

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Biologie Cellulaire, Biologie du développement

Par

**Elise LOFFET**

## **Rôle du Système Nerveux Entérique dans le développement et la maturation de l'intestin**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 22 novembre 2021

Unité de recherche : INSERM U1235 - TENS

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Nadège Bondurand  
Sandrine Faure

DR – Université Paris Est, INSERM U163 – Institut Imagine  
CR – Université de Montpellier I – CNRS U9214, INSERM U1046

### **Composition du Jury :**

Président : Pascal de Santa Barbara

DR – Université de Montpellier I, CNRS U9214, INSERM U1046

Examineurs : Sophie Creuzet  
Nicolas Chevalier  
Michel Neunlist

DR – Université de Paris Saclay, CNRS U9197 – Institut NeuroPSI  
CR \_ Université Paris Diderot, CNRS U7057 - MSC  
DR – Université de Nantes, INSERM U1235 - TENS

Dir. de thèse : Philippe Naveilhan  
Co-encadrant de thèse : Maxime Mahé

CR – Université de Nantes, INSERM U1235 - TENS  
CR – Université de Nantes, INSERM U1235 - TENS

---

# REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier mes encadrants de thèse, Maxime et Philippe, pour leur encadrement et leur soutien au cours de ma thèse. Merci particulièrement à Maxime d'avoir pris à cœur son rôle de mentor, à la fois dans des dimensions scientifiques et humaines. Tu as toujours su faire preuve d'exigence dans mon travail tout en restant encourageant et je t'en suis reconnaissante.

Merci également à Michel Neunlist de m'avoir accueillie dans son laboratoire, dans lequel il entretient à la fois la curiosité et l'intégrité scientifique, mais aussi la cohésion d'équipe et la bonne entente.

Je remercie également les autres chercheurs de l'U1235, pour leurs précieux conseils scientifiques. Plus largement je remercie la communauté scientifique Nantaise, notamment Laurent David et Philippe Hulin, pour leur implication dans le partage de leur expertise et des connaissances scientifiques dont j'ai pu bénéficier au cours de ma formation.

Merci tout particulièrement à Lisa Brossard, la meilleure assistante ingénieure au monde. Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans son travail acharné et sa rigueur, mais aussi son soutien et son entrain naturel. Lisa, qu'importe où la vie nous mènera, les organoïdes seront toujours dans ton cœur et tu seras toujours dans le mien ! Merci également au reste de la team organoïdes : Killian, Anna, Simon, Yevgeniya et Philippe. Quel bonheur de travailler avec des personnes si conviviales.

Merci à tous étudiants de l'U1235 pour ces trois années passées dans la joie et la bonne humeur. En premier lieu je remercie Jacques Gonzales, pour son soutien qui a commencé à Nantes dans le bureau des thésards et qui a continué jusqu'au Michigan. Je chérirai toujours le souvenir de la ripaille en salle de pause ou par skype ! Merci également à Johanna Z, pour tous ces beaux moments, au labo ou en rando dans les alpes ; et Amélie L, pour sa bonne humeur. Merci aux autres doctorants, les anciens : Chloé, Lucille, Julie et Alice, pour leur accueil chaleureux ; et les nouveaux : Adrien, Marine, Morgane, Killian et Rodrigue, qui reprennent le flambeau.

Je remercie chaudement toute l'équipe de l'unité TENS 1235. Je suis très heureuse d'avoir pu faire ma thèse dans un laboratoire qui sait si bien allier science et convivialité ! Merci particulièrement à Katy et Karelle pour leur travail administratif et surtout pour leur dévouement à la cohésion d'équipe à TENS.

Merci finalement à mes amis, particulièrement Marie A. qui a su être là pour me rassurer dans les moments de stress, en partageant son rhum et son énergie débordante. Merci à Sarah C, de m'avoir donné l'impression d'avoir le métier le plus cool au monde en m'écoutant parler avec attention pendant bien trop longtemps. Je remercie également mes parents et mes frères Victor et Jean, d'avoir fait l'effort d'essayer de comprendre ce que sont une cellule souche et un organoïde, et de m'avoir soutenue tout au long de mes études.



---

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE : COURT HISTORIQUE DE L'EMBRYOLOGIE</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>13</b>
I. LE TUBE DIGESTIF .....	14
A. <i>Physiologie digestive adulte</i> .....	14
Histologie .....	14
Morphologie et composition cellulaire de l'intestin grêle.....	15
Fonctions motrices.....	17
B. <i>Le système nerveux entérique</i> .....	19
Physiologie .....	19
Fonctions .....	22
II. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU TUBE DIGESTIF .....	24
A. <i>Vue globale</i> .....	24
Notions d'embryologie .....	24
Organogenèse du tube digestif .....	26
B. <i>Endoderme et épithélium intestinal</i> .....	26
Régionalisation.....	26
Morphogenèse de l'épithélium et cytodifférenciation.....	27
C. <i>Mésoderme et mésenchyme intestinal</i> .....	30
Le mésoderme splanchnique.....	30
Mésothélium .....	30
Couches musculaires.....	31
Vascularisation intestinale.....	33
Autres populations mésenchymateuses .....	35
D. <i>Ectoderme et crête neurale entérique</i> .....	35
Définition et intérêt .....	35
Migration et devenir de la crête neurale.....	37
La crête neurale entérique - migration et colonisation.....	38
Mise en place et développement fonctionnel du SNE.....	42
D. <i>Pathologies de développement du SNE</i> .....	45
III. LE DÉVELOPPEMENT DES ORGANES EST UN CO-DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTS TISSUS EMBRYONNAIRES.....	47
A. <i>Interactions mésoderme-endoderme</i> .....	47
Régionalisation.....	47
Organisation structurale .....	47
Interactions mécaniques.....	49
B. <i>Co-développement avec la crête neurale</i> .....	50
Muscles et SNE.....	50
Vascularisation et SNE.....	51
IV. ETUDE DU DÉVELOPPEMENT (ET CO-DÉVELOPPEMENT) <i>IN VITRO</i> .....	52
A. <i>Ingénierie des cellules souches</i> .....	52
B. <i>Développement du tube digestif in vitro</i> .....	53
<b>OBJECTIFS DE THÈSE</b> .....	<b>57</b>

<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>59</b>
ARTICLE 1 : PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED INTESTINAL ORGANIDS WITH AN ENTERIC NERVOUS SYSTEM .....	59
ARTICLE 2 : THE HUMAN DEVELOPING ENTERIC NERVOUS SYSTEM PATTERNS INTESTINAL MESENCHYME THROUGH BMP SIGNALING .....	96
<b>RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES</b> .....	<b>125</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>136</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>149</b>
REVUE : « INTESTINAL STEM CELL-ON-CHIP TO STUDY THE HUMAN GUT » .....	149
REVUE DANS MÉDECINE ET SCIENCES (2019) : « FAÇONNER L'INTESTIN À PARTIR DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES » .....	150

---

# LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

## PUBLICATIONS :

- **Loffet E**, Brossard L, Mahe MM. Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system. *Methods Cell Biol.* 2020;159:175-199. doi: 10.1016/bs.mcb.2020.04.012. Epub 2020 May 27. PMID: 32586442.

- **Loffet E**, Brossard L, Brown N, Sundaram N, Poling HM, Neunlist M, Helmraath MA, Mahe MM. The human developing enteric nervous system patterns intestinal mesenchyme through BMP signaling (en préparation)

## PUBLICATIONS NON PRÉSENTÉS DANS LA THÈSE :

- **(Revue)** Flatres C, **Loffet É**, Neunlist M, Mahé MM. Organoïdes (2) - Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines [From human pluripotent stem cells to custom-made intestinal organoids]. *Med Sci (Paris)*. 2019 Jun-Jul;35(6-7):549-555. French. doi: 10.1051/medsci/2019096. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31274085.

- **(Revue)** Siwczak, F., **Loffet, E.**, Kaminska, M., Koceva, H., Mahe, M. M., & Mosig, A. S. (2021). Intestinal Stem Cell-on-Chip to Study Human Host-Microbiota Interaction. *Frontiers in Immunology*, 0, 5240. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.798552>

## COMMUNICATIONS (PRÉSENTATIONS ORALES) :

- "Rôle du système nerveux entérique dans le développement et la maturation de l'intestin". Rencontre de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD). Juin 2018, Nantes, France.

- "Contribution of the ENS progenitor cells on the gut mesoderm development in human intestinal organoids". French Society for Stem Cell Research (FSSCR) 2nd annual meeting. Décembre 2018, Nantes, France.

- "Rôle du système nerveux entérique dans le développement et la maturation de l'intestin". Rencontre de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD). June 2019, Nantes, France.

- "Rôle du système nerveux entérique dans le développement et la maturation de l'intestin". Rencontre annuelle du GFNG. Juin 2019, Nantes, France.

- "Exploring the developing enteric nervous system and its interaction with surrounding tissues in innervated intestinal organoids". DHU2020 "e-nnovative technologies in precision medicine: generating and analyzing data from single cell to 7 billion humans". Octobre 2019, Nantes, France.

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- "Exploring interactions between the developing enteric nervous system and its surrounding tissues with an intestinal organoid model". INSERM-Aviesan: From 3D culture to organoid. Décembre 2019, Paris, France.
- Role of the enteric nervous system in the development of the intestinal mesenchyme. FSO 2021 - Frontiers of stem cell and organoid technology (FSO2021): From Basic to Bedside. En ligne (international), janvier 2021.
- "Exploring the interactions between the developing enteric nervous system and its surrounding tissues with an intestinal organoid model and single-cell sequencing". Federation of Neurogastroenterology and Motility (FNM) 2020. Mars 2020, Adelaide, Australie (reporté en ligne, avril 2021).

### COMMUNICATIONS (POSTER) :

- "Single-cell analysis of human intestinal organoids reveals the ENS progenitor cells contribution on the gut mesoderm development". Journées Ouvertes Biologie Informatique et Mathématiques (JOBIM). Juillet 2019, Nantes, France.
- "Investigating the role of ENS progenitor cells on gut mesoderm development with innervated human intestinal organoids". Copenhagen Bioscience Conference 17 - Intestinal organoids - from stem cells to metabolism and microbiome interactions. Octobre 2019, Falvrhöm, Danemark.
- "Exploring the interactions between the developing enteric nervous system and its surrounding tissues with an intestinal organoid model and single-cell sequencing". EMBO | EMBL Symposium: Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture. Octobre 2020, en ligne (international).
- "Exploring early neuronal interactions in the developing human intestine using iPSC-derived organoids: implications in Hirschsprung's disease". Colloque inter-régional ouest "De la recherche aux traitements dans les maladies rares". Avril 2021, en ligne (national).

### PRIX OBTENU :

- Prix poster Colloque inter-régional ouest "De la recherche aux traitements dans les maladies rares".

---

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**5-HT** : sérotonine  
**BMP** : Bone Morphogenic protein  
**BEI** : Barrière Epithéliale Intestinale  
**CDX** : Caudal type Homeobox  
**CGE** : Cellule Gliale Entérique  
**ChAT** : Choline Acétyl Transferase  
**CIC (ICC)** : Cellule Interstitielle de Cajal (Interstitial Cell of Cajal)  
**cNCC** : cranial neural Crest Cell (Cellule de la crête neurale Crâniale)  
**CMM** : Complexes Migratoires Moteurs  
**CSI (ISC)** : Cellule Souche Intestinale (Intestinal Stem Cell)  
**EC** : Endothelial Cells (Cellules endothéliales)  
**EDNRB** : Endothelin Receptor Type B  
**EGF** : Epidermal Growth factor  
**ENCC** : Enteric Neural Crest Cell (Cellule de la Crête Neurale Entérique)  
**ET3** : Endothelin 3  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**GDNF** : Glial Derived Neurotrophic Factor  
**GFAP** : Glial Fibrillary Acid Protein  
**HH** : HedgeHog  
**Hhex** : Hematopoietically Expressed Homeobox  
**hESC** : human Embryonic Stem Cell (Cellule Souche Embryonnaire Humaine)  
**hiPSC** : human Induced Pluripotent Stem Cell (Cellule Souche Pluripotente Induite)  
**hPSC** : human Pluripotent Stem Cell (Cellule Souche Pluripotente humaine)  
**HIO** : Human Intestinal Organoid  
**HIO+ENS** : Human Intestinal organoid with and Enteric Nervous System  
**HSCR** : Hirschsprung's disease  
**IHH** : Indian HedgeHog  
**IPAN** : Intrinsic Primary Afferent Neuron (Neurone Afférent Intrinsèque)  
**ISEMF** : Intestinal SubEpithelial MyoFibroblasts (myofibroblastes sub-épithéliaux)  
**MEC (ECM)** : Matrice Extracellulaire (Extracellular Matrix)  
**NC** : Neural Crest (Crête Neurale)  
**NCC** : Neural Crest Cell (Cellule de la Crête Neurale)  
**NOS** : Nitric Oxyde Synthase  
**POIC** : Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique  
**RET** : REarranged during Transfection  
**RA** : Retinoic Acid (Acide Rétinoïque)  
**RNAseq** : RNA sequencing (séquençage ARN)  
**SHH** : Sonic HedgeHog  
**scRNAseq** : single-cell RNA sequencing (séquençage ARN en cellule unique)  
**SMAD** : Mothers Against DPP Homolog 1  
**SMC** : Smooth Muscle Cell (cellule musculaire lisse)  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SNE** : Système Nerveux Entérique  
**SNP** : Système nerveux Périphérique  
**TAGLN** : Transgeline (gene/protéine) – aussi connu comme **SM22** (protéine)  
**TEM (EMT)** : Transition Epithéliale-Mésenchymateuse (Epithelial-Mesenchymal Transition)  
**TGFβ** : Transforming Growth-Factor β  
**vNCC** : vagal Neural Crest Cell (Cellule de la Crête Neurale Vagale)  
**vSMC** : Vascular Smooth Muscle Cell (cellule vasculaire musculaire)  
**WNT** : (Wingless/integrated)

---

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : LA THÉORIE DES FEUILLETS EMBRYONNAIRES, EN 1817 ET EN 2020 .....	12
FIGURE 2 : PHYSIOLOGIE DIGESTIVE .....	14
FIGURE 3 : AXE CRYPTO-VILLOSAIRE ET NICHE SOUCHE INTESTINALE.....	16
FIGURE 4 : MÉCANISMES DE MOTRICITÉ DE L'INTESTIN GRÊLE .....	17
FIGURE 5 : ORGANISATION STRUCTURELLE DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE .....	19
FIGURE 6 : TYPES DE NEURONES DU SNE .....	20
FIGURE 7: DIVERSITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES NEURONES ET CELLULES GLIALES ENTÉRIQUE, CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS .....	22
FIGURE 8 : FIN DE L'EMBRYOGENÈSE ET ORGANOGÉNÈSE DE L'INTESTIN .....	25
FIGURE 9 : ARBRE DE DIFFÉRENCIATION SCHÉMATISANT LA PROVENANCE EMBRYONNAIRE DES DIFFÉRENTS TISSUS DE L'ORGANISME .....	25
FIGURE 10 : GRADIENTS DE MORPHOGÈNES ET GÈNES MARQUEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉGIONALISATION DU TUBE DIGESTIF .....	27
FIGURE 11 : MÉCANISMES DE FORMATION DES VILLOSITÉS.....	28
FIGURE 12 : APPARITION DES TYPES CELLULAIRES ADULTES DE LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE DANS DES DONNÉES SCRNASEQ D'INTESTIN FOÉTAL HUMAIN.....	29
FIGURE 13 : FORMATION DU MÉSOTHÉLIUM CHEZ LA SOURIS.....	30
FIGURE 14 : DIFFÉRENCIATION DE CELLULES DU MÉSODERME EN CELLULES MUSCULAIRES LISSE ET MARQUEURS ASSOCIÉS .....	31
FIGURE 15 : DÉVELOPPEMENT DES COUCHES MUSCULAIRES DE L'INTESTIN .....	33
FIGURE 16 : DÉVELOPPEMENT DU MÉSOTHÉLIUM ET DE LA MICROVASCULARISATION INTESTINALE CHEZ LA SOURIS ...	35
FIGURE 17 : FERMETURE DU TUBE NEURAL ET DÉLAMINATION DES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE .....	36
FIGURE 18 : RÉGIONS DE LA CRÊTE NEURALE ET LEUR ROUTE DE MIGRATION.....	37
FIGURE 19 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA MIGRATION DES ENCC .....	40
FIGURE 20 : SCHÉMA DES ÉTAPES DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE LA CRÊTE NEURALE EN NEURONES ET CELLULES GLIALES ENTÉRIQUES.....	43
FIGURE 21 : PRÉSENTATION DE LA MALADIE DE HIRSCHSPRUNG « CLASSIQUE » ET « SKIP-SEGMENT ».....	46
FIGURE 22 : LES INTERACTIONS ENTRE MÉSODERME ET ENDODERME DANS LA FORMATION STRUCTURALE DU TUBE DIGESTIF SONT PARTICULIÈREMENT LIÉS AUX VOIES DE SIGNALISATION HH ET BMP .....	48
FIGURE 23 : MORPHOGENÈSE DU TUBE DIGESTIF, <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> .....	53
FIGURE 24 : CARACTÉRISATION DES ORGANOÏDES INTESTINAUX DÉRIVÉS DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES .....	55
FIGURE 25 : STRATEGIE DE L'ETUDE REALISEE.....	96
FIGURE 26: MODIFICATIONS DE LA MEC ENTRE LES HIO ET HIO+ENS .....	127
FIGURE 27 : MÉCANISMES DE LA VOIE BMP .....	129

---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE : COURT HISTORIQUE DE L'EMBRYOLOGIE

## Aristote et les organoïdes

Si l'humanité s'est de tout temps intéressée à ses origines, les mécanismes permettant le développement des nouveaux êtres vivants lui sont longtemps restés énigmatiques. Jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'opinion scientifique sur la genèse des embryons animaux est partagée entre deux théories principales : la préformation et l'épigenèse. Selon la théorie de la préformation, les embryons sont des versions miniatures de l'organisme adulte : leurs membres et organes sont déjà formés lors de la conception voire même avant, dans les gamètes (mâles ou femelles, selon les écoles), et ils ne font que grandir au cours de la gestation. La théorie de l'épigenèse, quant à elle, stipule au contraire que les différentes parties du corps proviennent à l'origine d'une masse **indifférenciée**, et apparaissent ensuite progressivement au cours de la croissance embryonnaire. Cette théorie existe depuis Aristote (384-322 av JC), qui, ayant observé le cœur d'embryons de poulet battre avant l'apparition des autres organes, en conclut que le poussin acquiert sa forme progressivement <sup>1</sup>.

Pendant les deux millénaires qui suivent la mort d'Aristote, ces deux théories existent au coude à coude. La préformation est d'ailleurs la théorie favorisée au XVII<sup>ème</sup> siècle, époque à laquelle les premiers utilisateurs de microscopes affirment observer des « homonculus » (humains miniatures) dans la semence mâle (il s'agit en fait de spermatozoïdes). Ce n'est finalement qu'avec l'apparition et le développement de l'embryologie expérimentale au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle, que l'épigenèse l'emporte sur la préformation. Hans Driesch, un étudiant de Haeckel, démontre par exemple en 1891 que les cellules d'embryons d'oursins divisés expérimentalement au stade de blastomères (2 cellules et 4 cellules) sont capables de former des oursins entiers <sup>2</sup>. Il montre donc que la première cellule d'un embryon ne contient pas tout l'organisme déjà formé, mais il prouve ainsi également l'existence de cellules capables de former tous les tissus de l'être en développement : ce sont des **cellules souches** (« Stammzelle » en allemand, terme utilisé pour la première fois en 1877 par Haeckel, dans son livre *Anthropogenie* <sup>3</sup>).

Avant cela, à la fin du XVI<sup>ème</sup> siècle et toujours dans l'optique de l'affrontement entre la préformation et l'épigenèse, Caspar Friedrich Wolff observe que certaines parties de l'embryon, notamment l'intestin, commencent comme une couche de cellules qui se replie sur elle-même. Wolff y voit seulement un argument pour l'épigenèse, mais ses observations – qui décrivent pour la première fois l'organisation de l'embryon en couche de cellules – marquent également le début de la théorie des **feuilletés embryonnaires** <sup>4</sup>. Celle-ci naît réellement en 1817 avec Christian Pander, qui décrit l'existence de trois couches cellulaires dans le blastomère : l'une externe ; une autre, interne ; qui ensemble donnent naissance à une troisième couche, intermédiaire (figure 1.A.). La théorie sera ensuite raffinée par Robert Remak dans les années 1850, qui définit expérimentalement le devenir tissulaire des feuilletés embryonnaires : la « peau extérieure » donne la peau et le système nerveux, la « peau intérieure » donne le système digestif et organes associés ; et la « peau du milieu » donne notochorde, squelette, muscles et système vasculaire. Les noms par lesquels nous les connaissons de nos jours (endoderme, ectoderme, mésoderme) leur seront donnés par

Thomas Henry Huxley, qui étend la théorie des feuillet embryonnaires aux différents clades du règne animal, lui donnant ainsi sa dimension évolutive <sup>5</sup>.

Si l'influence d'un feuillet embryonnaire sur un autre est supposée par Pander dès l'établissement de la théorie, le devenir final des cellules (c'est-à-dire, les tissus et types cellulaires qu'elles peuvent former) reste rigide et prédestiné - prescrit par le feuillet embryonnaire dont elles font ou feront partie - dans la conception initiale de la théorie. Mais dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, cette rigidité est contestée lorsque, de nouveau grâce au développement de l'embryologie expérimentale à partir des années 1890, il devient possible de manipuler physiquement des embryons dans le but de mieux comprendre la formation des structures embryonnaires. Ainsi dans les années 1900 à 1920, des embryologistes, dont Hans Spemann, développent des techniques de manipulations d'embryons animaux, dont la transplantation inter-espèces. En 1924, son étudiante, Hilde Mangold, prélève sur des gastrulas de salamandres grises, des lèvres supérieures de blastopores (future notochorde) et les transplante sur l'ectoderme ventral d'un embryon de salamandre d'une espèce similaire dont l'épiderme est incolore. Le site de transplantation développe alors une nouvelle tête et un corps partiel (contenant donc des tissus de plusieurs feuillet embryonnaires) qui sont incolores ; c'est-à-dire : de la couleur de l'embryon receveur et non donneur du transplant. Les tissus formés ont donc été induits par le transplant, mais sont constitués de cellules non transplantées. Ces expériences permettent ainsi de définir de nouveaux concepts : l'**induction**, mécanisme selon lequel une population embryonnaire influe sur le devenir cellulaire d'une autre ; le « **patterning** », le résultat de l'induction qui permet la formation de structures cohérentes ; et l'« **organizer** » (organisateur), qui décrit les populations cellulaires capables d'induction et de patterning <sup>6</sup>.

