (5 min, 1000 rpm)



Étape 13 : éliminer surnageant



Étape 14 : annoter et congeler -18°C

PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 3 : Réalisation de la MISSION

NOM ELEVE		C3 : réaliser		C5:	
		Savoir faire	Présentatio		
<p>Q6. Écrire EG, EU et EVN pour calculer la concentration en cellules dans la suspension « S »</p> <p>$C_{N(\text{cellules épithéliales; Susp S})}$ en cellules.mL^{-1}.</p>		<p>1- J'écris l'EG en respectant les conventions de couleurs de métrologie. J'écris l'EU en vérifiant les unités et l'EVN en vérifiant les valeurs.</p> <p>2-Je décompose le " volume de comptage" en utilisant le volume d'une unité de comptage et le nombre d'unités de comptage comptées.</p> <p>EVN : Je présente le résultat en écriture scientifique. Je reprends la FM écriture scientifique, chiffres significatifs et expression du résultat.</p>			
Exploitation des résultats	<p>concentration en cellules dans la suspension « S »</p> <p>$C_{N(\text{cellules épithéliales; Susp S})}$ en cellules.mL^{-1}.</p>	valeurs.			
	<p>Q7. Exprimer le résultat final</p>	<p>2-Je décompose le " volume de comptage" en utilisant le volume d'une unité de comptage et le nombre d'unités de comptage comptées.</p> <p>EVN : Je présente le résultat en écriture scientifique. Je reprends la FM écriture scientifique, chiffres significatifs et expression du résultat.</p>			
	<p>1- Je calcule $U = 10\%$ de la valeur de $C_{N(\text{cellules;susp S})}$ en cellules.mL^{-1}, la puissance de 10 est imposée par le résultat de la concentration en cellules dans la suspension.</p> <p>2- J'écris le résultat de U avec 1 chiffre avant et après la virgule et à la même puissance que le résultat de la concentration en cellules dans la suspension. Je respecte la convention de couleur pour le mesurande.</p>				

PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 3 : Réalisation de la MISSION

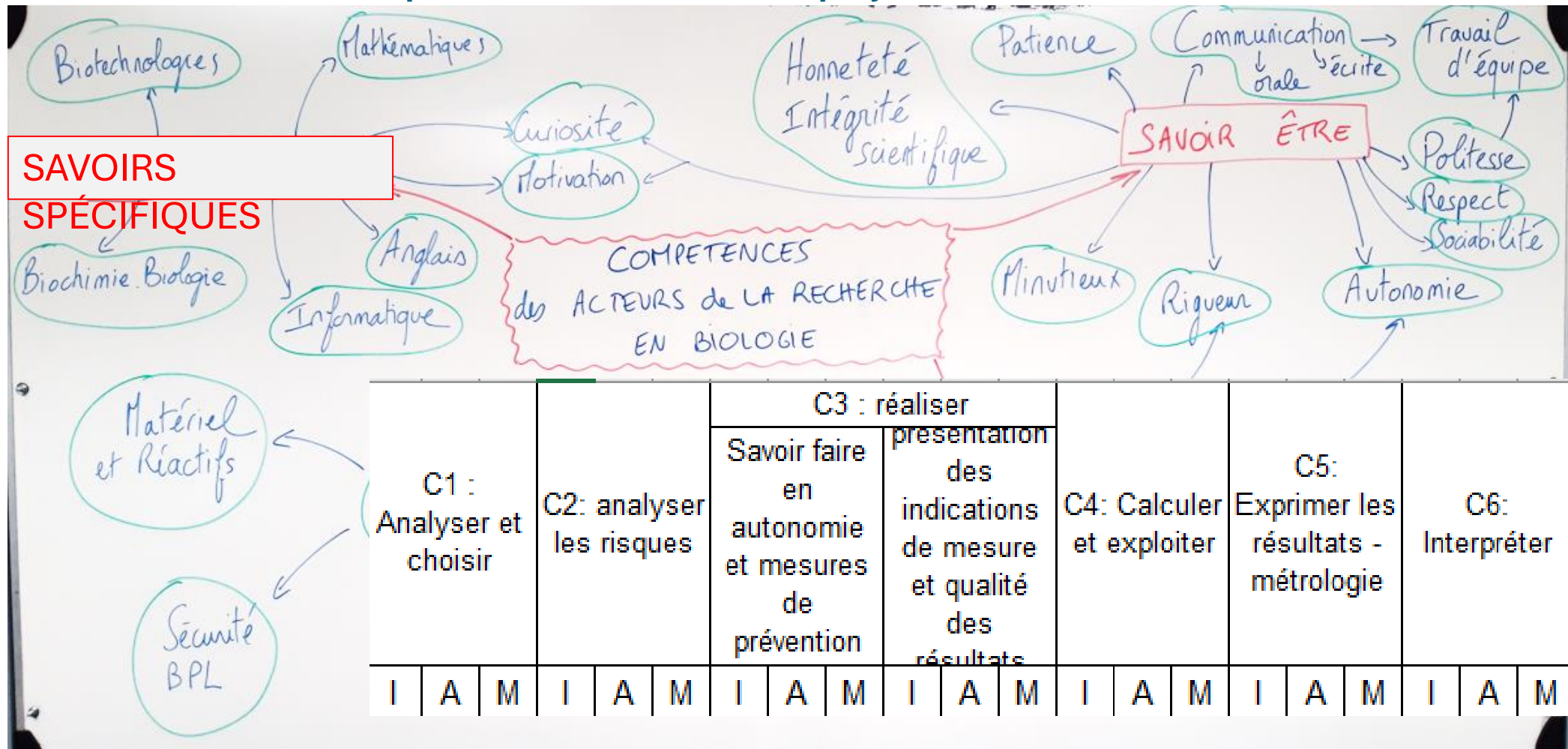
Exemple de Fiche de Transmission

Fiche de transmission d'un échantillon biologique à l'INSERM

Fiche de transmission d'un échantillon biologique à l'INSERM	
Nature de l'échantillon	
Noms des manipulateurs qui ont préparé l'échantillon	
Date de la préparation de l'échantillon	
Protocole de préparation de l'échantillon	
Nombres de cellules dans le culot	
Conservation de l'échantillon	

PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 4 : réflexion sur les compétences nécessaires au projet ORGANOÏDES

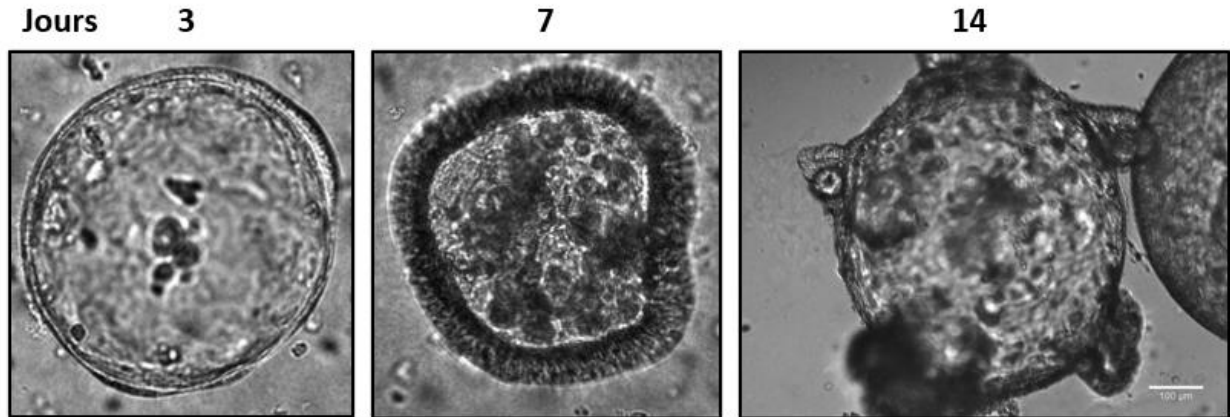


PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Séance 5 : finalisation du projet ORGANOÏDES / UNISTEM day

OBJECTIFS ?