Le XX<sup>ème</sup> siècle est profondément marqué par le développement de domaines qui révolutionnent la biologie : la génétique tout d'abord, puis la biologie moléculaire. Dans les années 1950 est établi le dogme central (ADN — ARN — Protéine) de la biologie moléculaire ; puis dans les années 1960, le déchiffrement du code génétique (codons ARN de 3 lettres pour un acide aminé protéique). Ces découvertes révolutionnaires permettent dans les années 70 le développement des techniques de biologie moléculaire qui sont fondamentales aux sciences biologiques actuelles : le séquençage Sanger en 1977, et la PCR en 1988 ; pour ne citer que les plus importantes. Le développement de ces techniques étant contemporain à celui de l'informatique, dès le milieu des années 80, des logiciels informatiques permettent l'analyse de l'ADN séquencé et avec elle, le développement de la bio-informatique en tant que discipline à part entière (même si celle-ci naît en fait dans les années 60, avec Margaret Dayhoff et l'analyse de séquences protéiques <sup>7</sup>). En 2005 l'arrivée des technologies de séquençages nouvelles générations (NGS), dont le coût largement inférieur aux technologies précédentes permet la démocratisation du séquençage ADN, est rapidement suivi par le séquençage ARN : on peut désormais détecter quels gènes sont exprimés par un tissu ou des cellules en culture. Finalement, en 2009 Tang et al. combinent le séquençage ARN haut débit à une technique développée en 1990 par Brady et al. qui permet l'amplification d'ADNc de cellules isolées, créant ainsi le séquençage ARN en cellules uniques (single-cell RNAseq) <sup>8</sup>.

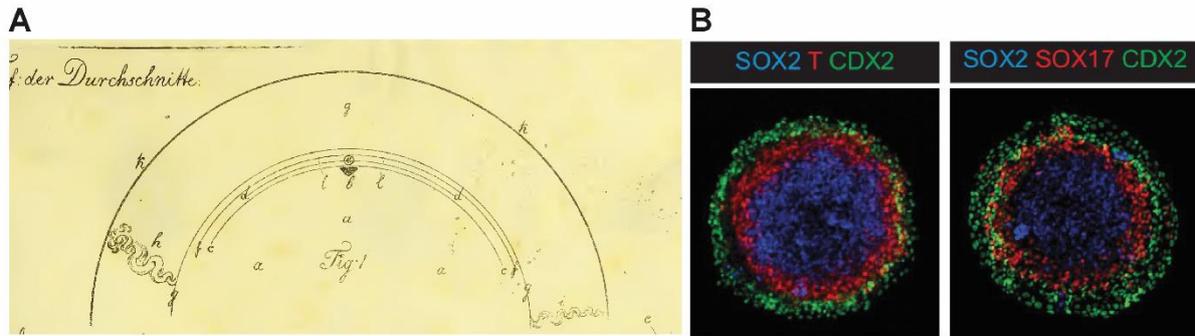
Pendant, ce temps, l'embryologie, influencée par la révolution moléculaire, s'éloigne dans les années 80 de ses préoccupations descriptives et tissulaires pour se concentrer sur l'identification des gènes qui induisent le développement des types cellulaires et structures embryonnaires. Porté par la découverte des gènes Homéobox chez la drosophile, les biologistes du développement s'attèlent à identifier les gènes capables de réguler le devenir

des cellules. En 1969, Britten et Davidson publient un papier qui prédit l'existence d' « opérons développementaux » : des éléments régulateurs présents dans l'ADN qui seraient capables d'expliquer non seulement la synthèse différente de protéines entre types cellulaires, mais aussi l'expression coordonnée de protéines. C'est ainsi qu'est découvert MyoD, le premier gène identifié comme capable de déclencher la **différenciation cellulaire**. Plusieurs groupes aux Etats-Unis découvrent que la fusion de myoblastes avec d'autres types de cellules induisent la production de protéines musculaires dans la cellule fusionnée ; et en 1986, le laboratoire de Weintraub démontre que la transfection de cellules avec un ADNc de MyoD permet la différenciation d'autres types cellulaires en muscle squelettique. MyoD et sa découverte donnent donc preuve de l'existence de **réseaux de régulation** génétique qui gouvernent la différenciation cellulaire, tandis que les gènes Homéobox montrent la régulation génétique de structures et tissus embryonnaires <sup>9</sup>.

Jusqu'aux années 80, les études d'embryologie utilisent des animaux modèles divers (poulet, souris, zebrafish, xénope, salamandre ou drosophile, pour n'en citer que quelques-uns). Le développement de l'embryon humain est peu étudié car ceux-ci sont, pour des raisons pratiques comme éthiques, difficiles d'accès. Mais le début du XXI<sup>ème</sup> siècle est marqué par une nouvelle révolution, cette fois, de la biologie cellulaire. Les premières **cellules souches embryonnaires (ESC)**, issues de blastocystes souris, sont cultivées *in vitro* par GR Martin en 1981 <sup>10</sup>; puis en 1998 les premières cellules souches embryonnaires humaines (hESC) par Jamie Thomson <sup>11</sup>. Enfin en 2006 vient la reprogrammation cellulaire, mise en place par Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi <sup>12</sup>, qui permet de produire des **cellules souches pluripotentes induites (iPSC)** à partir de cellules somatiques <sup>13</sup>.

L'arrivée de ces cellules apportent avec elles de nouveaux espoirs aux sciences biomédicales - ceux de la médecine régénératrice (reformer des tissus endommagés à partir de cellules souches en culture) et médecine personnalisée (le faire à partir de cellules du patient). Ces techniques sont cependant aussi d'intérêt pour la biologie du développement, car elles donnent accès à un matériel humain virtuellement inépuisable, et permettant de nombreuses manipulations *in vitro*, grâce aux avancées de la culture cellulaire et de la manipulation génétique. Des biologistes du développement, désormais rattachés à une nouvelle discipline - celle de l'ingénierie des cellules souches, s'attèlent donc depuis la fin des années 2000 à mettre en place des protocoles de différenciation dirigée de divers types cellulaires, qu'ils soient adultes ou embryonnaires.

L'avenue du développement *in vitro* de tous types cellulaires ne peut cependant à elle seule permettre de répondre à toutes les questions de biologie du développement, notamment aux questions s'intéressant à la mise en place des organes et des structures complexes nécessaires à leur bon fonctionnement. C'est ainsi que le développement de l'ingénierie des cellules souches s'est accompagné de celui de la culture en 3 dimensions, notamment des **organoïdes**. Un organoïde est défini comme une structure multicellulaire en 3 dimensions, capable d'auto-organisation et de reproduire au moins en partie la structure et les fonctions de l'organe modelé. La culture d'organoïdes selon sa définition actuelle apparaît en 2008 dans le laboratoire de Yoshiki Sasai, avec la formation de structures corticales dérivées de ESC murines - ce sont les premiers organoïdes de cerveaux <sup>14</sup>. La décennie qui a suivi a donc vu naître nombre de protocoles de production d'organoïdes modelant divers organes ou structures embryonnaires <sup>15</sup> (figure 1.B.), dont en 2011, les organoïdes intestinaux <sup>16</sup>.



**Figure 1 : La théorie des feuillets embryonnaires, en 1817 et en 2020**

**A.** Illustrations des feuillets embryonnaires par Christian Pander (« Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Hühnchens im Eye », 1817, d'après <https://www.biodiversitylibrary.org>) a = masse vitelline, c = « peau visqueuse » (désigne l'endoderme), d = « peau vasculaire » (mésoderme), f = « peau séreuse » (ectoderme) **B.** Immuno-marquage de gastruloïdes : un type d'organoïde reproduisant la gastrulation à partir de cellules souches pluripotentes. SOX2 est un marqueur de l'ectoderme, T du mésoderme, SOX17 de l'endoderme, et CDX2 du trophectoderme (D'après Minn 2020)

C'est donc à la fois à l'issue de plus de deux millénaire d'exploration scientifique et à l'aube d'une période technologique exaltante que s'insère ce projet de thèse. Nous avons cherché à utiliser ces dernières avancées de génétique, biologie moléculaires et ingénierie des cellules souches afin d'apporter quelques réponses de plus à la l'éternelle question : « Comment le corps humain se forme-t-il ? », ici, dans le cadre du développement de l'appareil digestif.

---

# INTRODUCTION : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chez l'Homme, 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 de barrière avec l'extérieur, en permettant le passage des nutriments et en prévenant le passage de pathogènes. Il peut être décomposé en plusieurs régions ; du pôle oral vers le pôle anal : l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le caecum (appendice), le côlon et le rectum. Ce travail de thèse se concentre sur l'intestin grêle, communément appelé petit intestin. Cette partie du système digestif participe à la grande majorité de l'absorption des éléments nutritifs ingérés au cours de l'alimentation. Le développement embryonnaire du petit intestin est un sujet d'intérêt en recherche biomédicale, car la période néonatale est reconnue comme une origine possible des maladies courantes qui émergent à la naissance ou plus tard dans la vie<sup>17</sup>. Par conséquent, il existe un réel besoin de mieux comprendre le développement physiologique et fonctionnel de l'intestin pendant la période néonatale.

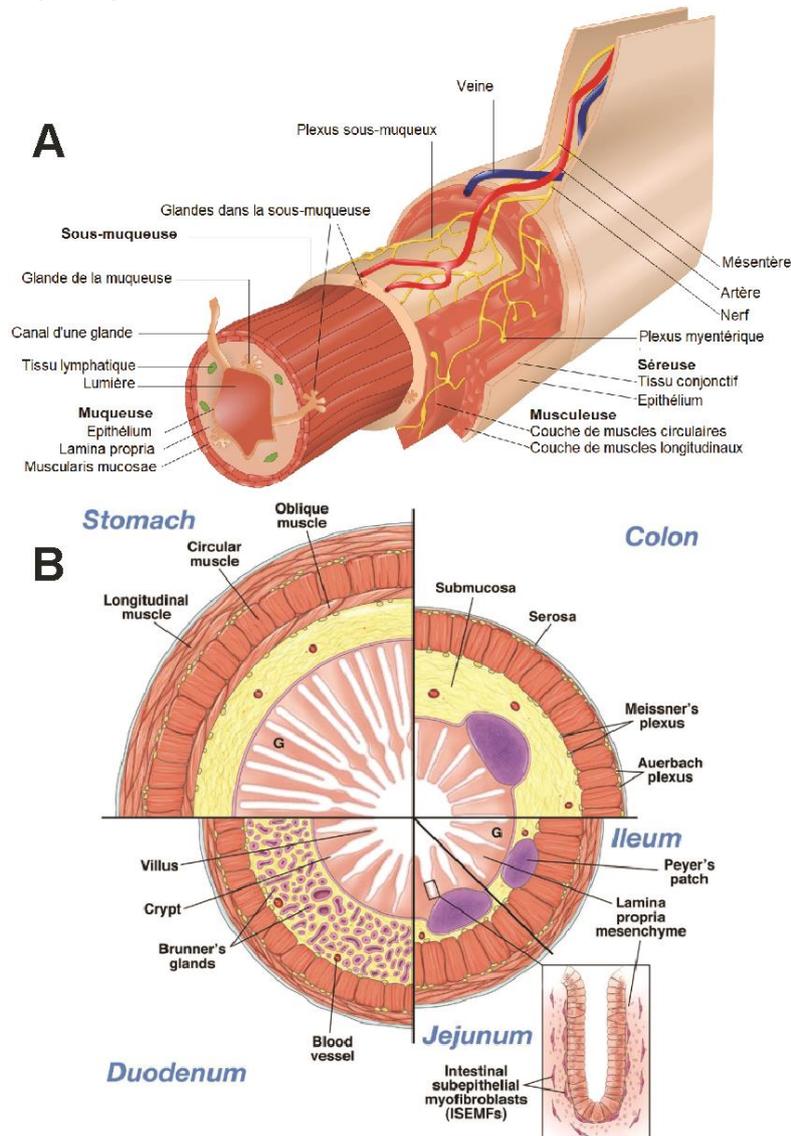
Le tube digestif adulte est dérivés de l'association de tissus issus de différentes origines embryonnaires. L'un de ces tissus est le système nerveux entérique (SNE), une composante du système nerveux périphérique qui coordonne plusieurs comportements complexes de l'intestin adulte, dont la motricité intestinale, les échanges d'eau et d'électrolytes à travers la barrière épithéliale et l'afflux sanguin. La mise en place du tube digestif chez l'embryon requiert donc un co-développement du SNE avec les autres structures de l'intestin. Cependant, et étant donné la complexité de ces processus, les effets directs du SNE sur les types cellulaires spécifiques du tissu intestinal au cours du développement embryonnaire, et les molécules qui coordonnent ces interactions, sont mal définis chez la souris et pratiquement inconnus chez l'homme.

Dans ce contexte, nous nous intéressons au co-développement embryonnaire du SNE avec les autres populations cellulaires du microenvironnement intestinal - notamment mésenchymateuses - du petit intestin.

Dans cet état de l'art sur le développement du tube digestif humain, je vais tout d'abord présenter la physiologie du tube digestif adulte, dont le système nerveux entérique. Ensuite, je présenterais le développement embryonnaire du petit intestin, en soulignant le rôle des interactions entre tissus d'origine embryonnaire différentes. Finalement, je présenterais les modèles du développement du système digestif humain issus des technologies d'ingénierie des cellules souches, que nous utilisons dans notre étude.

## I. LE TUBE DIGESTIF

### A. Physiologie digestive adulte



**Figure 2 : Physiologie digestive**

**A.** Organisation des tuniques (ici, dans le petit intestin) les quatre tuniques sont indiquées en gras (source image : wikipédia) **B.** Différences histologiques entre certains organes du tube digestif (estomac, duodénum, jéjunum, côlon) (d'après McLin 2009)

## HISTOLOGIE

D'un point de vue histologique, les organes du tube digestif adulte conservent globalement la même organisation en couches concentriques, qui peut être décomposée en quatre tuniques distinctes (figure 2.A.). Ainsi, à l'intérieur du tube digestif, se trouve la muqueuse. La muqueuse est composée d'un épithélium monostratifié au contact de la lumière intestinale (ou lumen), et peut aussi être identifiée sous le terme de BEI (Barrière Epithéliale Intestinale). La sous-muqueuse, sous-jacente à la muqueuse, est composée de la lamina propria (tissu conjonctif de soutien à l'épithélium) et la musculaire muqueuse (fine

couche de cellules musculaires qui favorise les mouvements de l'épithélium). La musculature est constituée de deux couches musculaires (couche musculaire circulaire puis longitudinale). Enfin, la séreuse forme un tissu conjonctif et un épithélium (péritoine) qui recouvre l'extérieur du tube digestif et est en contact direct avec la cavité abdominale. L'ensemble de ces tuniques assurent des fonctions spécifiques. La muqueuse participe à la digestion et l'absorption des nutriments, la sous-muqueuse participe au support et à l'homéostasie de l'épithélium digestif, la musculature assure les fonctions motrices du tube digestif et la séreuse protège le tube digestif<sup>18</sup>. Entre les couches musculaires se trouvent les deux plexus nerveux qui innervent le tube digestif ; le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique. Ensemble, ils composent le système nerveux entérique (SNE), dont la physiologie est décrite dans de plus grand détails dans la partie I.B. Si l'organisation histologique est globalement similaire le long du tube digestif, des différences entre les régions du tube digestif existent (figure 2.B.). Par exemple, l'estomac possède une troisième couche musculaire (couche oblique). De la même manière, l'épithélium digestif évolue morphologiquement le long du tube, avec la présence de cryptes et de villosités dans l'intestin grêle et uniquement de cryptes dans le gros intestin<sup>19</sup>.

### MORPHOLOGIE ET COMPOSITION CELLULAIRE DE L'INTESTIN GRÊLE

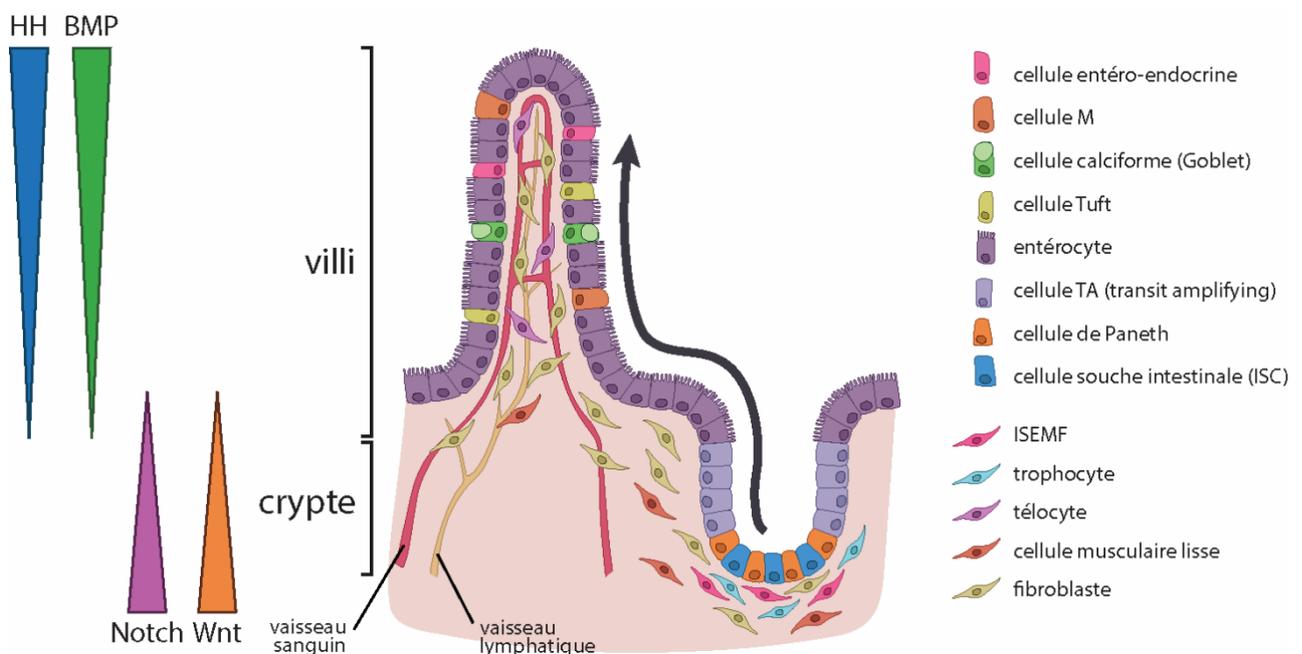
Notre organe d'intérêt, le petit intestin (aussi appelé intestin grêle) se situe entre l'estomac et le caecum. D'un diamètre moyen de 2,5 centimètres, il constitue le segment le plus long - 5 mètres en moyenne<sup>20</sup>, c'est à dire trois quarts de la longueur de l'appareil digestif. Le petit intestin peut être subdivisé en trois parties (dans l'ordre cranio-caudal) : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Ces trois régions présentent des fonctions différentes. Le duodénum (qui est dans la continuité de l'estomac), sécrète des enzymes permettant la digestion des aliments. Le jéjunum absorbe la plupart des nutriments et l'iléon est spécialisé, entre autres, dans l'absorption de vitamine B12 et acides biliaires<sup>21</sup>.

Histologiquement, le petit intestin se distingue des autres régions du tube digestif par l'axe crypto-villositaire, qui est probablement son élément morphologique le plus caractéristique. Cette morphologie est fondamentale à l'intestin puisqu'elle permet, d'une part, d'augmenter la surface d'absorption de l'intestin grêle ; et d'autre part, elle accueille la niche des cellules souches intestinales (CSI) qui assurent le renouvellement constant de l'épithélium intestinal. En effet, les CSI, qui se trouvent à la base des cryptes intestinales et coliques, peuvent se différencier dans tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal. Les types de cellules qui composent cet épithélium sont : les entérocytes (cellules absorbatives), cellules entéroendocrines (cellules sécrétrices d'hormones et peptides), cellules de Paneth (cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens), cellules caliciformes (cellules de Goblet - productrices de mucus), cellules Tuft (cellules chimiosenseurs), cellules M (cellules associées au système immunitaire, qui permettent le transport d'antigènes à travers la barrière) (figure 3).

Périodiquement, les CSI se différencient en cellules TA (Transit Amplifying cells), qui résident dans la crypte pendant 2 à 6 jours avant de se différencier en types cellulaires adultes<sup>22</sup> (figure 3), permettant ainsi le renouvellement de l'épithélium intestinal tous les 4 à 5 jours<sup>23</sup>.

En plus des villosités, la capacité d'absorption de l'intestin est grandement augmentée par la présence de la bordure en brosse sur la face apicale des entérocytes matures. Cette structure est formée par les microvillosités : des extrusions membranaires d'une longueur d'environ 1 à 3 µm et d'un diamètre d'environ 100nm<sup>24</sup>.

Sous l'épithélium, dans la lamina propria, se trouve une niche essentielle au bon fonctionnement des CSI. Cette niche est composée à la fois de Matrice Extra-Cellulaire (MEC), ainsi que des cellules mésenchymateuses spécifiques. Elle contient des fibroblastes, des myofibroblastes sub-épithéliaux (ISEMFs), des télocytes et trophocytes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales ainsi que des péricytes (formant les vaisseaux sanguins de la microvascularisation), et des cellules immunitaires. Les cellules mésenchymateuses de la niche expriment des facteurs de croissance qui permettent de réguler la prolifération et la différenciation des CSI. Globalement, on retrouve un gradient décroissant de ligands de la voie HH (HedgeHog) et BMP (Bone Morphogenic Protein) du villus à la crypte, et un gradient croissant de ligands des voies Notch et WNT (Wingless/integrated) <sup>25</sup> (figure 3). D'autres facteurs de croissance, comme l'EGF (Epidermal Growth factor) et des R-spondines sont également produites par le mésenchyme dans la zone pericryptale <sup>19</sup>.