- Observer organoïdes
- Découvrir laboratoire de recherche
- Echanger acteurs de la recherche
- Travailler l'argumentation



Source : IRSD

Séance 6 : clôture du projet ORGANOÏDES

OBJECTIFS ?

- Bilan sur le projet et les compétences : analyse réflexive
- Questionnement bioéthique : expérimentation animale

PROPOSITION SÉQUENCE : 1

Réalisation de la MISSION

Points positifs PROJET ORGANOÏDES

- Engagement des élèves
- Conscientisation des compétences
- Multidisciplinarité
- Ouverture bioéthique
- Retours positifs des élèves

Poursuite du travail

- Appropriation des critères de réussite
- Utilisation fichier bilan des compétences

PROPOSITION SÉQUENCE : 2

PUBLIC
CONCERNÉ

Etudiants de seconde année STS ABM dans un lycée avec la filière STL

CONTEXTE

Transmission d'informations inter services

THEME

Communication scientifique

COMPÉTENCES

Compétence 5.1.1 : Sélectionner et référencer les différents documents se rapportant à un sujet donné

Compétence 5.1.4 : Présenter un compte-rendu synthétique pour une recherche d'information

Compétence 5.3.7 : S'exprimer de façon claire et rigoureuse

SAVOIRS
ASSOCIÉS

-Thérapie cellulaire

-Cellules souches, différenciation, multiplication et maturation

PROPOSITION SÉQUENCE : 2

PRÉ-REQUIS

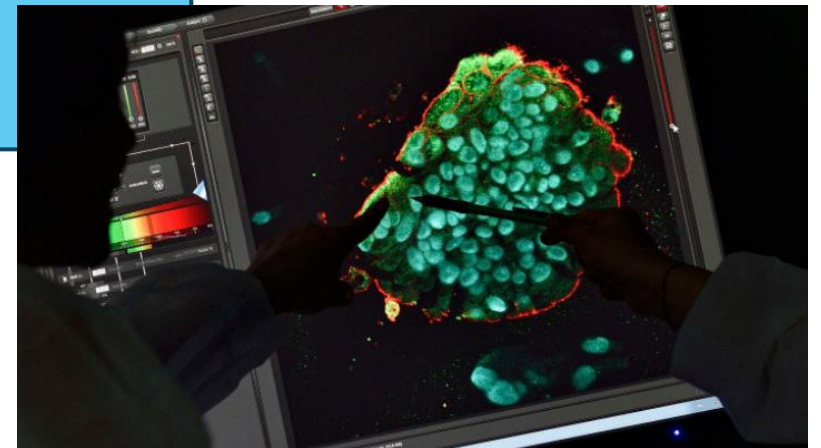
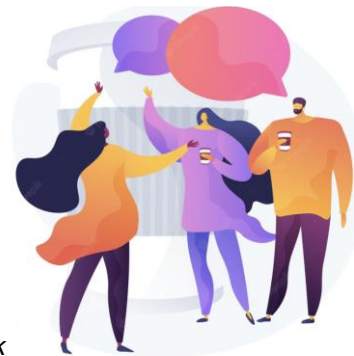
- Thérapie cellulaire
- Cellules souches, différenciation, multiplication et maturation

STRATÉGIE PEDAGOGIQUE

Pédagogie par projet

PROJET

Rencontre ELEVE-ETUDIANT
AUTOUR D'UN SUJET SCIENTIFIQUE ACTUEL



PROPOSITION SÉQUENCE : 2

OUTILS
PEDAGOGIQUES

Poster scientifique

Jeu



Motivation
Essai erreur
Différenciation
Interaction et
coopération
Application

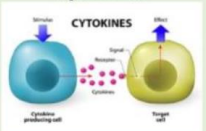




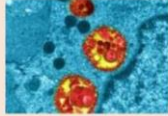
ORGANISATION

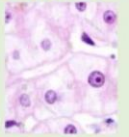
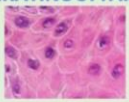