**Figure 3 : Axe crypto-villositaire et niche souche intestinale**

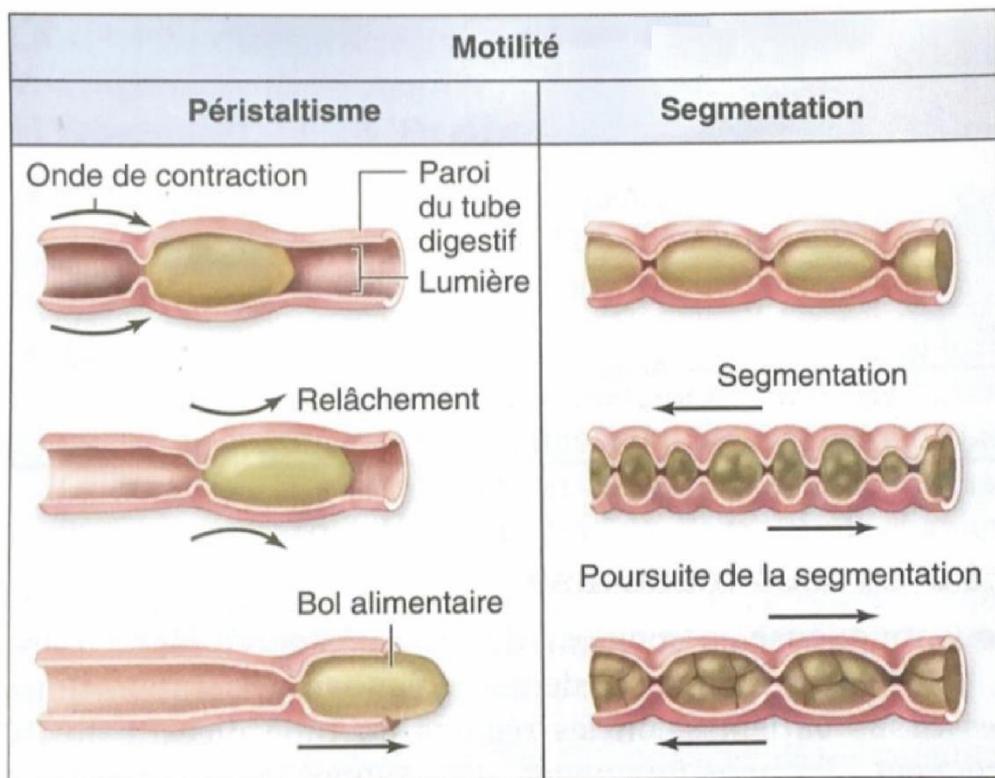
Les cellules de l'épithélium intestinal matures (entérocytes, cellules entéroendocrines, cellules calciformes (de Goblet), cellules M, cellules Tuft) sont différenciées à partir des cellules souches intestinales (CSI) (d'abord en cellules TA, puis cellules matures) qui se trouvent au fond des cryptes. Le maintien et la différenciation des cellules souches est supporté par la niche intestinale, influencée par de nombreux types cellulaires mésenchymateux (ISEMF (myofibroblastes sub-épithéliaux), trophocytes et télocytes, cellules musculaires lisses et fibroblastes). L'axe crypto-villositaire est également entretenu par des gradients de morphogènes (notamment HH, BMP, Notch et Wnt). La flèche représente la migration suivie par les cellules de la BEI après qu'elles aient commencé leur différenciation, qui se finira au sommet du villus, où elles mourront par apoptose.

Les ISEMFs (myofibroblastes sub-épithéliaux) sont particulièrement importants à la niche. Ils se trouvent dans la zone pericryptale et produisent des ligands de la famille WNT et des inhibiteurs de BMP (Gremlin, Chordin, Noggin) qui régulent l'activité des CSI <sup>26</sup>. Ces myofibroblastes peuvent être détectés par leur expression de protéines contractiles, telle que  $\alpha$ SMA (l'isoforme alpha de la smooth muscle actin), et peuvent être distingués des cellules musculaires lisses car elles n'expriment pas certaines protéines musculaires, comme la desmine <sup>27</sup>. En dehors de la maintenance de la niche, les ISEMFs sont également impliqués dans la réponse aux blessures par le remodelage de la MEC <sup>27</sup>. D'autres cellules impliquées dans la maintenance de la niche

sont les télocytes (PDGFRA<sup>hi</sup>FOXL1<sup>+</sup>) en bordure et sous-jacents aux villosités, qui expriment des BMP; et les trophocytes (CD81<sup>+</sup>PDGFRA<sup>lo</sup>), sous les cryptes, qui exprime Gremlin, un antagoniste de BMP <sup>28</sup>; permettant ainsi de maintenir un gradient BMP sous la crypte. Les télocytes, comme les ISEMF, expriment également des ligands de la voie WNT, ce qui permet la création d'un gradient WNT croissant dans le sens crypte-villosité, qui est un signal pro-prolifératif pour les cellules de la crypte <sup>29</sup>.

## FONCTIONS MOTRICES

L'absorption des nutriments s'effectue donc au niveau de la BEI par les entérocytes, cependant, l'accès des nutriments à la barrière est régulé par les fonctions motrices de l'intestin. En effet pendant la digestion, le bol alimentaire est propulsé le long de l'intestin par des mouvements effectués grâce à la contraction des couches musculaires circulaires et longitudinales, appelés fonctions motrices.



**Figure 4 : mécanismes de motricité de l'intestin grêle**

La péristaltisme (gauche) permet l'avancée du bolus alimentaire, tandis que la segmentation (droite) permet le brassage des nutriments dans la lumière intestinale (d'après McKinley et al, 2014)

Les fonctions motrices peuvent être décrites par plusieurs mécanismes dont les principaux sont le péristaltisme et la segmentation (figure 4).

Le péristaltisme (figure 4, gauche) permet la propulsion du bol alimentaire le long du tractus gastro-intestinal. Cette propulsion s'effectue grâce à la propagation d'une onde de constriction des muscles le long du tube digestif. Les ondes péristaltiques se propagent à une fréquence d'environ 15-18 ondes par minute et une vitesse de 6 à 27 centimètres par minute

chez l'Homme <sup>30</sup>. Le péristaltisme est également associé aux complexes migratoires moteurs (CMM) qui permettent également la propulsion du bol alimentaire. Ce mécanisme est cependant plus lent que la segmentation (onde d'environ 1 à 4 centimètres par minute qui a lieu approximativement toutes les 90 minutes). Il est supposé qu'il permet l'évacuation du contenu luminal résiduel après que la majorité de l'absorption ai eu lieu ; et ainsi d'éviter la surcroissance bactérienne dans l'intestin <sup>31</sup>.

La segmentation (figure 4, droite) permet d'augmenter l'absorption d'eau et de nutriments en effectuant un brassage mécanique du bolus alimentaire. En effet, ces mouvements permettent un mélange du contenu luminal avec les enzymes digestives et d'améliorer l'exposition des nutriments à l'épithélium intestinal. Ces mouvements s'effectuent par des contractions annulaires et oscillantes de 5-6 secondes. Dans l'intestin grêle, la vitesse des ondes de segmentation varie de 12 séquences par minute dans le duodénum à 8 séquences par minute dans l'iléon <sup>32</sup>.

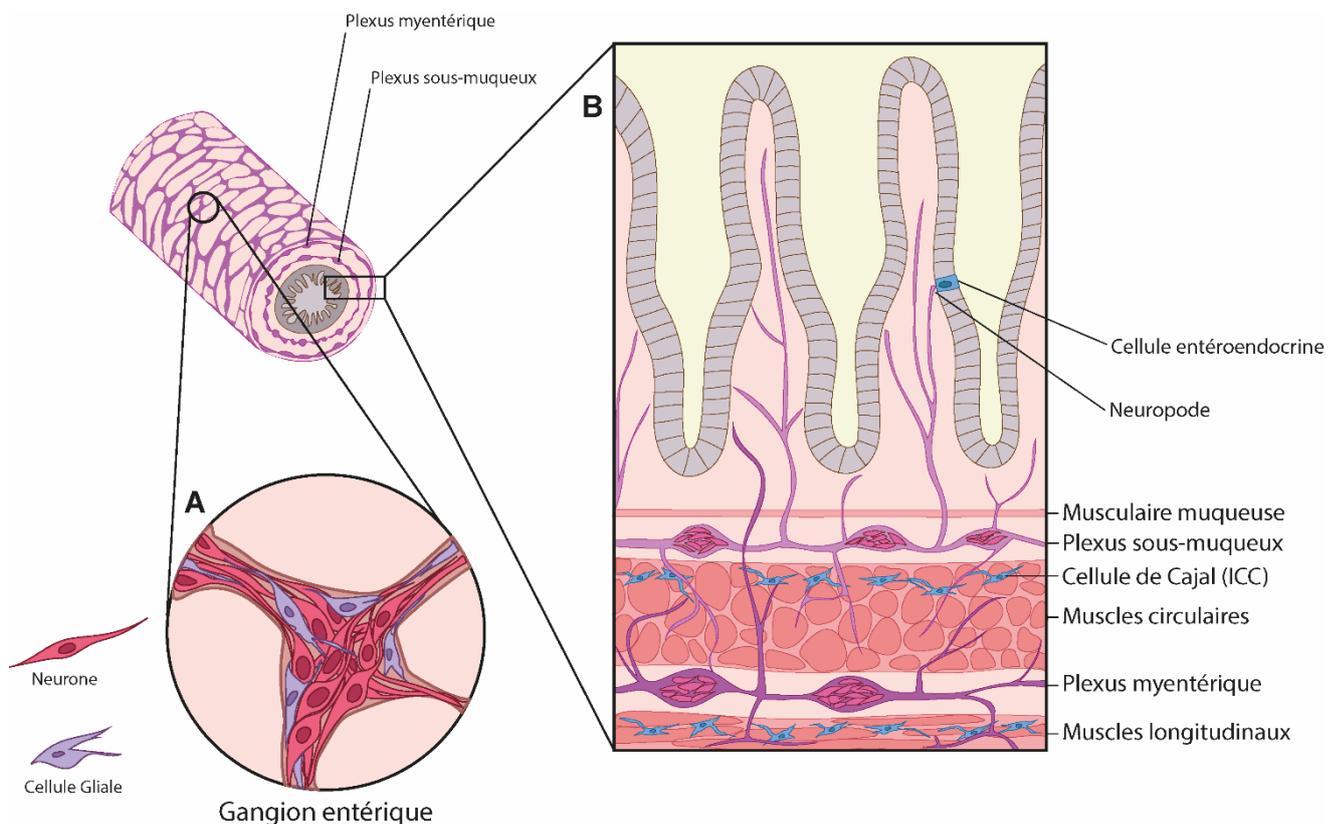
L'activité motrice du tube digestif est contrôlée neurologiquement par le système nerveux entérique (SNE) (détaillé dans partie I.B.), mais également par l'activité des cellules interstitielles de Cajal (CIC). Ces cellules mésenchymateuses, qui sont présentes au sein des couches musculaires de l'estomac au côlon, sont des cellules dites « pace-maker ». Elles possèdent une capacité d'auto-excitation qui permet la génération d'onde de contractions lentes <sup>33</sup>. Elles participent aussi à la transmission des signaux nerveux aux muscles lisses <sup>34</sup>.

Le SNE, qui contrôle donc les fonctions motrices, est un réseau nerveux complexe fondamental au bon fonctionnement du tube digestif. Dans la partie suivante, nous allons décrire sa physiologie et ses fonctions.

## B. Le système nerveux entérique

### PHYSIOLOGIE

Le système nerveux entérique (SNE) est une composante du système nerveux autonome, qui s'étend de la partie basse de l'œsophage au côlon. Il est unique au reste du système nerveux périphérique car il fonctionne de manière indépendante du système nerveux central (SNC), et est capable de contrôler certaines fonctions gastro-intestinales<sup>35</sup>. Le tractus gastro-intestinal n'est cependant pas complètement autonome en conditions physiologiques normales. Le SNE communique avec le SNC par la voie vagale (nerf vague), ainsi que les voies sympathiques et pelviennes<sup>31</sup>.



**Figure 5 : Organisation structurale du système nerveux entérique**

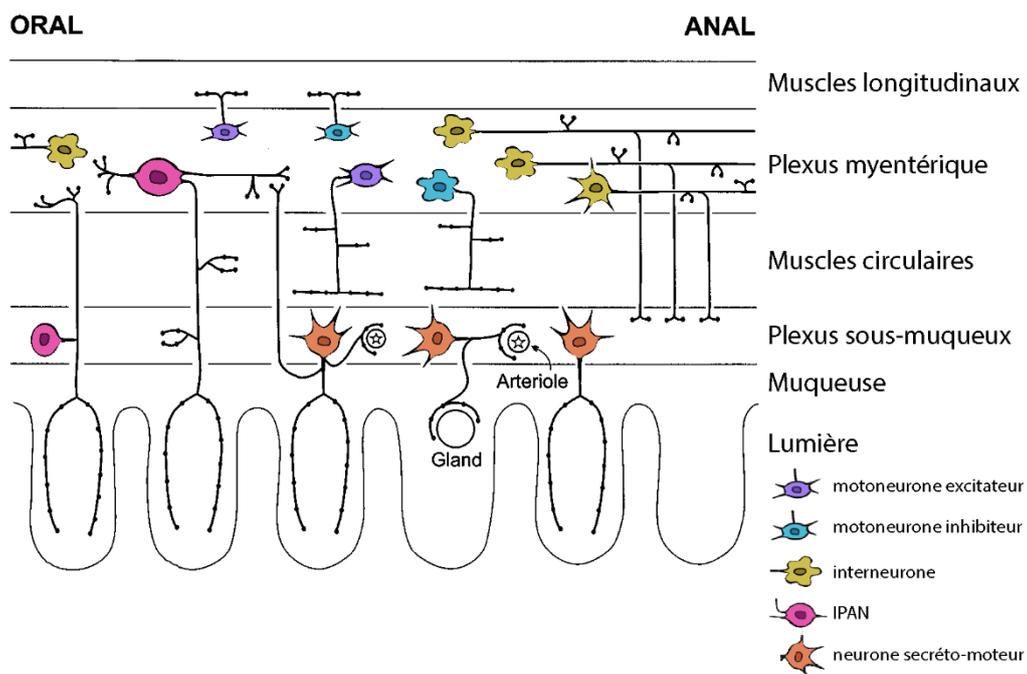
**A.** Le ganglion entérique, unité fonctionnelle du SNE, contient des cellules gliales et neurones entériques **B.** Coupe transversale de la paroi digestive. Le SNE s'organise en deux plexus nerveux interconnectés et des fibres nerveuses s'étendent de ces plexus vers les muscles, mais également vers la muqueuse.

Le SNE comporte deux types cellulaires principaux : les neurones entériques et les cellules gliales entériques (CGE). Il est estimé que le SNE adulte compte environ 500 millions de neurones entériques<sup>31</sup>, et en moyenne 7 fois plus de cellules gliales<sup>36</sup>. Ceux-ci s'organisent en petits ganglions interconnectés par des fibres inter-ganglionnaires et répartis le long du tube digestif (figure 5.A.) en deux plexus. Il s'agit du plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner), qui se trouve entre la sous-muqueuse et les muscles circulaires, et du plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach), qui se trouve entre les muscles circulaires et longitudinaux (figure 5.B.). Ces ganglions sont connectés aux tissus effecteurs (muscles, épithélium digestif, vaisseaux sanguins)

par des fibres nerveuses. A noter, l'organisation du SNE varie entre les régions du tube digestif : il n'y a notamment pas de plexus sous-muqueux au niveau de l'œsophage et de l'estomac <sup>31</sup>.

Les neurones du plexus sous-muqueux projettent dans la musculaire muqueuse mais également directement dans le mésenchyme sous-muqueux, à la fois dans les villosités et la zone pericryptale (figure 5.B.). Ces communications semblent être impliquées dans la régulation des CSI. Il a par exemple été montré que la sérotonine (5-HT) produite par les neurones entériques augmente leur prolifération <sup>37</sup>. Les neurones communiquent également de manière directe avec les cellules entéro-endocrines par des structures appelées neuropodes <sup>38</sup> (figure 5.B.).

### TYPES CELLAIRES



**Figure 6 : Types de neurones du Système nerveux entérique** (modifié d'après Furness 2000)

Le SNE contient une grande diversité de neurones qui peuvent être subdivisés en sous-types principaux : motoneurons (excitateurs ou inhibiteurs), interneurons, IPAN (neurones afférents primaires intrinèques), neurones sécréto-moteurs (vasodilatateur ou non-vasodilatateurs)

Selon la nomenclature classique développée par John Furness, le SNE contient approximativement 20 types de neurones qui peuvent être décrits au choix selon leur fonctions, l'orientation de leur projection axonale (principalement orale ou caudale (anale), mais également circonférentielle ou locale) et les neurotransmetteurs qu'ils utilisent. Ils peuvent être divisés en trois classes principales : motoneurons, interneurons et neurones afférents primaires intrinèques (IPAN - Intrinsic Primary Afferent Neurons) (figure 6).

Les motoneurons permettent l'innervation des muscles, vaisseaux, et cellules sécrétrices. Ils peuvent être subdivisés en motoneurons connectés aux muscles lisses (excitateurs ou inhibiteurs), neurones sécréto-moteurs (vasodilatateurs et non vasodilatateurs), et neurones innervant les cellules endocrines <sup>39</sup>. Les neuromoteurs excitateurs sont principalement

muscariniques et cholinergiques (ChAT+), tandis que les inhibiteurs sont principalement nitroergiques (NOS+).

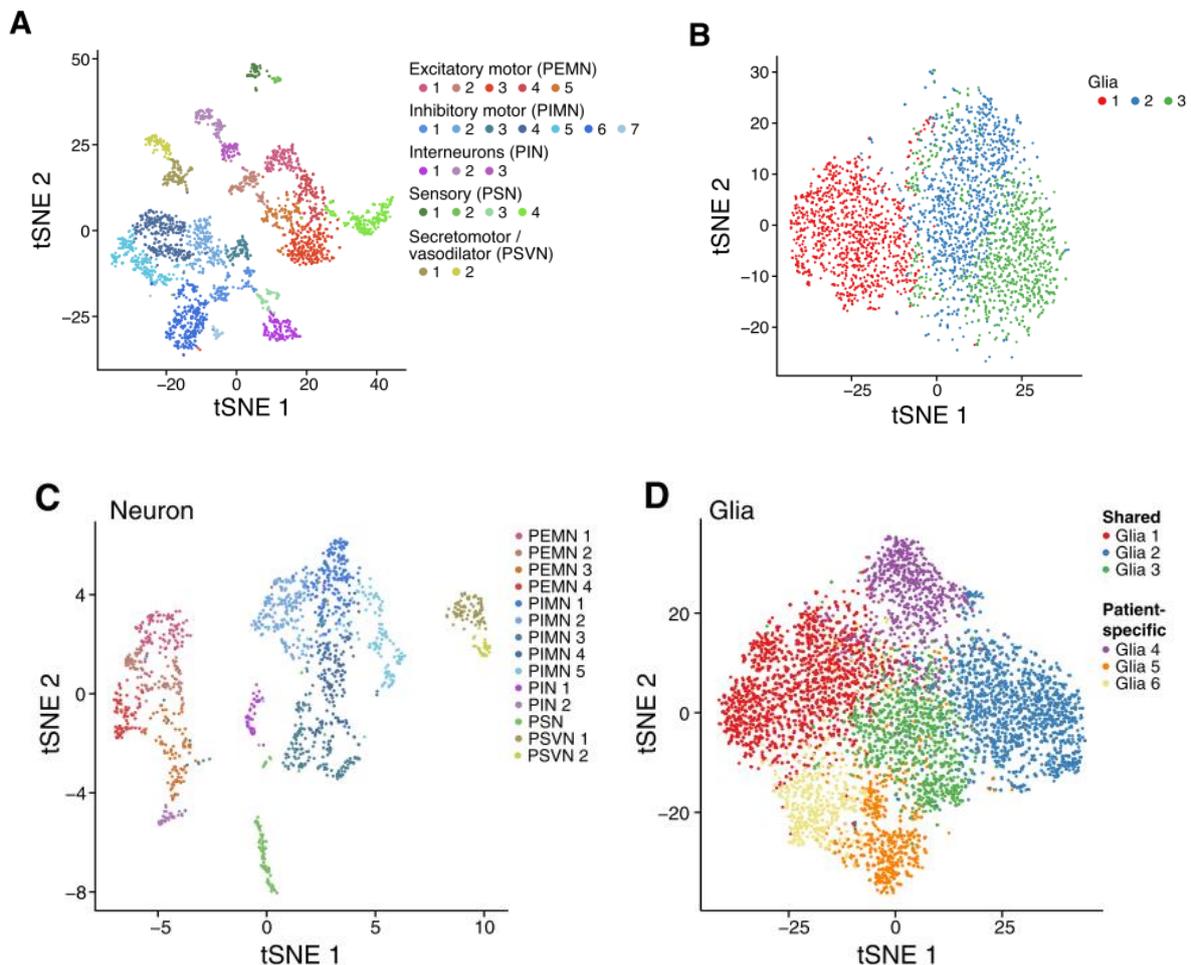
Les neurones sécréto-moteurs et vasomoteurs contrôlent les échanges d'eau et d'électrolytes à travers la BEI, et sont cholinergiques (ChAT) ou non cholinergiques (VIP ou autre neurotransmetteur). Les neurones moteurs connectés aux cellules endocrines permettent le contrôle de la sécrétion d'hormones par les cellules entéro-endocrines.

Les interneurones peuvent être de quatre types. Le premier est ascendant (projection axonale orale) et les trois autres descendants (projection caudale). Les interneurones ascendants sont cholinergiques. Les interneurones descendants peuvent être ChAT/NOS/VIP (impliqués dans les réflexes moteurs locaux), ChAT/SOM (impliqués dans conduction des CMM dans le petit intestin), ou ChAT/5-HT (impliqués dans les réflexes sécréto-moteurs, mais pas dans la motricité).

Finalement, les IPAN sont des neurones sensoriels qui détectent les signaux mécaniques (e.g. tension dans la paroi intestinale) et la composition chimique du contenu luminal <sup>40</sup>. Ce type de neurone se trouve dans le plexus sous-muqueux et projettent vers le plexus myentérique <sup>39</sup>.

Les cellules gliales entériques (CGE) sont principalement connues pour leur rôle de support des neurones entériques. Il a cependant été démontré que ces cellules sont également importantes pour maintenir l'homéostasie intestinale par la maintenance de la BEI, ainsi que par la communication avec le système immunitaire par la sécrétion de chimiokines et cytokines <sup>41</sup>. Il existe plusieurs types de CGE qui peuvent être distingués par leur morphologie et localisation (type I : intra-ganglionnaire, morphologie étoilée ; type II : inter-ganglionnaire, allongées ; type III : mucosale ; type IV : intramusculaires). Les CGE peuvent également être classifiées par l'expression de marqueurs moléculaires. En effet, toutes les CGE expriment SOX10, mais des populations distinctes expriment GFAP et/ou S100B <sup>42</sup>.

Plus récemment, une étude publiée en 2020 <sup>43</sup> a tiré profit des derniers développements technologiques de séquençage ARN en cellule unique (scRNAseq – single-cell RNA sequencing) pour étudier la diversité des neurones et cellules gliales entériques chez la souris et chez l'Homme. Cette étude a trouvé une grande diversité dans les neurones entériques : 21 groupes se distinguant par leur signature transcriptionnelle chez la souris et 18 chez l'Homme (figure 7.A. et C., et une diversité plus limitée dans les CGE : 3 groupes distincts (figure 7.B. et D.). Cette étude a également montré que la signature transcriptionnelle des neurones entériques varie en fonction de leur région de l'intestin (par exemple, les neurones iléaux expriment plus de récepteurs au glutamate), et de la phase du rythme circadien. Ces résultats soulignent donc la diversité des neurones entériques.



**Figure 7: Diversité transcriptionnelle des neurones et cellules gliales entérique, chez l'Homme et la souris**

**A.** tSNE de données scRNAseq de neurones entériques de souris **B.** de cellules gliales entériques de souris **C.** Neurones entériques chez l'Homme **D.** Cellules Gliales entériques chez l'Homme.

PEMN (Putative Excitatory Motor neurons) : Motoneurons excitateurs (Chat+Tac1+); PIMN (Putative Inhibitory Motor Neurons) : motoneurons inhibiteurs (Nos1+Vip+); PIN (Putative Interneurons) : Interneurons (Penk+); PSN (Putative Sensory Neurons) : Neurones sensoriels (correspondent aux IPAN) (CGRP+); PSVN (Putative Secreto-motor/Vasodilator Neurons) : Neurones secreto-moteurs/vasodilatateurs (Glp2r+)

## FONCTIONS

Le rôle principal du SNE est donc le contrôle des fonctions motrices de l'intestin. Les mouvements de l'œsophage sont cependant majoritairement coordonnés par le SNC <sup>44</sup>. Dans l'estomac également, le SNC a un rôle majeur dans le contrôle du volume et de la force des contractions, ainsi que de la sécrétion d'acide. Les mouvements intestinaux et coliques sont, eux, majoritairement contrôlés par le SNE <sup>33</sup>. En effet le petit intestin est capable de fonctionner indépendamment du SNC <sup>35</sup>. Le SNE contrôle donc les principales fonctions motrices du petit intestin : le péristaltisme et la segmentation.

En dehors des fonctions motrices, le SNE est également impliqué dans la sécrétion d'acide gastrique, et la régulation du flux sanguin dans les vaisseaux intestinaux <sup>39</sup>. Il joue de plus un rôle

dans la régulation de la perméabilité intestinale et la maintenance de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (BEI), ainsi que la sécrétion et l'absorption d'eau et d'électrolytes au travers de l'épithélium <sup>45</sup>. Le SNE interagit également avec le système immunitaire et le microbiote intestinal <sup>46</sup>, dont il est capable de réguler la composition <sup>47</sup>.

Chez les mammifères, les deux plexus nerveux exercent des fonctions différentes : le plexus sous-muqueux régule les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin et la tonicité vasculaire, tandis que le plexus myentérique régule la motricité intestinale <sup>48</sup>.

Comme nous avons pu le voir, le tube digestif effectue des fonctions complexes mettant en jeu de nombreux acteurs - épithélium, muscles, SNE, et bien d'autres - et leur bonne collaboration. Ces acteurs - et les éléments morphologiques qui leur permettent de communiquer de manière fonctionnelle - prennent forme au cours du développement embryonnaire, que nous allons maintenant décrire.

## II. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU TUBE DIGESTIF

### A. Vue globale

#### NOTIONS D'EMBRYOLOGIE

Le développement de l'embryon est un processus complexe qui implique des phénomènes biologiques ayant lieu à des échelles de différentes tailles. A l'échelle tissulaire, la morphogénèse regroupe les mécanismes qui permettent la formation de structures complexes. Ceci inclut entre autres les migrations et agrégations de cellules, transition épithélio-mésenchymateuses (ou inversement), ou encore l'embranchement et élongation de structures existantes. L'échelle cellulaire comprend de nombreux mécanismes dont la différenciation - transformation des cellules de l'état pluripotent vers différencié - et la maturation - en cellules adultes et fonctionnelles -, et les interactions complexes ayant lieu entre les cellules. Finalement, l'échelle moléculaire caractérise les gènes et protéines qui contrôlent ces différents phénomènes. Pour étudier le développement d'un organe, il faut donc s'intéresser à ces différentes échelles et les façons dont elles interagissent.

Chez l'Homme, le développement prénatal peut être séparé en deux périodes. La période embryonnaire correspond aux 8 premières semaines de gestation au cours desquelles a lieu la mise en place de l'embryon et la morphogénèse des organes. Elle est suivie par la période fœtale qui prend place de la 9<sup>ème</sup> semaine à la naissance, et correspond à la croissance et la maturation du fœtus. La période embryonnaire peut elle-même être séparée en deux parties après la fécondation : l'embryogenèse (semaine 1 à 3) et l'organogénèse (semaine 4 à 8). Ces deux périodes sont délimitées par un événement majeur du développement embryonnaire : la gastrulation ; qui a lieu chez l'homme à la troisième semaine de gestation. Ce phénomène marque l'apparition des trois feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) ; ainsi que la mise en place des axes majeurs (cranio-caudal, dorso-ventral et gauche-droit).

Lors de la gastrulation (figure 8.A.), qui commence au 15<sup>ème</sup> jour, alors que l'embryon existe sous la forme d'un disque bilaminaire, la couche supérieure est connue sous le nom d'épiblaste et la couche inférieure, hypoblaste. La gastrulation commence avec la formation de la ligne primitive : une structure longitudinale au centre de l'épiblaste, qui se forme de la partie caudale vers la partie crâniale. La ligne primitive est formée par une invagination de l'épiblaste, causée par des cellules du mésendoderme qui prolifèrent puis migrent sous l'épiblaste. Une partie de ces cellules vont aller envahir l'hypoblaste pour en remplacer les cellules et s'y différencier en cellules de l'endoderme définitif. Une autre partie de ces cellules migre entre l'endoderme et l'épiblaste pour y former le mésoderme. Avec la formation du mésoderme, le disque embryonnaire devient trilaminaire (à trois couches), et l'épiblaste restant est maintenant désigné sous le nom d'ectoderme <sup>49</sup>.

La gastrulation marque donc la fin de la période d'embryogenèse et le début de la période d'organogénèse. Les trois feuilletts embryonnaires vont servir d'ébauche aux organes du corps, et subir de nombreux événements de morphogénèse et de différenciation, et vont se développer et s'associer pour former les organes de l'embryon. Les principaux dérivés de chacun des feuilletts embryonnaires sont décrits dans la figure 9.

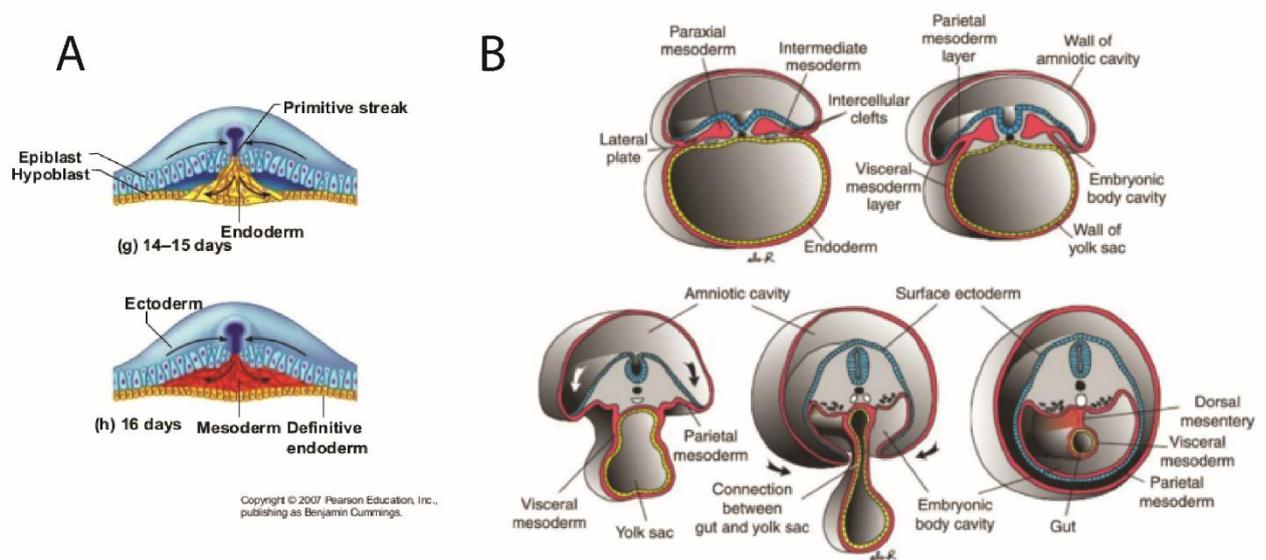


Figure 8 : Fin de l'embryogenèse et organogénèse de l'intestin

A. Gastrulation – formation des feuillets embryonnaires B. Repliement du disque embryonnaire et formation du tube digestif

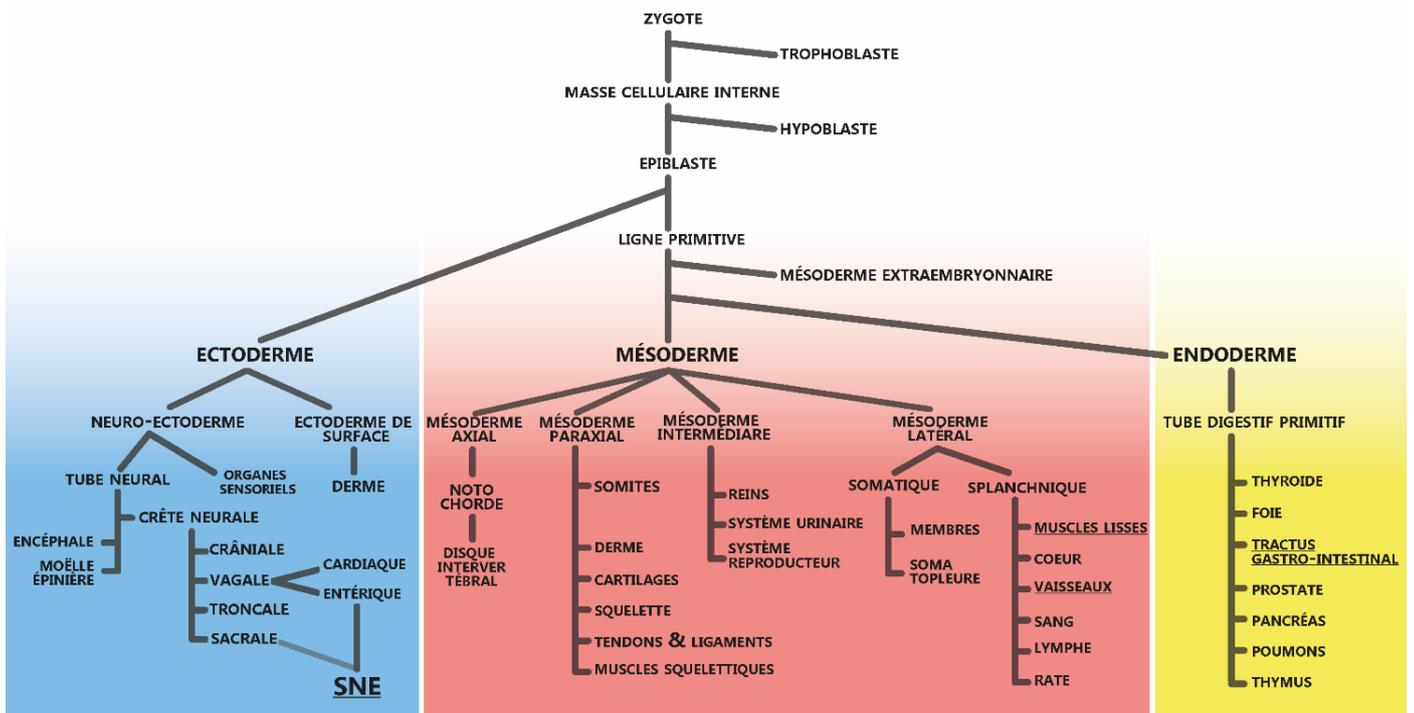


Figure 9 : Arbre de différenciation schématisant la provenance embryonnaire des différents tissus de l'organisme (chez les mammifères) Les structures majoritairement impliquées dans la formation de l'intestin sont soulignées

## ORGANOGENÈSE DU TUBE DIGESTIF

La formation du tube digestif se déroule chez l'Homme entre la troisième et la douzième semaine de gestation, et sa maturation continue jusqu'à l'âge adulte. Après la formation des feuillets embryonnaires au cours de la gastrulation, l'embryon, qui a à cet instant une forme de disque plat, se replie sur lui-même au cours de la quatrième semaine (figure 8.B.). L'endoderme, se trouvant sur le dessous de ce disque, se replie pour former un tube fermé, et donne ainsi l'ébauche du tractus digestif. Le repliement s'initie des deux côtés de l'axe cranio-caudal. Il commence au 22<sup>ème</sup> jour du côté crânial et 23<sup>ème</sup> jour du côté caudal, et la fusion progresse des deux côtés vers le milieu, pour finir le 28<sup>ème</sup> jour <sup>49</sup> (chez la souris, le repliement se déroule à E8 <sup>21</sup>). Le tube reste partiellement ouvert au milieu pour former le canal vitellin, une ouverture vers le sac vitellin avec lequel elle fusionne pour donner le cordon ombilical. Le tube digestif est alors déjà séparé en trois parties : le tube primitif antérieur (qui donnera pharynx, œsophage, estomac, partie proximale du duodénum, ainsi que d'autres organes qui se forment à partir de l'endoderme digestif, dont les poumons), moyen (partie distale du duodénum, intestin grêle, caecum, appendice, côlon ascendant et une partie du côlon transverse) et postérieur (fin du côlon transverse, côlon ascendant, côlon sigmoïde et rectum). Ces parties sont délimitées anatomiquement : elles sont alimentées après leur formation par trois artères différentes (toutes trois des branches ventrales de l'aorte dorsale) ; cependant, elles sont aussi caractérisées par une expression génétique régionalisée des cellules de l'endoderme intestinal (figure 10). Il s'agit de la régionalisation antéro-postérieure, qui est définie avant le repliement, dès la gastrulation <sup>50</sup>. Les axes gauche-droit et dorso-ventral sont également établis à cette période <sup>49</sup>.

L'étude du développement intestinal est souvent concentrée sur son composant endodermique qui forme l'épithélium digestif, mais le mésoderme et l'ectoderme participent également à son développement. L'endoderme intestinal est entouré de mésoderme splanchnique, qui donnera les populations mésenchymateuses entourant la muqueuse. Ces populations incluent les couches musculaires, ainsi que le système vasculaire et lymphatique intestinal, et de nombreux autres types cellulaires conjonctifs. L'ectoderme participe à la formation du tube digestif par la formation du système nerveux entérique (SNE) (dont nous décrivons le développement dans la partie II.D.).

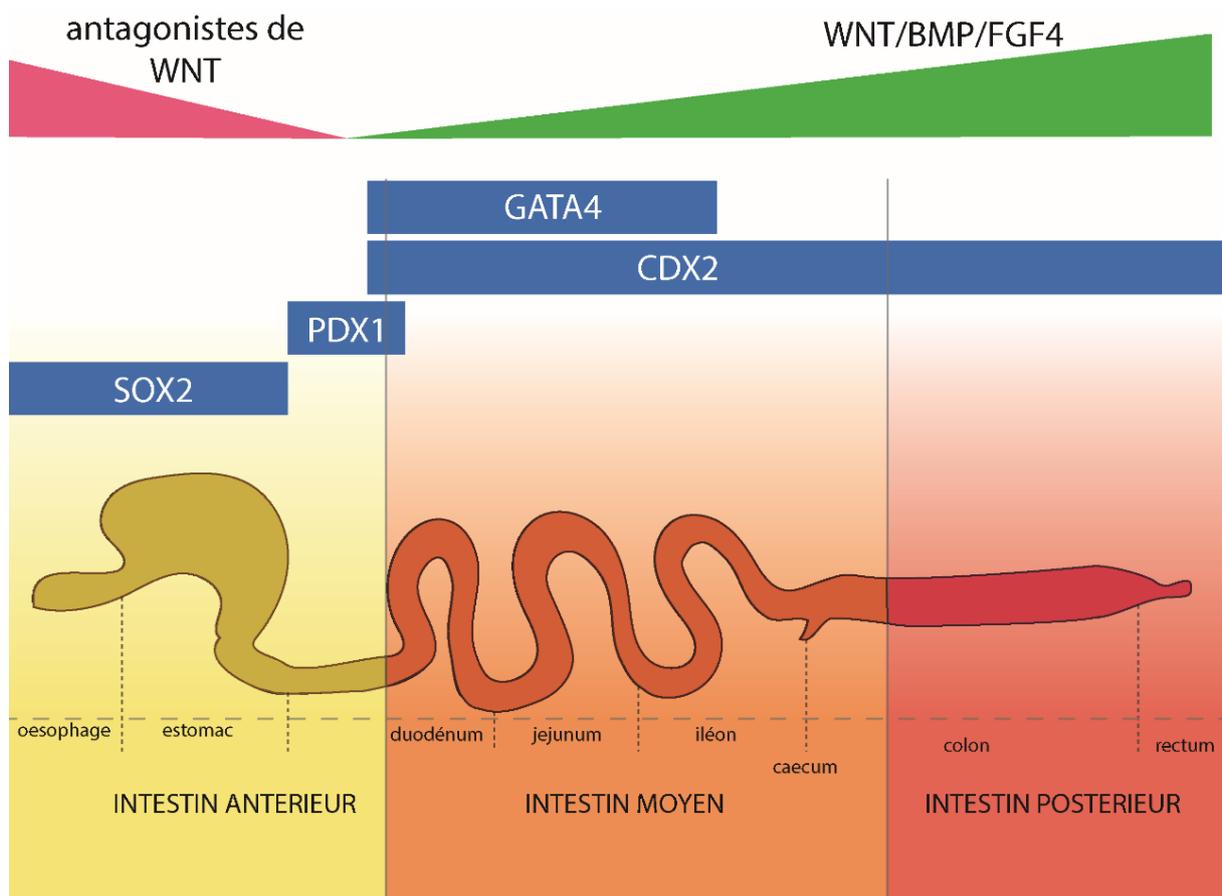
Le tube digestif en développement est donc composé de tissus dérivés de tous les feuillets embryonnaires. Ainsi, l'étude du développement d'un organe comme l'intestin, qui découle du co-développement de plusieurs tissus embryonnaires, implique également d'étudier les interactions complexes qui ont lieu entre ces tissus au cours du développement.

### B. Endoderme et épithélium intestinal

#### RÉGIONALISATION

L'établissement des différents organes de l'endoderme digestif commence dès la gastrulation, avec l'établissement de l'axe antérieur-postérieur, qui se traduit par des gradients d'expression de facteurs de croissance des familles WNT, BMP et FGF. Globalement, il existe dans le sens cranio-caudal un gradient décroissant d'inhibiteurs des voies BMP et WNT, et un

gradient croissant d'expression de BMP, WNT et FGF <sup>50</sup>. Ces gradients induisent l'expression régionalisées de facteurs de transcription spécifiques de l'intestin primitif antérieur ou postérieur au sein de l'épithélium digestif. Ainsi l'intestin antérieur peut-être marqué par l'expression de SOX2, et l'intestin postérieur CDX2, dès E8 chez la souris <sup>21</sup>. Au milieu de ces deux grands domaines, on retrouve l'expression de PDX1 au niveau de la partie rostrale du duodénum (et du pancréas) <sup>51</sup>. Les différentes sous-régions du petit intestin peuvent également être distinguées par l'expression de facteurs de transcription : GATA4 est exprimé dans le duodénum et le jéjunum mais pas l'iléon <sup>21</sup> (figure 10).



**Figure 10 : Gradients de morphogènes et gènes marqueurs impliqués dans la régionalisation du tube digestif**

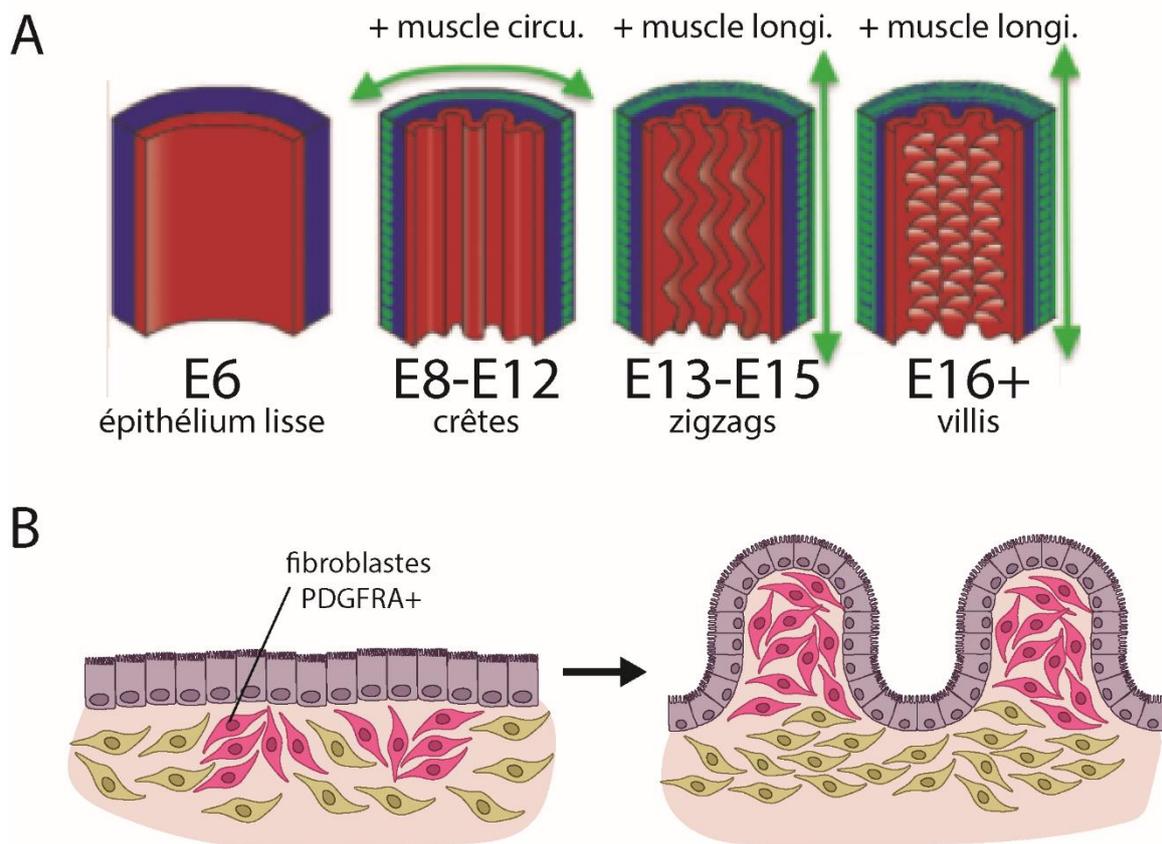
Les gènes marqueurs des régions, exprimés par l'endoderme sont indiqués en bleu ; SOX2 : intestin antérieur, PDX1 : début du duodénum et pancréas, CDX2 : intestin moyen et postérieur, GATA4 : duodénum et jéjunum.