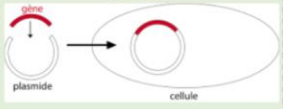



- Séance 1 : Initiation du projet : présentation
- Séance 2 : Finalisation : Correction des posters
- Séance 3 : Intervention en classe de T STL

PROPOSITION SÉQUENCE : 2

<p>PROJET Thérapie contre la maladie d'Alzheimer</p>  <p>Organoïde de Cerveau</p>	<p>PROJET Thérapie contre la maladie de Crohn</p>  <p>Organoïde d'Intestin</p>
<p>Besoins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - financement - matériel - cellule initiatrice - cytokine - signal d'activation 	<p>Besoins :</p> <ul style="list-style-type: none"> - financement - matériel - cellule initiatrice - cytokine - signal d'activation

<p>PARCOURS Action</p> <p>Cytokines</p> 	<p>PARCOURS Action</p> <p>Signal d'activation</p> 
<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = médiateur chimique = favorise la multiplication cellulaire 	<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = médiateur chimique = favorise l'orientation lignée cellulaire

<p>PARCOURS Embûche</p> <p>Concurrent</p> 	<p>PARCOURS Embûche</p> <p>Virus</p> 
<p>Problème :</p> <ul style="list-style-type: none"> = prend votre financement qui repart dans la pioche 	<p>Problème :</p> <ul style="list-style-type: none"> = contamination des cellules = votre cellule initiatrice repart dans la pioche

<p>PARCOURS Cellule initiatrice</p> <p>CELLULE SOUCHE HEPATIQUE</p> 	<p>PARCOURS Cellule initiatrice</p> <p>CELLULE SOUCHE KÉRATINOCYTAIRE</p> 	<p>PARCOURS Cellule initiatrice</p> <p>ENTEROCYTE</p> 	<p>PARCOURS Laboratoire</p> <p>Vecteur</p> 	<p>PARCOURS Laboratoire</p> <p>Gène d'intérêt</p> 	<p>PARCOURS Laboratoire</p> <p>Matériel</p> 	<p>PARCOURS Laboratoire</p> <p>Financement</p> 
<p>Compétence : multipotente</p> <ul style="list-style-type: none"> = mitotique = capable de se multiplier = indifférenciée = capable de se différencier en cellules du foie 	<p>Compétence : multipotente</p> <ul style="list-style-type: none"> = mitotique = capable de se multiplier = indifférenciée = capable de se différencier en cellules de la peau 	<p>Compétence : différenciée</p> <ul style="list-style-type: none"> = amitotique = ne peut pas se multiplier = spécialisée en cellule de l'intestin => besoin de vecteur et de gène d'intérêt pour devenir IPS 	<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = outil de biologie moléculaire = permet de d'insérer le gène d'intérêt pour créer des cellules IPS 	<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = permet de transformer des cellules différenciées en cellules multipotentes ips 	<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = outils de biologie cellulaire nécessaire à la manipulation des cellules souches 	<p>Compétence :</p> <ul style="list-style-type: none"> = permet de faire fonctionner le laboratoire

PROPOSITION SÉQUENCE : 2

Séance 1

Objectifs – Réviser
– Réaliser un document de communication

Méthodologie

Présentation du projet



Recherche scientifique
Poster scientifique
Interaction avec T STL
Jeu
Questionnaire

Constitution des équipes



Choix du thème
Méthode poster

Test du jeu

Remise en mémoire des connaissances
Apprentissage des règles



PROPOSITION SÉQUENCE : 2

Séance 2

Objectif – Finaliser le document scientifique

Méthodologie – Travail en équipe

– Questionnaire à prévoir



CRISPR une révolution pour la biologie

INTRODUCTION
Cette nouvelle méthode désignée sous le nom CRISPR, utilise une nucléase appelée Cas9 pour couper l'ADN et permettre la réécriture du matériel génétique.
Elle peut être utilisée en biotechnologie, pour la recherche biomédicale ainsi que pour des applications thérapeutiques.