La régionalisation de l'endoderme digestif est donc initiée au cours de la gastrulation, mais elle continue par la suite du développement digestif et est largement influencée par des interactions avec les autres feuilletts embryonnaires (ces processus sont détaillés dans la partie III.A.).

### MORPHOGENÈSE DE L'ÉPITHÉLIUM ET CYTODIFFÉRENCIATION

Au début du développement du tractus digestif, l'endoderme digestif est simple et uniforme le long du tube primitif. Les différents organes du tractus vont ensuite acquérir les morphologies et types cellulaires qui leur sont propres au cours des phénomènes de régionalisation. Cet épithélium est au départ simple, puis entre E9.5 et E14 chez la souris, va se développer en devenant pseudostratifié, puis colonnaire. Ces changements morphologiques s'effectuent dans le sens cranio-caudal de l'estomac au colon <sup>52</sup>.

Un phénomène important pour l'obtention de la surface d'absorption suffisante aux fonctions intestinales est l'émergence des villosités, ou « vilification ». Celle-ci se déroule entre la 7<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, et entre E14.5 et E15.5 chez la souris <sup>53</sup>. Les cryptes apparaissent, elles, plus tard : 11<sup>ème</sup> à 12<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme, et pour la souris, elles ne se développent qu'après la naissance : de P7 à P14 <sup>53</sup>.



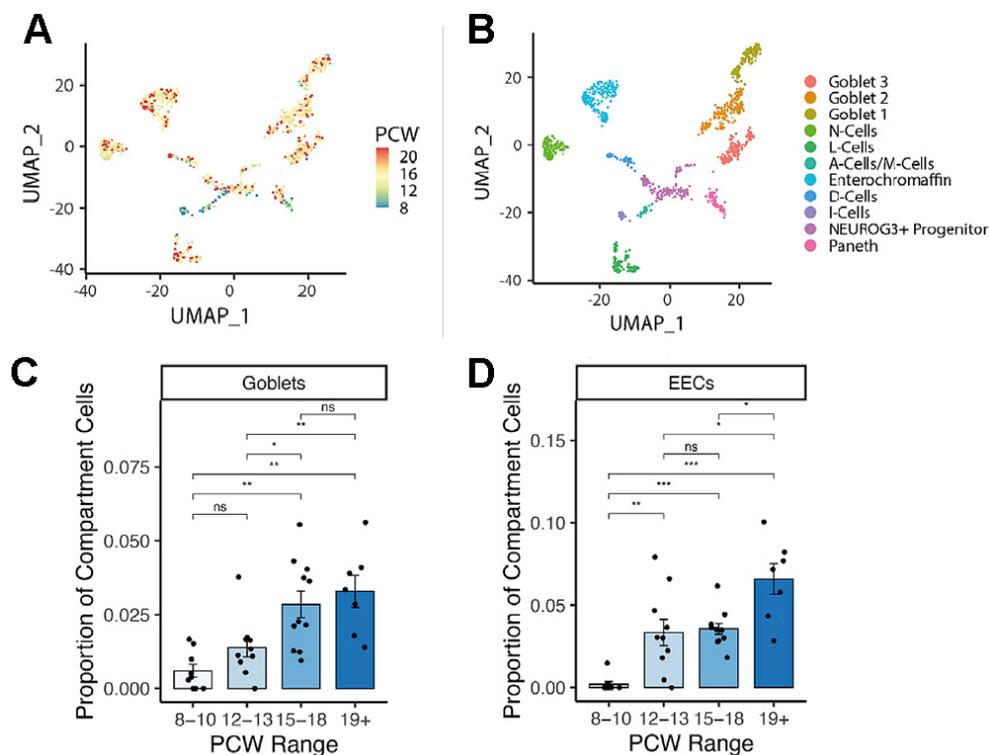
**Figure 11 : Mécanismes de formation des villosités**

**A.** Chez le poulet, la formation des villosités est initiée par des forces mécaniques résultant de la formation des couches musculaires (d'après Huycke 2016) **B.** Chez la souris, les villosités se forment par agrégation de cellules mésenchymateuses PDGFRA+, entre E14.5 et E15.5

Les mécanismes de formation des villosités intestinales sont espèces-spécifiques. Chez le poulet des forces mécaniques induites par la formation des couches musculaires déclenchent l'apparition des villosités. En effet les forces mécaniques créées par le développement successif des deux couches musculaires puis de la musculaire muqueuse causent la formation de crêtes, puis de zigzags et enfin des villosités à la surface de l'intestin <sup>54</sup> (figure 11.A.). Ces

formations en crête puis zigzags précédant l'émergence des villosités n'existent pas chez les mammifères dont la souris, le rat et l'Homme <sup>55</sup>. Chez la souris, il a été montré que la formation des villosités est causée par l'accumulation de cellules mésenchymateuses PDGFRA+ sous les villosités primitives <sup>56</sup> (figure 11.B.). Cette agrégation est causée par une signalisation Hh produite par l'épithélium <sup>57</sup>.

La formation de l'axe crypto-villositaire signifie la formation de la niche souche, où l'on retrouve les CSI. Celles-ci sont identifiables par l'expression du récepteur LGR5 <sup>58</sup>. L'apparition des cellules LGR5+ est associée à celle de l'axe crypto-villositaire. Chez la souris, les cellules Lgr5+ ne sont détectables qu'à la naissance, à la base des villosités, où les cryptes vont se former peu après <sup>59</sup>. Chez le poulet, Lgr5 est exprimé dans tout l'épithélium avant la formation de l'axe et est progressivement restreint avec l'apparition des villosités <sup>60</sup>. Chez l'Homme, l'expression de LGR5 a été détectée de manière diffuse à la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation, avant de se localiser à la base de crypte après leur établissement à la 12<sup>ème</sup> semaine <sup>61</sup>. Chez la souris comme chez le poulet, il a été montré que toutes les cellules de l'endoderme intestinal sont capables de produire des CSI <sup>60,62</sup>. La restriction des CSI à la base des cryptes semble être due à la formation des villosités : l'expression de Shh par l'endoderme déclenche celle de Bmp4 par le mésenchyme sous-jacent dans la villosité en formation, ce qui restreint les CSI à la base de la villosité <sup>60</sup>.



**Figure 12 : Apparition des types cellulaires adultes de la Barrière Epithéliale dans des données scRNAseq d'intestin fœtal humain**

**A.** UMAP des données fœtales, colorées par âge (PCW : Post-Conceptional Week – semaine post-conception) **B.** UMAP colorée par type cellulaire **C.** Proportion de cellules de Goblet (par rapport au nombre de cellules totale) par âge des données **D.** Proportion de cellules entéro-endocrines

Dans une étude de Fawcner-Corbett et al. en 2016 utilisant du séquençage en cellules uniques sur des tissus fœtaux humains, l'apparition des cellules de lignée sécrétoire (EEC, Goblet,

Paneth...) a été détectée entre la 8<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> semaine avec un petit nombre de cellules, mais se met réellement en place à la 12<sup>ème</sup> semaine <sup>61</sup> (figure 12).

### C. Mésoderme et mésenchyme intestinal

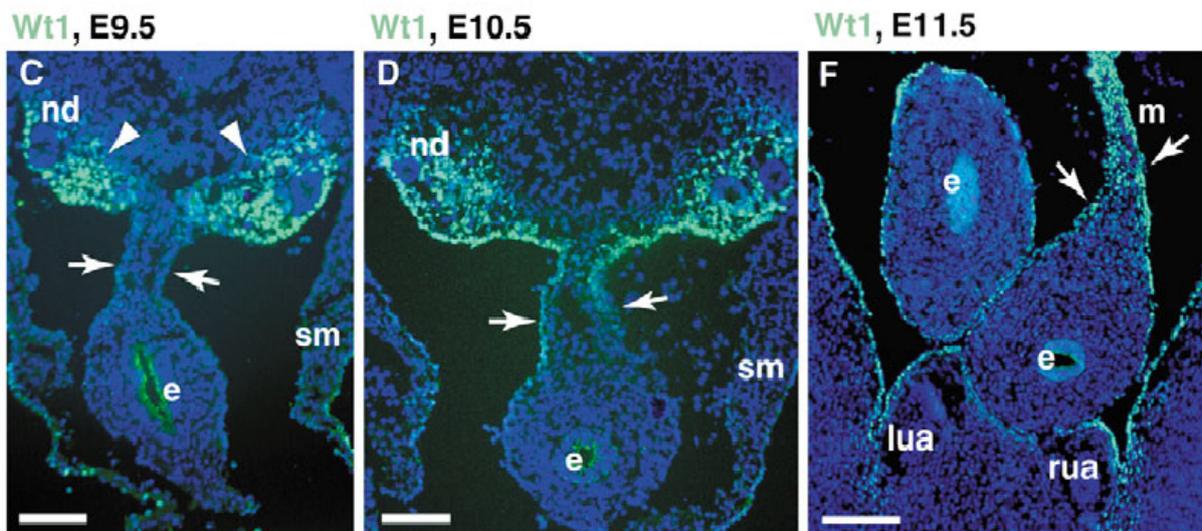
#### LE MÉSODERME SPLANCHNIQUE

Les cellules du mésoderme sont dès leur formation organisées en quatre régions : le mésoderme axial, paraxial, intermédiaire et latéral (classifiées par leur localisation, mais leur potentiel de différenciation est d'ores et déjà différent entre les régions <sup>63</sup>). Le mésoderme latéral peut être subdivisé en mésoderme splanchnique et somatique.

Le mésoderme splanchnique va former une grande partie du système cardiovasculaire, une partie des tissus conjonctifs et muscles cranio-faciaux, le mésenchyme (tissu conjonctif, muscles lisses, vascularisation) des systèmes d'origine endodermiques (tube digestif, système respiratoire, etc. ), et le mésothélium <sup>64</sup> (séreuse qui sépare les organes internes de la cavité abdominale).

Après le repliement du tube digestif, le mésoderme splanchnique qui entoure l'endoderme est une couche homogène de cellules mésenchymateuses indifférenciées, qui vont ensuite produire un grand nombre de types cellulaires différents que l'on peut répartir en plusieurs structures majeures : les couches musculaires (muscle lisse longitudinal et circulaires), la musculaire muqueuse, la vascularisation et le mésothélium.

#### MÉSOTHÉLIUM



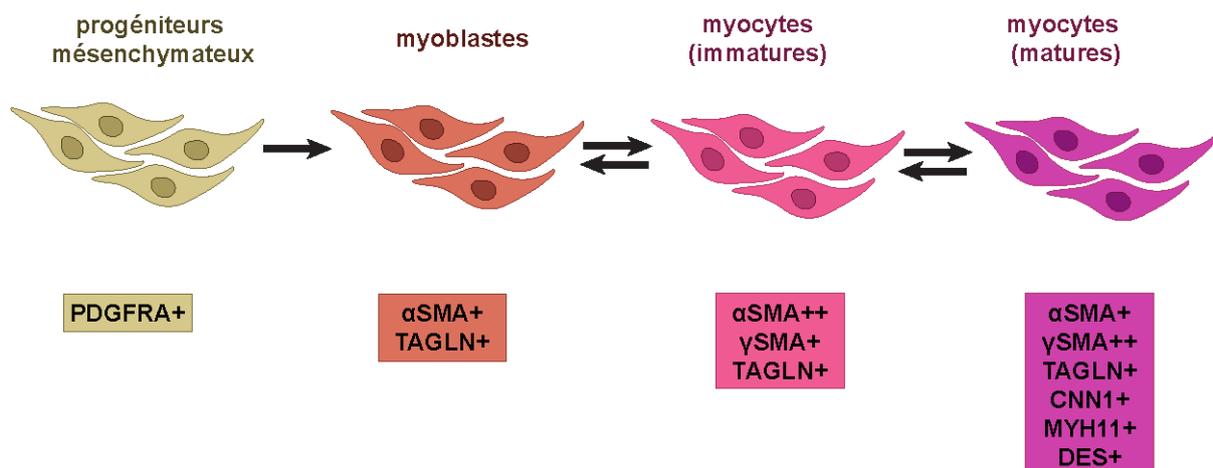
**Figure 13 : Formation du mésothélium chez la souris**

Coupes transversales d'intestins fœtaux marquées pour Wt1 (marqueur du mésothélium). Sm : mésoderme somatique (somatic mesoderm), m : mésentère, e : endoderme, lua/rua : left/right umbilical artery, nd : nephric duct. Barre d'échelle : 100 µm. (d'après Wilm 2005)

Le tube digestif possède une autre surface épithéliale que la barrière luminale, qui n'est pas issue de l'endoderme mais du mésoderme : le mésothélium. Le mésothélium est une séreuse, c'est-à-dire une membrane qui sépare les organes internes de la cavité coelomique. Il recouvre l'extérieur du tube digestif d'une monocouche de cellules squameuses, et a pour fonction principale de protéger les organes internes, mais il a récemment été découvert qu'il joue également un rôle dans le transport de fluides, l'initiation et la résolution de l'inflammation, la réparation des tissus, la protection contre les micro-organismes et possiblement la dissémination de tumeurs <sup>65</sup>. Au cours du développement embryonnaire, le mésoderme splanchnique qui entoure l'endoderme intestinal est initialement dépourvu de mésothélium. Chez la souris, les cellules qui recouvrent le tube digestif expriment les marqueurs du mésothélium (Wt1, Cytokératine) à partir de E11.5 (figure 13), et ces cellules prennent une conformation squameuse à partir de E13.5 <sup>66</sup>.

### COUCHES MUSCULAIRES

Le muscle lisse est un tissu contractile involontaire qui se retrouve dans de multiples parties du corps, et se différencie des muscles squelettiques et cardiaques par leur absence de striation. Dans l'intestin, il forme les deux couches musculaires lisses et peut être trouvé également autour des vaisseaux sanguins (cellules musculaires vasculaires sur les vaisseaux de grande taille, péricytes sur les capillaires). Les cellules des couches musculaires lisse matures sont principalement reconnues par l'expression de l'isoforme alpha de la smooth muscle actin ( $\alpha$ sma, gène ACTA2), mais d'autres marqueurs, tels que sm22 (la transgeline, gène TAGLN), la forme  $\gamma$  de la smooth-muscle actin ( $\gamma$ sma, gène ACTG2), smMHC (smooth muscle myosin heavy chain ou myosin, gène MYH11), la desmine (gène DES) ou la calponine (gène CNN1) <sup>67</sup>.



**Figure 14 : Différenciation de cellules du mésoderme en cellules musculaires lisse et marqueurs associés**

Les cellules musculaires lisses (SMC) sont issues de cellules mésenchymateuses PDGFRA+, et se différencient en plusieurs étapes pour acquérir un phénotype contractile, mais peuvent cependant perdre ces propriétés contractiles pour revenir à un phénotype moins différencié (parfois appelé « synthétique »)

Les cellules progénitrices des SMC (smooth muscle cells - cellules musculaires lisses) sont originaires du mésenchyme intestinal, et sont définies par l'expression de PDGFRA et LIX1 <sup>68,69</sup>. Leur différenciation se déroule en deux étapes majeures. Le mésoderme se différencie tout

d'abord en un type progéniteur désigné comme myoblaste, marqué par l'expression de  $\alpha$ SMA et TAGLN. Celui-ci se différencie ensuite en myocyte, qui exprime aussi tout d'abord  $\gamma$ SMA en proportion plus faible que son expression d' $\alpha$ smA (myocyte immature), puis plus forte (myocyte mature) <sup>70</sup> (figure 14). Les myocytes expriment également d'autres protéines contractiles, telles que la calponine, smMHC et la desmine. Chez la souris, la différenciation des cellules progénitrices en myoblastes puis en myocytes immatures se déroule en 12 à 24H, mais la maturation de ces myocytes n'arrive qu'après la naissance <sup>70</sup>.

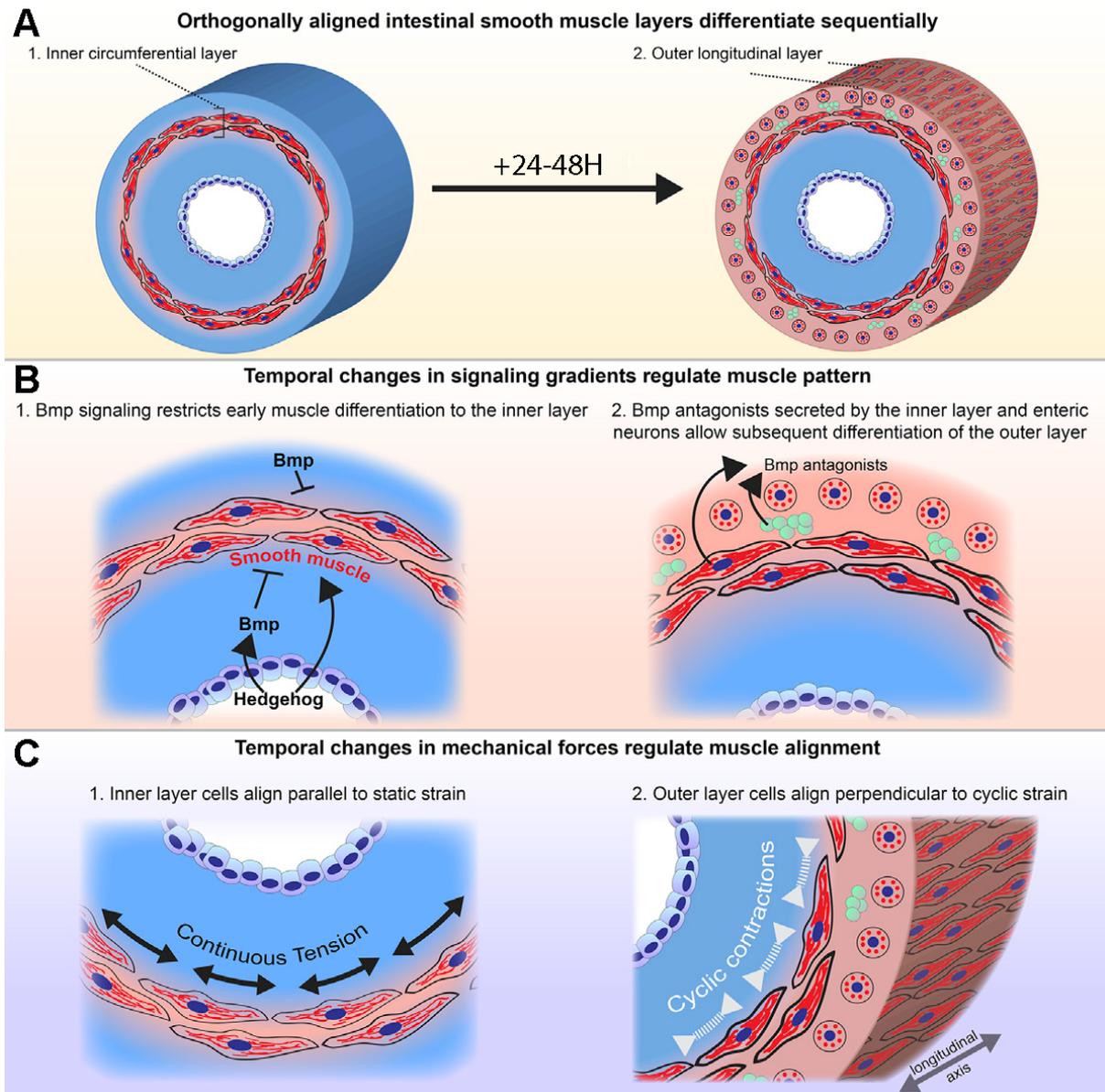
Les SMC sont des cellules particulièrement plastiques, qui gardent la capacité de se dédifférencier entre des cellules matures – quiescentes et contractiles – et immatures – prolifératives et migratoires (aussi appelées « synthétiques » car elles produisent de nombreuses molécules de la MEC). Chez l'adulte, cette différenciation peut être déclenchée par des signaux environnementaux tels que l'inflammation ou la composition du microbiote <sup>71</sup>.

Chez l'Homme, des cellules  $\alpha$ SMA+ apparaissent le long de l'intestin de manière rostro-caudale entre la 7<sup>ème</sup> (dans l'œsophage) et la 9<sup>ème</sup> semaine (dans le côlon)<sup>72</sup> (chez la souris de E11 à E13) <sup>70</sup>. Le muscle lisse circulaire se développe le premier, et un anneau épais attestant de la formation en couche entière des muscles circulaires peut être distingué dans l'œsophage à la 8<sup>ème</sup> semaine et dans le côlon à la 11<sup>ème</sup> semaine. A la 11<sup>ème</sup> semaine, les deux couches (circulaire et longitudinale) sont clairement discernables. Chez la souris comme chez l'Homme, le muscle lisse longitudinal se développe 24 à 48H après le circulaire <sup>70</sup> (figure 15.A.). La musculaire muqueuse se forme en dernière. Chez l'Homme, elle se développe à la 14<sup>ème</sup> semaine <sup>34</sup>.

Les voies de signalisation HH et BMP ont été depuis longtemps impliquées dans l'initiation de la formation des couches musculaires. La perte de signalisation HH induit une inhibition de la différenciation des SMC et la culture avec IHH peut induire la différenciation de SMC *in vitro* en augmentant l'expression de myocardine <sup>73</sup>.

Dans un modèle publié en 2019, Huycke et al suggèrent que la production de Hh par l'endoderme - qui favorise donc la différenciation des SMC - couplée à la production de Bmps elle-même déclenchée par Hh dans le mésenchyme directement sous l'épithélium, qui inhibe la différenciation dans la région externe du tube ainsi que la région sous-épithéliale, permet l'initiation de la formation d'une couche fine de cellules musculaires dans la couche circulaire (figure. 15.B) <sup>74</sup>. Les auteurs suggèrent ensuite que la formation de la couche longitudinale est également médiée par une inhibition locale de BMP, effectuée à la fois par les muscles circulaires et le SNE en développement (figure 15.B.) <sup>74</sup>.

Une particularité remarquable des couches musculaires intestinales est leur orientation opposée. Les cellules mésenchymateuses sont capables de s'aligner en réponse à des stimuli mécaniques, et l'orientation de cet alignement est dépendant de divers paramètres physiques tels que l'amplitude et la fréquence de ces stimuli, ainsi que les propriétés physiques du substrat auquel les cellules sont attachées <sup>75</sup>. Les cellules musculaires lisses en particulier sont influencées par les forces d'étirement statique <sup>76</sup>. Chez l'embryon de poulet, il a été montré que l'alignement des muscles circulaires est dû à un étirement statique causé par une croissance différentielle entre les couches intérieures et extérieures du mésenchyme intestinal, tandis que les muscles longitudinaux s'orientent à cause de contractions cycliques produites par les muscles circulaires sous-jacents (figure 15.C.) <sup>74</sup>.



**Figure 15 : Développement des couches musculaires de l'intestin**

**A.** Différentiation séquentielle des couches musculaires circulaires et longitudinales **B.** Induction de la formation des couches musculaires **C.** Orientation des couches musculaires induites par des forces mécaniques. (D'après Huycke et al. 2019)

## VASCULARISATION INTESTINALE

La vascularisation est formée de deux types cellulaires principaux. Les cellules endothéliales (EC - endothelial cells), qui tapissent l'intérieur du vaisseau sanguin. Ces cellules forment un épithélium squameux reposant sur une lame basale. Elles peuvent être reconnues par l'expression de molécules spécifiques telles que CD31, CD34, KDR ou PECAM-1. Elles sont entourées de cellules murales (cellules vasculaires musculaires - vSMC : vascular smooth muscle cells - dans les vaisseaux plus larges, péricytes dans les vaisseaux de petite taille). Il s'agit de cellules musculaires lisses qui possèdent à la fois une fonction structurale - production de MEC

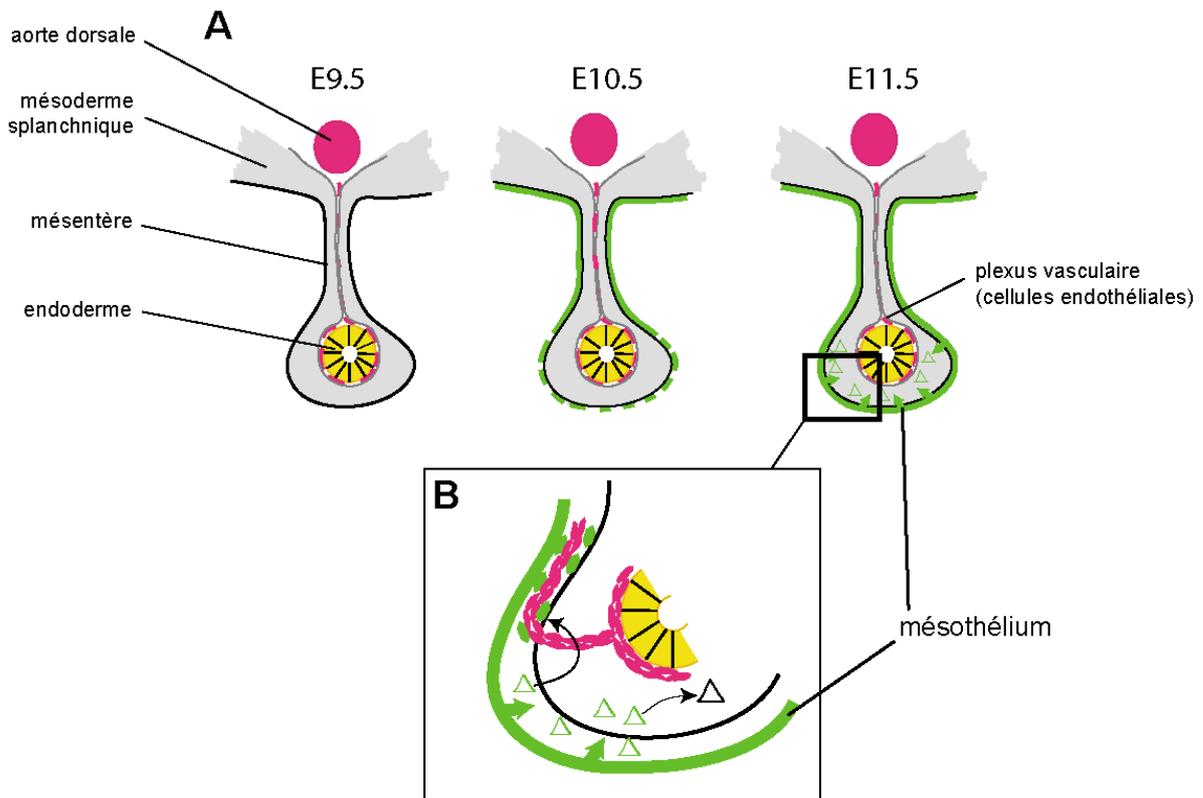
et soutien des cellules endothéliales -, et contractiles - régulation de la contractilité et perméabilité des vaisseaux. Ces cellules expriment effectivement des gènes musculaires tels que  $\alpha$ SMA ou SM22, et sont cependant identifiables aux cellules musculaires lisses par l'expression différentielle de gènes musculaires : les cellules musculaires lisses viscérales expriment par exemple la smootheline A (gène STMN1) ou la  $\gamma$ SMA (gène ACTG2), mais pas les cellules murales <sup>67</sup>. Comme les SMC, les vSMC et pericytes peuvent prendre un phénotype synthétique. Chez l'embryon, les vSMC/pericytes des vaisseaux en formation exhibent d'abord un phénotype synthétique avant d'être contractiles <sup>77</sup>. Chez l'adulte, les vSMCs sont contractiles mais peuvent se dédifférencier en réponse à une lésion vasculaire <sup>78</sup>.

Le développement du système vasculaire du tube digestif est peu connu. Le tube digestif est alimenté par trois branches de l'aorte abdominale : les artères coéliquales (intestin antérieur), mésentérique supérieure (intestin moyen) et mésentérique inférieure (intestin postérieur). Ces artères se trouvent à la surface séreuse du tube digestif <sup>49</sup>.

Chez la souris, il a été montré qu'un plexus de cellules endothéliales, sans cellules murales, associé à l'endoderme et qui s'étend dans le mésentère peut être détecté dès E8.5. Ces EC envahissent le tube digestif pour former un plexus capillaire entre E9.5 et E11.5, ce qui constitue une vascularisation primaire du tube <sup>66</sup> (figure 16). Ce plexus est initialement homogène, et se hiérarchise ensuite par remodelage entre E11.5 et E15.5. Ce remodelage est corrélé avec le recrutement de cellules murales - qui apparaissent dans le mésentère à partir de E12.5 <sup>79</sup>. Une autre étude ne détecte pas de cellules murales dans l'intestin ou les mésentères avant E16 <sup>66</sup>. Ceci concorde avec les travaux réalisés dans d'autres espèces comme la caille <sup>80</sup>, ainsi qu'avec une étude récente chez l'homme, cherchant à caractériser les populations embryonnaires du tube digestif humain par séquençage en cellule unique, qui a montré que les EC se différencient en sous-types (veineux, artériel...) avant les cellules murales <sup>61</sup>.

Toujours chez la souris, il a été montré que le mésothélium est une source majeure des cellules murales de la vascularisation du tube digestif. Une partie des cellules du mésothélium subissent une TEM (transition épithélio-mésenchymateuse) peu après sa formation (entre E12.5 et E18.5), et se différencient en cellules vasculaires musculaires (mais pas en cellules endothéliales) pour constituer une majorité (77%) des cellules murales du système vasculaire digestif, y compris dans le mésentère <sup>66</sup>.

Une étude récente comparant par séquençage ARN des cellules endothéliales humaines (CD31+CD144+) issues de plusieurs organes en développement (petit intestin, poumons, reins) a pu montrer qu'il existe des programmes transcriptionnels organes-spécifiques chez les cellules endothéliales <sup>81</sup>.



**Figure 16 : Développement du mésothélium et de la microvascularisation intestinale chez la souris**  
 (adapté depuis Wilm 2005) **A.** Formation du mésothélium **B.** Les cellules mésothéliales participent à la formation des vaisseaux de la microvascularisation intestinale après avoir subi une TEM

## AUTRES POPULATIONS MÉSENCHYMATEUSES

Les myofibroblastes sub-épithéliaux (ISEMFs) expriment  $\alpha$ SMA, comme les autres populations musculaires, mais leur sont distinguable par leur non-expression de la desmin (DES). Ils se développent à la 21<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme, et à E18.5 chez la souris <sup>82</sup>.

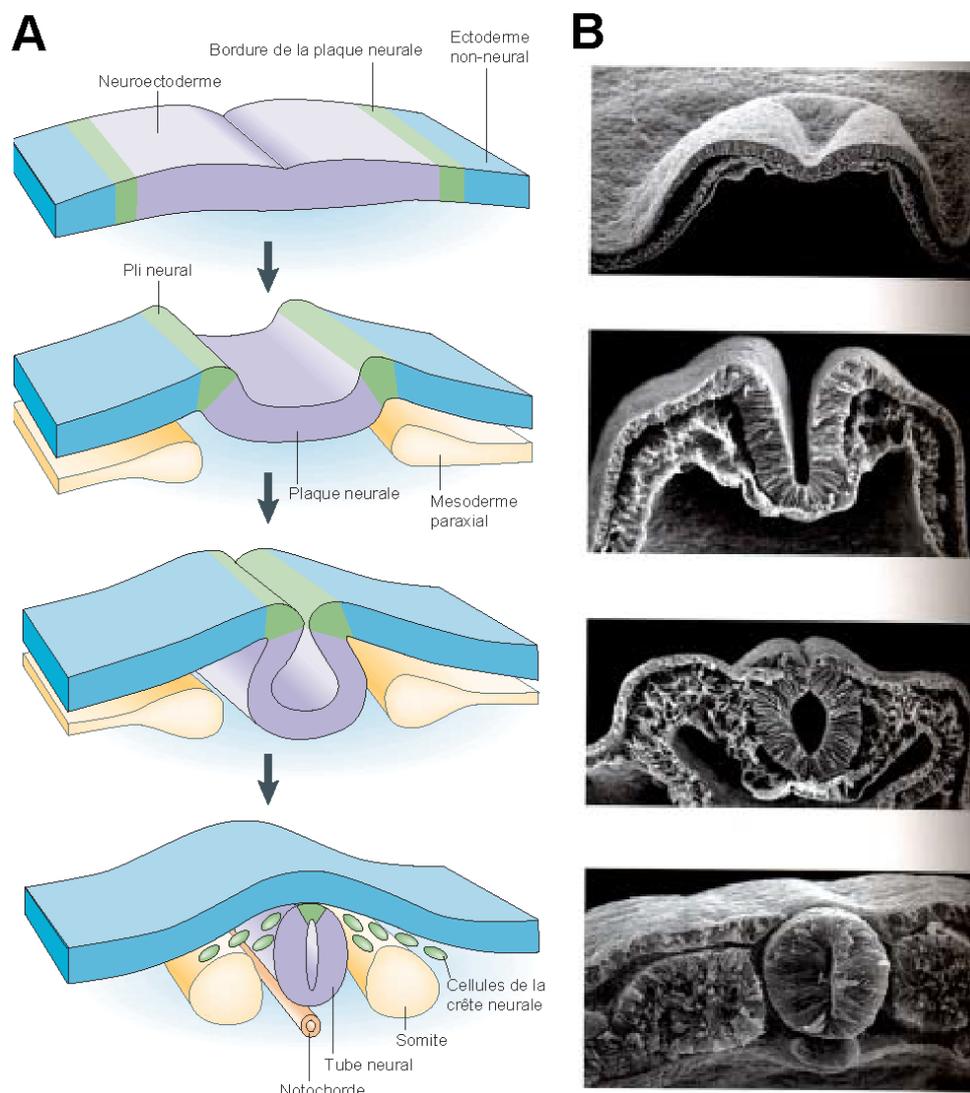
Les cellules de Cajal (CIC) peuvent être détectées par leur expression des protéines KIT et ANO1. Les CIC sont détectables dans l'intestin humain dès la 7<sup>ème</sup> semaine <sup>72</sup>. La communication entre les CIC et le muscle lisse peut être détectée à partir de E18.5 chez la souris, avec la production d'ondes lentes par les cellules musculaires <sup>83</sup>, avant le début des contractions contrôlées par le SNE.

## D. Ectoderme et crête neurale entérique

### DÉFINITION ET INTÉRÊT

Comme décrit précédemment, l'ectoderme est formé par les cellules de l'épiblaste restantes après la formation de l'endoderme et du mésoderme. Immédiatement après la mise en place des trois feuilletts embryonnaires, un autre événement majeur se produit : la neurulation. La neurulation est un phénomène qui a pour résultat la formation du tube neural, une structure embryologique qui est précurseur du système nerveux chez les chordés : il s'agit

donc de la première étape de formation du système nerveux. La neurulation est induite par des interactions entre l'ectoderme fraîchement formé et le nœud primitif, qui induisent un épaissement de l'ectoderme pour former la plaque neurale, une zone de cellules neuro-épithéliales columnnaires et pseudo-stratifiées. La plaque neurale va ensuite former la gouttière neurale en se pliant vers l'intérieur, puis se refermer complètement pour former le tube neural (figure 17). Après son repliement, les cellules qui formaient les extrémités de la gouttière neurale (le pli neural) vont s'en détacher puis migrer pour former diverses autres structures embryologiques : il s'agit de la crête neurale<sup>49</sup>. Le tube neural donnera la majorité du système nerveux central (cerveau et moelle épinière), tandis que la crête neurale donnera naissance au système nerveux périphérique (dont le système nerveux entérique), à une grande partie du mésenchyme crânial ainsi qu'à de nombreux autres dérivés tels que des odontoblastes, adipocytes, cellules musculaires cardiaques, cartilage et squelette crâniens, ou encore des cellules pigmentaires. Ces nombreux dérivés ont pu être mis en évidence notamment grâce au système de greffe poulet/caille développé par Nicole Le Douarin dans les années 60<sup>84</sup>.



**Figure 17 : Fermeture du tube neural et délamination des cellules de la crête neurale**

**A.** Représentation schématique (d'après Gammil 2003) **B.** Images de microscopie électronique (d'après Jessell & Sanes, Principles of Neuroscience 4th edition, 2002)

Du côté clinique, les pathologies qui dérivent d'un défaut de développement de la crête neurale sont désignées sous le nom de neurocristopathies<sup>85</sup>. Dans le cadre du développement du SNE, la neurocristopathie la plus connue est la maladie de Hirschsprung (HSCR) (décrit dans la partie II.D.).

MIGRATION ET DEVENIR DE LA CRÊTE NEURALE

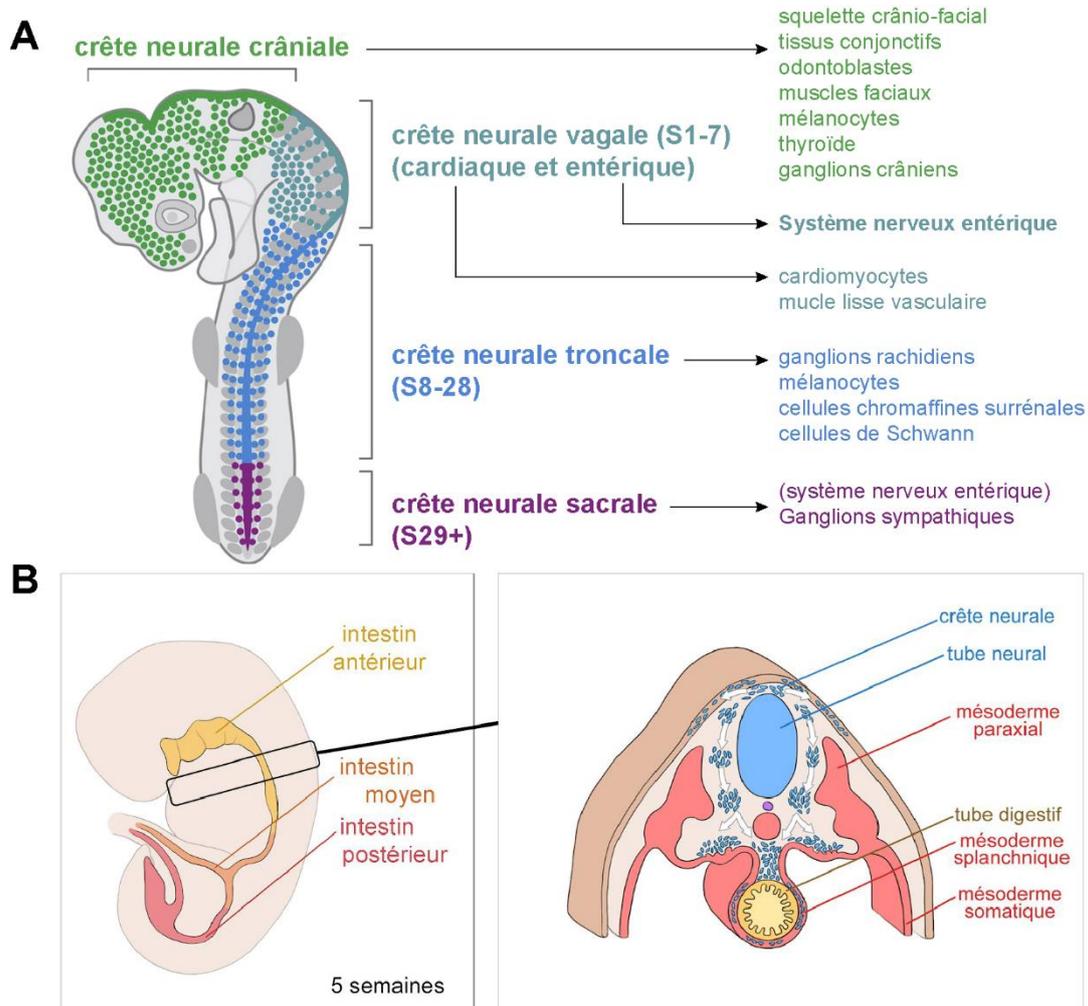


Figure 18 : Régions de la crête neurale et leur route de migration

A. Délimitation des régions de la crête neurale et ses principaux dérivés (adapté d'après Rothstein 2018) B. Chemin de migration des crêtes neurales vagues vers l'intestin antérieur

Chez la plupart des vertébrés, la crête neurale peut être délimitée en quatre régions : les crêtes neurales crânielles (région céphalique), vagues (somites 1 à 7), troncales (somites 8 à 28) et sacrées (somite 28 et postérieures). Chez les amniotes, les crêtes neurales vagues peuvent de plus être séparées en deux groupes qui se superposent : les crêtes neurales cardiaques (somites 1-3 chez le poulet, somites 1-4 chez la souris) et entériques (somites 4 à 7)

<sup>86</sup>. Les délimitations et principaux devenir des différentes sous-populations de la crête neurale sont décrites dans la figure 18.A.

Le tube neural étant composé de cellules épithéliales, les cellules de la crête neurale vont subir une délamination et une transition épithélio-mésenchymateuse, pour se détacher du tube, puis commencer à migrer vers diverses parties de l'embryon. La délamination des cellules de la crête neurale des régions céphalique à sacrée s'effectue dans une vague dans l'axe cranio-caudal. La délamination est causée par une coordination de signaux BMP, WNT, FGF, RA (acide rétinoïque) & Notch produits par l'ectoderme, le neuroépithélium, et le mésoderme adjacent, ce qui induit la production de facteurs de transcription (Snail/Slug, Foxd3, SoxE) qui délimitent le territoire de la crête neurale et contrôlent son développement <sup>87</sup>.

La migration des cellules de la crête neurale (NCC) est dirigée à la fois de manière passive (i.e. - microenvironnement permissif à leur migration) et active (i.e. - attraction des NCC par les populations résidentes des tissus dans lesquels elles migrent).

Le chemin emprunté par les NCC est dépendant de la composition de la matrice extracellulaire (MEC), certains composants étant permissifs à leur migration tandis que d'autres y sont inhibiteurs. Par exemple, les NCC sont uniquement capables de migrer à travers la partie crâniale des somites, qui contient des composants de MEC permissifs tel que la ténascine, la fibronectine et la laminine ; tandis que la partie caudale produit des protéines inhibitrices à la migration des NCC dont des protéoglycans et PNA-binding molécules, F-spondins et ephrines <sup>88</sup>. Les mécanismes régissant les interactions entre les NCC et la MEC sont cependant région-spécifique <sup>88</sup>.

Les cellules de la crête neurale sont également guidées pendant leur migration par des molécules chimiotactiques, attractives (e.g. GDNF, neurégulines) et répulsives (e.g. slits, sémaphorines). Ces voies de signalisation semblent être impliquées dans le devenir cellulaire des NCC également, car les prédispositions des sous-populations de la crête neurale répondent différemment à ces signaux. Par exemple, l'ephrine est répulsive à la migration des NCC destinées à se différencier neurones et cellules gliales périphériques, mais attractive pour les futurs mélanoblastes. De même, les NCC troncales sont repoussées par slit, qui est exprimé dans le mésenchyme du tube digestif, tandis que les NCC vagues (vNCC) ne sont pas affectées par la présence de cette protéine, car elles n'expriment pas son récepteur <sup>89</sup>.

### LA CRÊTE NEURALE ENTÉRIQUE - MIGRATION ET COLONISATION

#### *Sous-populations de NCC contribuant au SNE*

La contribution de la crête neurale au développement de l'intestin est principalement liée au développement du système nerveux entérique (SNE), qui est un dérivé de la crête neurale entérique. Les cellules de la crête neurale entérique (ENCC) sont principalement des cellules issues de la crête neurale vagale (somites 1-7), et l'ablation de cette population avant leur migration empêche le développement du SNE <sup>90</sup>. Les différents somites ne contribuent cependant pas de manière égale à la construction du SNE. Il semblerait qu'il existe des différences inter-espèces, mais de manière générale, les crêtes neurales vagues provenant de somites de niveau moyen contribuent plus que les autres à la formation du SNE, chez le poulet <sup>91-93</sup> et la souris <sup>94</sup>.