CRISPR permet de :

- corriger une mutation responsable de maladie héréditaire.
- rendre non fonctionnels un gène/élément non codant.
- évaluer les conséquences phénotypiques des mutations.

UNE INVENTION RÉVOLUTIONNAIRE ...

À savoir

- Le système CRISPR utilise un ARN guide (ARNg)
- Dans la nature, ce système est présent chez les bactéries qui l'utilisent pour dégrader des séquences étrangères d'ADN provenant de plasmides ou de virus.
- Les ciseaux moléculaires CRISPR-Cas9 permettent alors de supprimer un gène ou bien de le remplacer par un gène similaire provenant d'un autre individu.
- Cette invention présente de nombreux avantages :
 - une seule protéine (Cas9) est nécessaire
 - de nouveaux ARN guides sont très faciles à produire
 - le système CRISPR permet de cliver un ADN méthylé.

Les ciseaux CRISPR-Cas9 sont composés de 2 parties :

- La partie CRISPR**, qui contient une séquence d'ADN chargée de reconnaître le gène cible, se déroule l'ADN pour en séparer les deux brins avant de se lier sur l'un d'eux.
- La partie Cas9** est une enzyme chargée de découper l'ADN au niveau du gène cible.

DES APPLICATIONS QUI SE SONT MONTRÉES EFFICACES

- Correction du gène CFTR dans la muqueuse et à l'origine de la mucoviscidose.
- Mutation du gène codant la dystrophine pour créer un modèle de la dystrophie de Duchenne chez le rat.
- Mutations du gène de l'amyotrophie latérale, le parasite responsable de la malaria dans un modèle murin.
- Mutations simulées de plusieurs gènes chez le poisson zèbre.
- D'autres mutations ont été réalisées dans des chiens, des rongeurs, des souris et des primates non humains.

Les chercheurs ont rétabli la production de dystrophine chez les chiens à l'aide de la technique CRISPR-Cas9

CONCLUSION

Ce travail a ouvert la voie des applications de correction in vivo pour de nombreux gènes responsables de maladies héréditaires.

Cependant, la modification récente d'embryons humains avec le système CRISPR/Cas9 a montré que l'utilisation de cette technologie peut aussi soulever des controverses.

Un groupe de chercheurs a d'ailleurs plaidé en faveur d'une utilisation prudente de cette technologie chez l'homme.

Université de Lille

PROPOSITION SÉQUENCE : 2

Séance 3

Objectifs – S'exprimer à l'oral
– Interagir avec ses pairs

Méthodologie – Présentation des posters répartis dans la salle
– Jeu



PROPOSITION SÉQUENCE : 2

EVALUATION

- Poster :

- Compétences :
- Sélectionner et référencer les différents documents
 - Présenter un compte-rendu synthétique pour une recherche d'information

-Présentation orale

- Compétence :
- s'exprimer de manière claire et rigoureuse

POINTS DE VIGILANCE

- Organisation temporelle
- Coordination
- Consolidation

POINTS POSITIFS

- Démarche de projet
- Culture scientifique
- Interaction
- Transposition du projet
- Entraînement pour une épreuve

GRILLE D'ÉVALUATION : PRÉSENTATION DUN POSTER SCIENTIFIQUE		STS ABM		
INDICATEURS		I	A	M
DEMARCHE DE PROJET				
	Choix pertinent des documents			
	Informations recueillies conformes aux résultats attendus			
	NOTE /4			
CONTENU DU POSTER				
	Pertinence de l'argumentation			
	Qualité de l'argumentation			
	Rigueur du plan			
	Adaptation à l'auditoire			
	Qualité de l'argumentation			
	NOTE /6			
LISIBILITÉ DU POSTER				
	Présentation sous forme adéquate des informations			
	Connaissance de l'outil informatique			
	Qualité des documents préparés			
	Sources, légendes			
	NOTE/4			
EXPRESSION ORALE				
	Niveau de langue courant ou soutenu			
	Pertinence de l'argumentation			
	NOTE /6			
	NOTE /20			
Commentaires :				

PROPOSITION SÉQUENCE : 2