La migration de ENCC se déroule dans un mouvement rostro-caudal de l'œsophage au côlon, entre la 4<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme <sup>34</sup> (E8.5 à E14 chez la souris <sup>95</sup>, E4 à E8 chez le poulet) <sup>96</sup>. L'intestin grêle (intestin moyen primitif) est donc colonisé entre la 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaine chez l'Homme <sup>34</sup>. Les cellules de la crête neurale vagale expriment les marqueurs SOX10, SOX2, P75 et HNK1. Leur transition vers des ENCC (qui se produit quand elles commencent à envahir le mésenchyme de l'intestin primitif antérieur), quelques jours après leur délamination chez l'Homme (et à E9.5 chez la souris) est marqué par l'expression supplémentaire de RET, PHOX2B et EDNRB <sup>97</sup>.

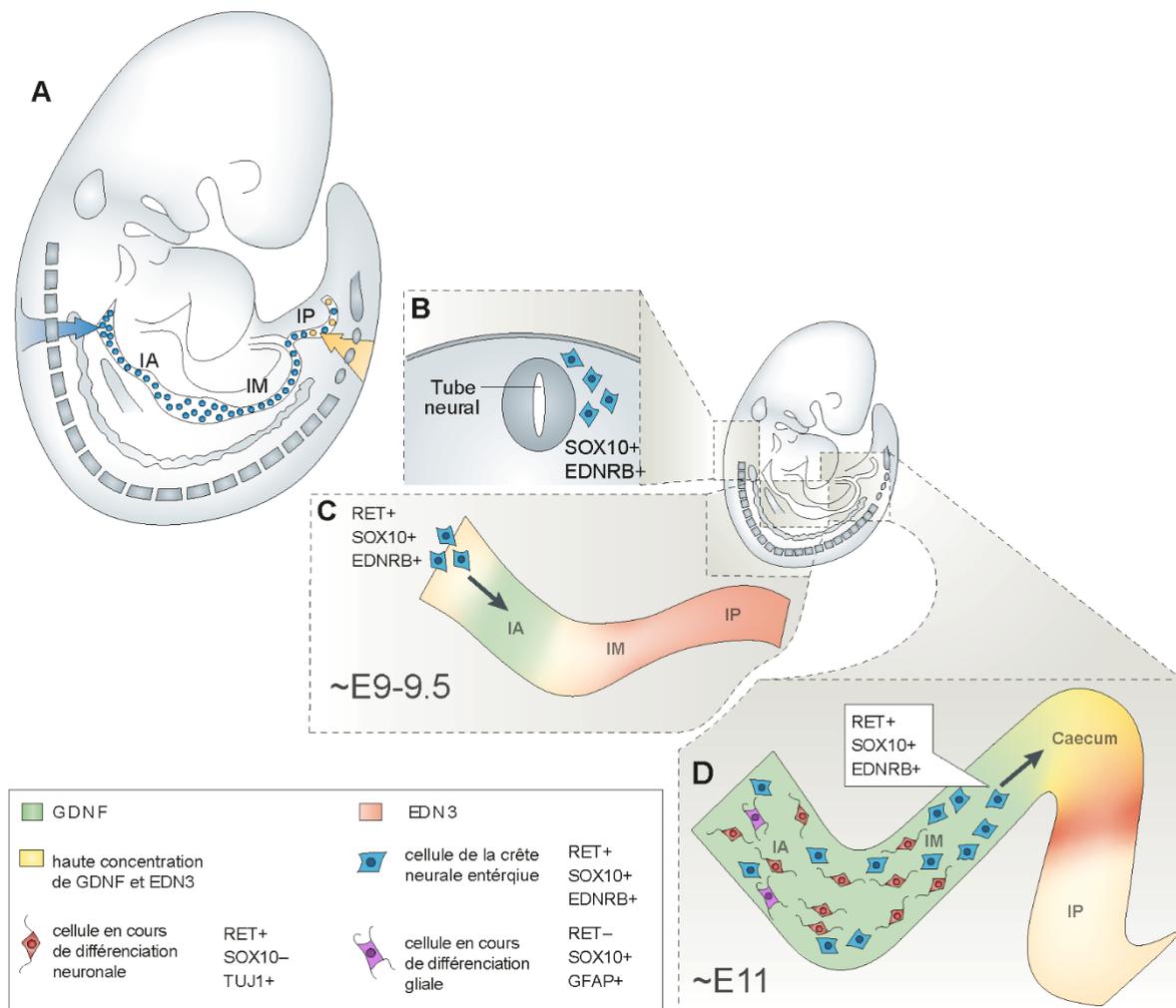
Les vNCC forment la majeure partie du SNE, mais d'autres populations semblent participer à sa formation : les crêtes neurales sacrées (somites 28 et postérieures). Celles-ci participent en effet à la formation des ganglions nerveux dans la partie post-ombilicale du tube digestif. Cette contribution est minoritaire, mais il a été montré qu'elle peut atteindre 17% des neurones entériques dans le côlon distal chez le poulet <sup>98,99</sup>. Il est cependant important de noter que l'ablation de ces crêtes neurales sacrées n'empêche pas la formation complète du SNE (car les vNCC compensent leur absence), ni que leur présence est suffisante pour innerver le côlon distal en l'absence de vNCC. La contribution sacrée est plus disputée chez la souris <sup>100</sup>. Une étude réalisée en 2008 a de plus montré que chez la souris, des progéniteurs endodermiques (de la lignée pancréatique) produisent une partie des neurones entériques (particulièrement dans le plexus myentérique dans la partie proximale de l'intestin) <sup>101</sup>.

Les implications suggérées pour ces différentes études varient du phénomène de sauvetage dans les défauts de migration (dans le cas d'une maladie de Hirschsprung - qui est causée par une colonisation incomplète du tube digestif par les ENCC) à un résultat fortuit des programmes évolutifs communs à différentes populations, certains programmes développementaux neuronaux et pancréatiques étant contrôlés par les mêmes gènes régulateurs. Quelle que soit la raison ou les mécanismes sous-jacents de la complexité de ces phénomènes, ces études attestent de la plasticité à la fois des structures transitionnelles (la crête neurale) et définitives (le SNE) que nous étudions.

Un autre phénomène notable est celui des ENCC trans-mésentériques. En effet, chez la souris une partie des vNCC qui colonisent le côlon proviennent de cellules qui ont traversé le mésentère pour passer de l'intestin moyen à postérieur en contournant le caecum (entre E10.5 et E11.5), en devançant ainsi le front de migration <sup>102</sup>. Ce phénomène est possible car à ce stade, cette région de l'intestin forme une boucle en tête d'épingle. Chez le poulet, cette population trans-mésentérique ne peut exister, car la boucle qui leur permet de traverser le mésentère est formée après le passage du front de migration. Chez l'Homme, l'existence de cette population est disputée en condition physiologique pour des raisons similaires, à cause des chronologies respectives de la migration des ENCC et de la formation de cette boucle intestinale. Ce phénomène existe cependant dans le cas de la maladie de Hirschsprung dite « skip-segment » <sup>103,104</sup>.

Une étude de 2015 a de plus montré qu'après la naissance chez la souris, des précurseurs de cellules de Schwann colonisent également le tube digestif lors de l'innervation extrinsèque du tube digestif et s'y différencient en neurones entériques <sup>105</sup>. En condition physiologiques, cette population contribuerait à 20% des neurones entériques et serait limité à certains sous-types de neurones (calretinin+), et particulièrement importante dans l'innervation du colon <sup>105</sup>, mais dans des modèles murins de maladie de Hirschsprung, ces progéniteurs peuvent se différencier en d'autres sous-types neuronaux, en compensation aux vNCC absents <sup>106</sup>.

## Migration - voies de signalisation



**Figure 19 : Voies de signalisation impliquées dans la migration des ENCC**

(adapté depuis Heanue et Pachnis 2007) **A.** Chemin de migration pris par les crêtes neurales vagues (bleues) et sacrées (jaunes) chez la souris **B.** Les ENCC migrent depuis le tube neural **C-D.** Lors de leur migration, les ENCC sont attirées par les molécules GDNF (ligand du récepteur RET) et EDN3 (ligand du récepteur EDNRB). GDNF est exprimé dès l'intestin antérieur, tandis que EDN3 est exprimé dans l'intestin moyen et postérieur. IA : Intestin Antérieur, IM : Intestin Moyen, IP : Intestin Postérieur.

Une des voies de signalisation les plus connues dans la migration de la crête neurale entérique est la voie RET-GDNF. La protéine RET (REarranged during Transfection) est une tyrosine kinase qui sert de récepteur aux ligands de la famille GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor). Chez les ENCC, GDNF active un complexe composé de RET et de son corécepteur GFR $\alpha$ 1 (Gdnf Family Receptor  $\alpha$ 1)<sup>107</sup>. Les cellules de la crête neurale vagale et sacrée commencent à exprimer RET à leur surface juste avant leur entrée dans la paroi du tube digestif en développement. GDNF est lui exprimé par les cellules du mésenchyme digestif<sup>97</sup>. La voie de signalisation RET remplit plusieurs fonctions qui peuvent être différentes en fonction du stade de différenciation des ENCC. Lors des phases précoces de la migration, RET permet la survie et la prolifération des ENCC<sup>97</sup>. De plus, GDNF est un chimioattractant pour les cellules de la crête

neurale vagale, et est le plus fortement exprimé dans le mésenchyme intestinal devant le front de migration <sup>108</sup>. Des études ont établi que les gradients de GDNF dans le mésenchyme du tube digestif en développement donnent sa direction cranio-caudale à la migration des ENCC (figure 19), et que ces gradients sont capables de promouvoir l'excroissance directionnelle de neurites sur les ENCC <sup>109</sup>.

Plus tard dans le développement du système nerveux entérique, la signalisation GDNF-RET favorise la différenciation en neurones <sup>97</sup>. En plus de GDNF, une autre molécule proche, la neurturine, active également la voie RET et est impliquée dans le développement du SNE. Des mutations sur ce gène causent chez la souris une hypoganglionose spécifiquement dans le plexus myentérique <sup>110</sup>.

Une autre voie de signalisation très connue pour son implication dans le développement du SNE est la voie EDNRB-endothelin3 (EDN3). EDN3 est exprimé dans le mésenchyme intestinal et EDNRB, son récepteur, est exprimé sur les ENCC. Le rôle principal de cette voie de signalisation est d'inhiber la différenciation des ENCC et de les garder dans un état prolifératif, ce qui est nécessaire à la colonisation de l'entière du tube digestif. En effet, une fois différenciées, les ENCC+9 ne sont plus capables de migrer plus loin <sup>111</sup>.

La voie de signalisation HH est nécessaire à la colonisation du mésenchyme par les progéniteurs du SNE (en contrôlant l'expression de GDNF et ainsi, la migration des ENCC) <sup>112</sup>. La voie BMP est elle aussi impliquée. En effet BMP2 et BMP4 est produit par le mésoderme intestinal, et dans étude chez le poulet, l'inhibition de l'activité Bmp (par surexpression de Noggin dans les mésoderme) déclenche un délai de migration des ENCC ainsi qu'une perturbation de la formation des ganglions <sup>113</sup>.

La MEC est également une composante importante à la migration, prolifération et survie des ENCC. Il a récemment été mis en évidence que les molécules liées à leur adhésion contribuent au développement du SNE en régulant la migration des ENCC. Chez des souris qui n'expriment pas l'intégrine B1 (un récepteur nécessaire à leur adhésion à la MEC par liaison au collagène) dans leurs ENCC, la colonisation du tube digestif est incomplète <sup>114</sup>. De même, la migration complète nécessite la molécule d'adhésion L1CAM qui est exprimée au début de la migration des ENCC, puis plus tard pendant la différenciation neuronale et l'extension axonale <sup>115</sup>. N-cadhérine exprimé par les ENCC joue également un rôle dans la directionnalité de leur migration <sup>116</sup>.

La composition de la MEC elle-même est également à prendre en compte : plusieurs études ont lié des modifications de la MEC à la maladie de Hirschsprung. La laminine favorise la neurogénèse <sup>117</sup> et peut donc causer la différenciation précoce des ENCC, ce qui ralentit leur migration. Ce mécanisme a été mis en cause pour des souris avec une mutation EDN3 <sup>118</sup> et EDNRB <sup>119</sup>. Le collagène de type IV et la fibronectine favorisent la migration des ENCC <sup>120</sup>, tandis que le collagène de type VI est un mauvais substrat pour leur migration <sup>121</sup>. En effet des études cliniques ont pu montrer qu'il existe des anomalies dans la composition de la MEC du tube digestif chez des patients Hirschsprung <sup>122,123</sup>.

La vitesse de migration des ENCC est de plus affectée par la rigidité et l'élasticité de leur environnement <sup>124</sup>, qui est dépendante de la composition de la MEC.

En retour, les ENCC sont également capables de modifier substantiellement la MEC. En effet, il a été montré chez le poulet que les ENCC produisent du collagène 18 et de l'agrine, deux molécules de la MEC qui affectent leur migration <sup>125</sup>. Chez le poulet, mais pas chez la souris et

le rat, les ENCC produisent également de la ténascine C, une fibre élastique qui facilite leur migration <sup>126</sup>. De plus les ENCC produisent des molécules qui remodelent la MEC, telles que des métalloprotéases, qui permettent la dégradation du collagène <sup>124</sup>.

### *Mécanismes de migration*

La colonisation du tube digestif par les ENCC est un phénomène de migration particulier à cause de la longueur extensive que ces cellules doivent parcourir, ce qui requiert des mécanismes de migrations particuliers.

La densité cellulaire des ENCC est critique à une colonisation réussie du tube digestif. Il a été montré que la réduction du nombre de vNCC cause une aganglionose distale chez le poulet <sup>127</sup>. Une densité faible des ENCC a en effet pour conséquence de ralentir leur vitesse de migration, et vers la fin de leur migration, elles ne sont plus capables de coloniser la partie distale du tube digestif, qui n'est plus « permmissible » à leur colonisation <sup>97</sup>. Ceci, tout comme les phénomènes liés aux interactions avec la MEC décrits précédemment, soulignent l'importance de la coordination chronologique du développement des différentes parties de l'intestin et met donc en avant l'interdépendance de leurs développements respectifs.

Le bon développement du SNE dépend également de la prolifération suffisante des ENCC pour fournir un nombre suffisant de cellules du SNE. En effet, si une densité trop peu importante empêche la migration complète des ENCC, elle n'est pas corrélée à la densité finale des cellules du SNE. Les ENCC prolifèrent jusqu'à atteindre le niveau de capacité maximal du tissu intestinal <sup>128</sup>. Cette prolifération est dépendante de la signalisation par RET-GDNF <sup>129</sup>.

Les cellules qui se différencient en neurones et en cellules gliales entériques ne sont pas celles sur le front de migration, qui continuent de proliférer et de coloniser les parties aganglionnaires de l'intestin. Les cellules derrière le front de migration peuvent cependant continuer de proliférer pendant 24H (chez la souris) <sup>130</sup> - pour combler les espaces aganglionnaires restant dans les parties de l'intestin derrière le front de migration et ainsi assurer une distribution uniforme des ENCC.

Les ENCC sont des cellules multipotentes capables de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires. Les détails de cette multipotence restent cependant peu compris : à quel moment de leur migration, et par quels mécanismes le devenir des ENCC est-il déterminé ? Des expériences réalisées dans le modèle hybride caille-poulet ont montré que les NCC troncales pré-migratoires greffées au niveau vagal sont capables de migrer et coloniser le tube digestif pour former le SNE <sup>131</sup>, soulignant une certaine plasticité. D'autres études soulignent cependant une certaine prédisposition des NCC pour leur devenir. Dans une publication de 2019, Ling et al. montrent que chez le poulet, les cellules de la crête neurale vagale sont séparables en trois groupes selon leur profil transcriptionnel (neural (différenciation précoce en neurones), neurogénique (différenciation en neurones ou cellules gliales) ou mésenchymateux) avec des prédestinations existant avant même le début de leur migration <sup>132</sup>.

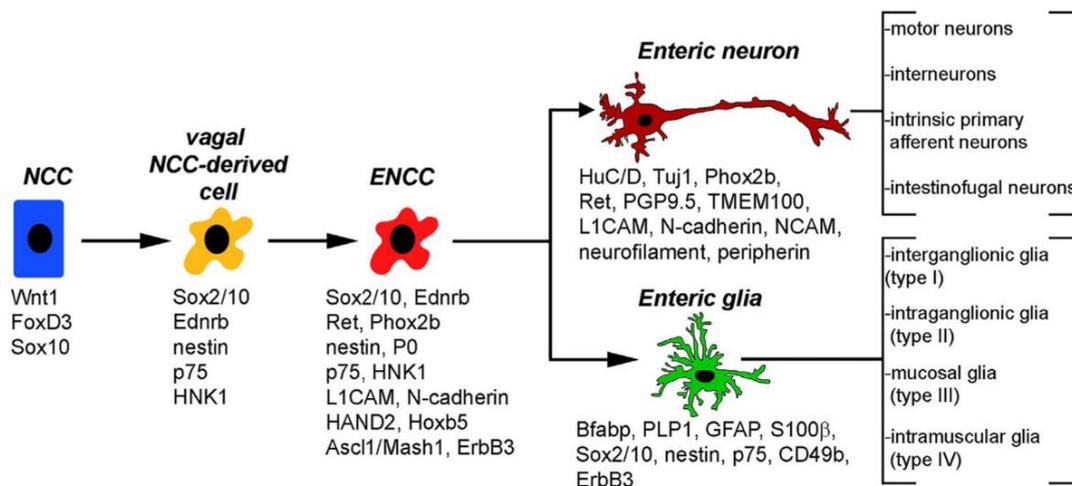
## MISE EN PLACE ET DÉVELOPPEMENT FONCTIONNEL DU SNE

Mise en place structurelle

La mise en place des deux plexus se fait -comme la plupart des autres formations dont nous avons parlé précédemment- dans un mouvement rostro-caudal. Juste après leur arrivée et leur colonisation des différentes régions de l'intestin, les ENCC sont initialement éparpillées dans les couches supérieures du mésenchyme. Ces cellules vont d'abord former le plexus myentérique, puis une vague de migration de ce plexus a lieu de manière centripète et à travers les muscles circulaires, pour former le plexus sous-muqueux. Chez l'homme, le plexus sous-muqueux est donc formé 2 à 3 semaines après le myentérique (8<sup>ème</sup> semaine à 14<sup>ème</sup> semaine) <sup>34</sup>. La migration vers le plexus sous-muqueux est dépendante de la signalisation RET-GDNF <sup>133</sup>, mais également de nétrines <sup>134</sup>.

L'organisation du SNE en ganglions s'effectue pendant la différenciation en neurones et glie entérique. Dans le plexus myentérique chez la souris, les neurones s'organisent en ganglions interconnectés entre E13.5 et E17.5 <sup>79</sup>.

Différenciation



**Figure 20 : Schéma des étapes différenciation des cellules de la crête neurale en neurones et cellules gliales entériques**

(D'après Goldstein 2017) NCC : Neural Crest Cell (cellule de la crête neurale), ENCC : Enteric Neural Crest Cell (cellule de la crête neurale entérique)

La différenciation des cellules de la crête neurale entérique en neurones et cellules gliales entériques se produit, encore une fois, dans un mouvement rostro-caudal. La différenciation des neurones se produit avant la différenciation gliale. Ces neurones (immatures - car ils n'ont pas encore de sous-type défini) sont marqués par une baisse de l'expression de SOX10 et P75 (mais pas de RET et PHOX2B) et une augmentation de l'expression de marqueurs pan-neuronaux, tels que PGP9.5, neurofilament, βTUBIII, HuC et HuD <sup>97</sup> (figure 20). La vague de différenciation neuronale commence tôt après la colonisation par les ENCC. Chez la souris, une sous-population des ENCC expriment des marqueurs pan-neuronaux dès E10.5, peu après leur entrée dans l'intestin <sup>111</sup>. Chez l'embryon de poulet, la présence du marqueur neuronal βtubIII apparaît un jour post-front de migration <sup>96</sup>. Les neurones entériques commencent à exprimer des marqueurs axonaux entre E11.5 et E13.5 chez la souris <sup>79</sup>.

La différenciation en sous-types neuronaux est un processus plus tardif. Chez la souris, la plupart des neurones entériques sont immatures à la naissance et les marqueurs de sous-types neuronaux n'apparaissent que quelques jours plus tard (certains neurones peuvent cependant exprimer les marqueurs de plusieurs sous-types à la fois) <sup>97</sup>. Ce phénomène est hétérogène et asynchrone entre les différents sous-types. Avant la naissance, on peut trouver des neurones TH+ transitoires entre E10 et E12.5, qui sont les progéniteurs de neurones NOS+ <sup>100</sup>. Des neurones exprimant les neurotransmetteurs NOS, calbindin et sérotonine peuvent être détectés entre E11.5 et E12.5 chez la souris. Des cellules positives pour l'acétylcholine (cholinergiques) sont présentes dès E10.5 <sup>135</sup>. Le transport vésiculaire d'acétylcholine n'est cependant détecté qu'à partir de E18.5. Des études ont montré que l'abondance relative des différents sous-types neuronaux est dépendante des voies GDNF et BMP, qui contrôlent la prolifération des progéniteurs neuronaux <sup>97</sup>.

Le développement des neurites (axones et dendrites) chez les neurones entériques est moins bien connu. Young et al. ont montré qu'entre E11.5 et E16.5 chez la souris, la plupart des neurones entériques possèdent un long neurite et plusieurs plus courts, suggérant que la polarité neuronale est établie tôt dans le développement <sup>100</sup>.

Le guidage axonal est également un phénomène important pour la mise en place des réseaux nerveux entériques. La projection axonale peut-être orale, caudale, circonférentielle ou locale ; et celle-ci dépend de la classe à laquelle appartient le neurone. Les premières projections peuvent être détectées entre E11.5 et E12.5, et les projections orales apparaissent plus tard. Ces projections apparaissent sur les premiers neurones qui se différencient (TH-NOS) et sont corrélées au sens de migration des ENCC <sup>100</sup>.

En ce qui concerne la différenciation gliale, celle-ci commence à E11.5 chez la souris. Elle est marquée par une baisse d'expression de RET, mais un maintien de SOX10 et P75, qui est concomitante à une hausse de l'expression de B-FABP <sup>97</sup>. Les marqueurs matures apparaissent ensuite, avec S100B à E14.5 puis GFAP à E16.5 <sup>33</sup>.

### *Développement des fonctions motrices*

Si le SNE contrôle bien la motricité dans le tube digestif adulte, cela ne semble pas être aussi simple aux stades embryonnaires. Roberts et al. ont par exemple montré que chez la souris, les premières contractions péristaltiques, qui apparaissent à E13.5, ne sont pas contrôlées par le SNE (ni, d'ailleurs, par les cellules de Cajal). A ce stade, ces contractions sont immatures : elles vont dans les deux directions du tube (pas uniquement vers la partie anale), et au cours du développement vont gagner en intensité et en fréquence et perdre en vitesse de propagation. L'étude montre que ces contractions primitives sont d'origine myogénique. Dans cette étude, les premiers mouvements musculaires médiés par le SNE sont détectés à E18.5 dans le duodénum <sup>83</sup>. Des résultats similaires ont été trouvés chez le poisson-zèbre <sup>136</sup> et le poulet <sup>137</sup>. Cette dernière étude montre de plus que l'apparition d'onde contractile à E6 chez le poulet est corrélée à la formation d'un anneau ininterrompu de cellules musculaires autour du tube digestif.

Les neurones entériques présentent cependant déjà une activité électrique avant la connexion neuro-musculaire. Une étude réalisée par Hao et al. en 2011 a montré des pics de calcium spontanés dans des neurones entériques à E11.5, et des potentiels d'actions spontanés à E12.5 <sup>138</sup>. Les plus jeunes communications entre neurones entériques connues ont

été détectées à E14.5, par le biais de transmission synaptique excitatrice via les récepteurs nicotiques <sup>139</sup>.

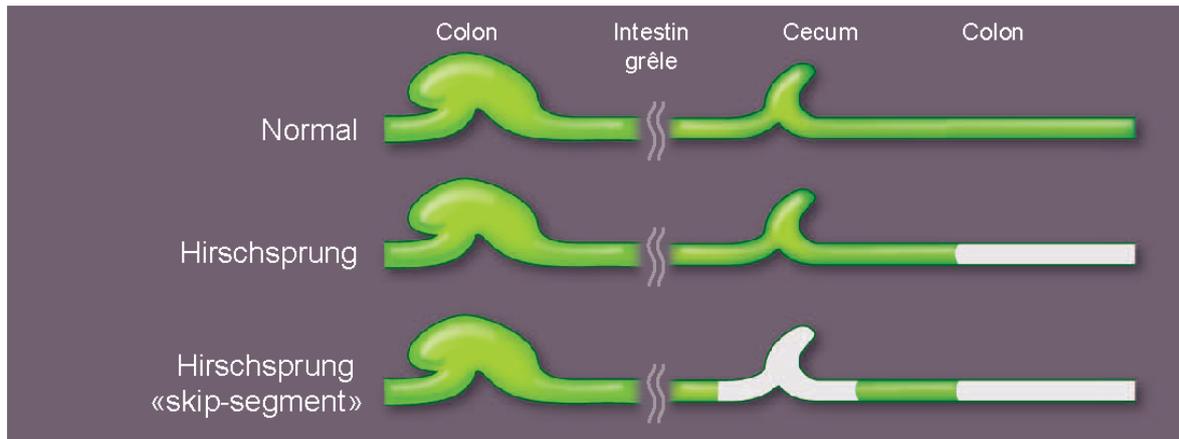
L'innervation des couches musculaires semble n'être fonctionnelle qu'à P6 chez la souris (dans le côlon), âge à partir duquel les CMM ne sont pas encore présents spontanément mais peuvent être déclenchés pharmacologiquement. Ces derniers apparaissent à P10, et sont liés à une augmentation de densité des fibres excitatrices <sup>140</sup>. La chronologie de l'établissement des connexions individuelles entre neurones et cellules musculaires n'est pas connue, cependant des potentiels de jonction excitateurs peuvent être déclenchés expérimentalement dans le muscle circulaire à partir de E17.5 <sup>33</sup>. Avant cela, des neurites projetant vers les muscles circulaires sont détectables à E14.5 <sup>141</sup>. Les projections vers la muqueuse peuvent, elles, être détectées chez la souris à partir de E16.5 <sup>114</sup>.

#### **D. Pathologies de développement du SNE**

Il existe chez l'Homme plusieurs pathologies qui touchent le développement du SNE, la plus connue étant la maladie de Hirschsprung (HSCR). Celle-ci touche environ 1 naissance sur 5000, préférentiellement les garçons (ratio 4:1) <sup>142</sup>. Cette maladie se présente à la naissance par une occlusion intestinale partielle ou totale, qui est due à l'absence de SNE à l'extrémité caudale du tube digestif. La partie du tube touchée peut être plus ou moins longue (elle comprend généralement le colon sigmoïde et le rectum, mais peut remonter jusqu'à l'iléon), résultant en une partie basse du tractus digestif incapable d'effectuer le péristaltisme. HSCR est une neurocristopathie : une pathologie touchant la crête neurale. L'absence de système nerveux entérique est en effet due à un défaut de migration, prolifération et/ou différenciation de la crête neurale entérique en cellules du SNE.

La maladie de Hirschsprung est une maladie aux causes génétiques hétérogènes à la pénétrance faible. La maladie est généralement sporadique et peut se présenter dans le contexte de plus de 10 syndromes génétiques tels que la trisomie 21, le syndrome de Waardenburg ou encore Mowat-Wilson <sup>143</sup>. En ce qui concerne l'augmentation d'incidence de HSCR chez les patients atteints de trisomie 21, un mécanisme lié à la production de MEC dans le mésenchyme digestif a été proposé comme explication. En effet les gènes codant pour le collagène de type VI (COL6A1 et COL6A2), qui ralentit la migration des ENCC, se trouvent sur le chromosome 21, et sont donc plus exprimés chez les patients atteints de trisomie <sup>121</sup>.

Les mutations les plus fréquemment associées à HSCR se situent sur le gène RET. En effet des mutations RET ont été identifiées dans 50% des formes familiales d'Hirschsprung et 20% des formes sporadiques. Ces mutations causent généralement la pathologie par haploinsuffisance. D'autres mutations fréquentes atteignent les gènes GDNF, NTN, SOX10, EDNRB ou encore EDN3 <sup>143</sup>.



**Figure 21 : Présentation de la maladie de Hirschsprung « classique » et « skip-segment »**

(D'après Takahashi 2013) La partie verte représente la partie qui a été colonisée par les ENCC, et la partie blanche la partie aganglionnaire du tube.

Il semble également que des facteurs environnementaux peuvent contribuer à la pénétrance et la sévérité de la pathologie. Des études menées chez la souris ont montré que l'acide rétinoïque (dont le précurseur est la vitamine A) est nécessaire à la migration des ENCC et que les souris hétérozygotes *Ret-/+* ont une incidence augmentée pour la maladie de Hirschsprung quand elles se développent en condition de déficience pour la vitamine A <sup>144</sup>. Chez le poisson-zèbre, il a de même été démontré que l'acide rétinoïque est promoteur de la migration des ENCC <sup>145</sup>.

Certains patients peuvent également avoir une forme « skip-segment » dans laquelle il existe deux segments aganglionnaires séparés résultant des crêtes neurales dites « trans-mésentériques » <sup>104</sup> comme décrit précédemment (figure 21).

### III. LE DÉVELOPPEMENT DES ORGANES EST UN CO-DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTS TISSUS EMBRYONNAIRES

Il existe dans le développement embryonnaire plusieurs phénomènes d'induction qui sont reconnus comme essentiels au développement. Dans le cadre du développement du tube digestif, les interactions les plus connues sont celles qui ont lieu entre le mésoderme splanchnique et l'endoderme digestif. Celles-ci sont étudiées depuis les années 60, notamment grâce aux études de recombinaisons entre épithélium et mésenchyme d'organes différents chez le poulet, établies par Nicole Le Douarin <sup>146</sup>, et leur investigation continue de nos jours.

#### A. Interactions mésoderme-endoderme

##### RÉGIONALISATION

Les interactions entre feuillets embryonnaires liés à la régionalisation de l'endoderme commencent dès la gastrulation. Comme décrit précédemment, l'axe antérieur-postérieur dans le tube digestif est initié lors de la gastrulation, et celui-ci est induit par la production de facteurs de croissance (WNT, BMP et FGF) produits par le mésoderme.

Les interactions entre mésoderme et endoderme viscéral sont particulièrement dépendantes de la signalisation HH et BMP, une voie de signalisation qui est également hautement conservée entre les espèces <sup>82</sup>. Ces interactions commencent dès leur induction. En effet, chez les vertébrés, la formation du mésoderme viscéral nécessite la production de Hh par l'endoderme, ce qui active la production de Bmp4, puis de Foxf1, ce qui permet l'inhibition de Iro, dont le rôle est de spécifier le programme transcriptionnel du mésoderme somatique <sup>82</sup> (figure 22.A.).

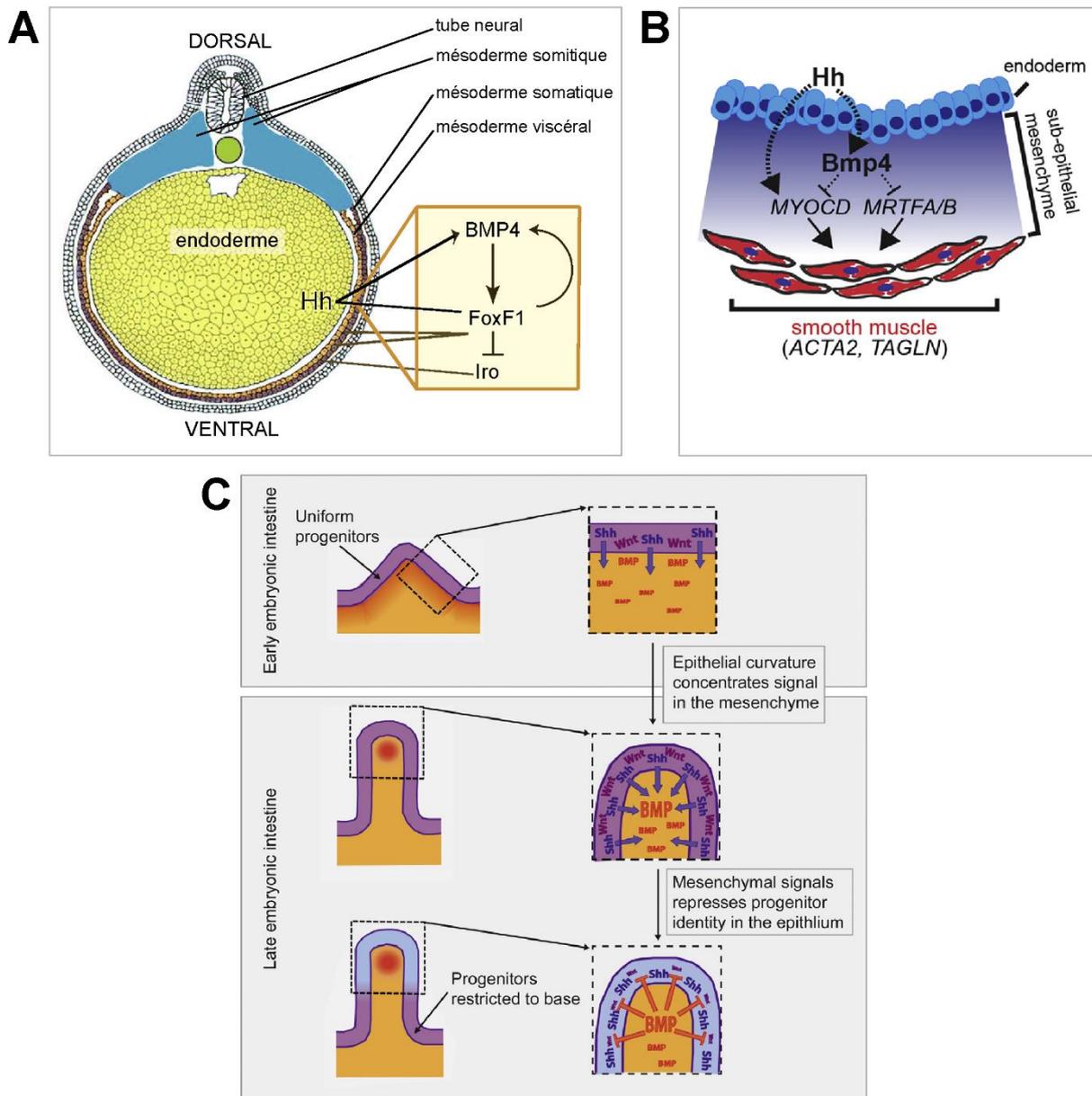
Par la suite, la signalisation provenant du mésoderme continue d'être impliquée dans la régionalisation du tube digestif. Des expériences de recombinaison épithélium-mésenchyme ont pu montrer que l'expression des homéobox dans l'intestin (Cdx) et dans l'estomac (Sox2) peut être modifiée jusqu'à E4 chez le poulet par recombinaison entre épithélium et mésenchyme de ces régions du tube digestif <sup>147,148</sup>.

Dans l'estomac, la régulation de la voie Wnt par le gène homéobox Barx1 exprimé dans le mésenchyme est essentiel à la morphogénèse de l'épithélium gastrique chez la souris <sup>149</sup>. De même, l'expression de Sox9 dans le mésenchyme gastrique permet la formation du pylore <sup>150</sup>. L'identité de l'intestin postérieur est régulée par l'expression de FGF4 par le mésenchyme <sup>151</sup>, ainsi que des ligands de la voie BMP <sup>152</sup>.

##### ORGANISATION STRUCTURALE

Les interactions entre tissus - notamment les interactions réciproques entre le mésoderme et l'endoderme - peuvent modifier le devenir cellulaire de leurs cibles, mais elles peuvent également avoir un effet important sur la structure du tissu. Par exemple, la perte d'expression de Ihh et Shh dans l'endoderme chez la souris a pour cause d'empêcher

l'expansion du mésoderme <sup>153</sup>. Dans le sens inverse, FGF9 et WNT5A produits par le mésenchyme sont par exemple impliqués dans l'élongation de l'intestin <sup>154,155</sup>.



**Figure 22 : Les interactions entre mésoderme et endoderme dans la formation structurale du tube digestif sont particulièrement liées aux voies de signalisation Hh et BMP**

**A.** Patterning du mésoderme viscéral par l'endoderme (d'après McLin 2009) chez le Xénope (conservé chez la souris)  
**B.** Formation des muscles circulaires et du mésenchyme sous-épithélial (d'après Huycke 2019) **C.** Formation des villosités et cryptes intestinales (D'après Shyer 2015)

Chez le poulet, il a été montré que la production de Hh par l'endoderme inhibe l'expression de gènes musculaires et donc empêche la formation de muscle lisse dans le mésoderme qui lui est directement adjacent : ce qui recule la position du muscle et permet ainsi de former la lamina propria et la sous-muqueuse <sup>74,156</sup>. Ce mécanisme est aussi médié par l'activation de la production de Bmp4 par les ligands Hh (Shh et Ihh), qui inhibe la différenciation du muscle lisse

<sup>157</sup> (figure 22.B.). Cette même voie de signalisation est impliquée dans la formation des villosités chez la souris (comme décrit précédemment). La signalisation Hh induit l'agrégation de mésenchyme sous les zones qui deviendront les villosités, par le biais de la signalisation Bmp <sup>56</sup>. L'expression de Bmp4 induite par Hh, qui est désormais plus concentrée dans les villosités, restreint alors la localisation des CSI à la base de la villosité <sup>60</sup>, ce qui permet la formation des cryptes (figure 22.C.). Chez la souris, Walton et al. <sup>56</sup> proposent dans une étude de 2016 que l'initiation de l'expression localisée de la voie de signalisation Hh/Bmp est due à la formation de motifs produits par un système de réaction-diffusion (théorisé par Alan Turing <sup>158</sup>) créé par des morphogènes de la voie Bmp. Ce modèle peut être résumé selon l'existence de deux morphogènes (par exemple, un inhibiteur et un activateur) tous deux produits dans le même groupe de cellules ; mais dont l'inhibiteur diffuse plus loin que l'activateur (ou vice-versa), ce qui crée des perturbations dans la distribution spatiale des deux morphogènes et initie la formation de motifs réguliers, qui s'amplifient progressivement par la suite <sup>56</sup>.

Dans la formation des villosités chez le poulet, un système similaire existe, mais contrairement à chez les mammifères, celui-ci est initié par des forces de tractions créées par le développement des muscles viscéraux, qui déclenchent des déformations régulières de l'épithélium, et concentrent ainsi la production de Hh au niveau de ces déformations <sup>54</sup>. La différence de mécanisme dans l'induction initiale des villosités est potentiellement expliquée par des différences de rigidité entre l'épithélium et le mésenchyme entre les deux espèces (l'endoderme étant 10 fois plus rigide que le mésenchyme chez le poulet à ce stade de développement, contre 1.5 fois chez la souris <sup>54</sup>).

### INTERACTIONS MÉCANIQUES

Les différents tissus embryonnaires sont donc également capables d'influencer leur développement respectif par action mécanique, comme dans la formation des villosités chez le poulet ou l'orientation des muscles comme décrit précédemment. D'autres mécanismes de ce type qui impliquent le muscle lisse existent. Il a notamment été démontré que les contractions des couches musculaires participent à l'élongation du tube digestif <sup>159</sup>.

D'autre part, les boucles de l'intestin sont formées par une différence dans la vitesse de croissance entre l'intestin et le mésentère qui lui est attaché <sup>160</sup>. Les forces mécaniques médiées par les mésentères permettent également d'établir l'axe gauche/droit dans l'organisation de l'intestin grâce en initiant son asymétrie.

### INTERACTIONS INTER-ORGANES

Le développement de l'intestin est également influencé par celui des autres organes de l'embryon. Il est notamment connu que chez plusieurs espèces, dont le poulet et la souris, après le repliement de l'endoderme, la région antérieure ventrale de l'intestin primitif se trouve adjacente au mésoderme cardiogénique. Celui-ci produit des facteurs des familles Bmp et Fgf, qui induisent l'expression de Shh chez l'endoderme et ainsi déclenche le développement de l'ébauche hépatique, tout en réprimant le développement de la lignée pancréatique à cet endroit <sup>161,162</sup>. De même, l'endoderme dorsal est en contact avec la notochorde, une interaction qui est nécessaire au développement dorsal du pancréas <sup>163</sup>. En effet la

notochorde réprime l'expression de Shh dans la partie du pancréas dorsal en produisant du Fgf2 et de l'Activine B <sup>164</sup>.

### B. Co-développement avec la crête neurale

Le développement précoce du tube digestif peut alors être vu comme une suite d'inductions réciproques entre endoderme et mésoderme pour permettre l'établissement de l'identité régionale des différents organes de l'intestin. L'arrivée des cellules des ENCC lors de leur colonisation du tube digestif doit donc être vue elle aussi comme une source d'interactions jouant un rôle dans le développement de l'intestin. Comme nous avons pu le voir auparavant, les interactions mésenchyme-SNE ont été amplement étudiées dans le contexte de la migration des ENCC. L'autre pendant de cette relation - l'influence des ENCC sur le développement du mésenchyme, est moins connue, mais quelques études, dont nous allons maintenant décrire les résultats, s'y sont intéressées.

### MUSCLES ET SNE

Une autre partie de la crête neurale est connue pour ses interactions avec les tissus musculaires. La crête neurale crâniale participe amplement à la formation de la tête. Les cellules de la crête neurale crâniale (cNCC) forment de nombreux tissus crâniens, dont cartilage, os, odontoblastes, une partie du SNP crânial et cellules pigmentaires. Une étude publiée en 2007 a pu montrer que, si les cNCC ne sont pas nécessaires à l'induction de la myogenèse dans les cellules du mésoderme, celles-ci influencent leur migration et leur différenciation plus tardive <sup>165</sup>. Les cNCC ont donc également un rôle d'organisateur dans la formation des muscles squelettiques faciaux (qui sont dérivés du mésoderme). Il a également été montré chez le poulet que les cellules de la crête neurale troncale permettent la différenciation de progéniteurs de cellules musculaires squelettiques par activation de la voie Notch au niveau des somites <sup>166</sup>.

Dans le tractus digestif, si des interactions entre le développement du muscle lisse et du SNE semblent exister, celles-ci sont visiblement dépendantes de la région du tube étudiée. Les développements respectifs des couches musculaires et des plexus nerveux se produisent toutes deux par propagation crânio-caudale ; à des vitesses cependant différentes. En effet il a été montré que les cellules musculaires lisses ( $\alpha$ 5 $\alpha$ 2+) et les neurones entériques (B-tubIII+) apparaissent en même temps dans le jéjunum et le caecum chez le poulet, mais que le muscle circulaire est présent avant l'apparition des neurones dans la partie postérieure de l'intestin <sup>98,137,167</sup>.

Dans l'estomac, une étude de Faure et al., réalisée chez le poulet, a montré que l'ablation des vNCC avant leur migration cause un défaut de différenciation des cellules musculaires lisses <sup>168</sup>.

Dans l'intestin à l'inverse, il a été montré que le muscle viscéral lisse se développe en l'absence de SNE <sup>169</sup>. Cependant, chez les patients HSCR – une pathologie où le SNE est absent justement dans la partie postérieure du tube digestif – il a été relevé que les couches musculaires peuvent

être hypertrophiées dans les zones aganglionnaires <sup>33</sup>, et chez les souris Lethal Spotted Mutant, un modèle de HSCR <sup>170</sup>.

De manière intéressante, une étude chez le poulet a montré que l'inhibition pharmacologique du développement musculaire dans l'intestin et le côlon perturbe la mise en place du SNE, en empêchant la formation des plexus <sup>169</sup>. Il a également été démontré chez le poulet et la souris que ces forces contractiles, créées par les couches musculaires, affectent le développement du SNE. Les contractions du muscle influencent le développement structural du SNE en lui conférant sa forme anisotrope (c'est-à-dire, dépendant d'une direction, ici : la direction longitudinale du tube digestif) <sup>171</sup>. Une étude des mêmes auteurs a de plus montré que chez la souris, la mise en place du réseau ganglionnaire est également dépendant d'interactions avec la MEC produite par les couches musculaire (via l'intégrine B1 utilisée par les ENCC pour interagir avec la MEC) <sup>172</sup>.

De même, les cellules de Cajal sont capables de se développer et de produire des ondes lentes en l'absence de SNE dans l'estomac et le petit intestin <sup>173</sup>, indiquant que leur développement est indépendant de celui du SNE.

### VASCULARISATION ET SNE

Au cours du développement embryonnaire, les cellules endothéliales sont capables de produire des facteurs favorisant la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des neurones à la fois dans le SNC et le SNP <sup>174</sup>. De même, il a été montré que les neurones et leurs progéniteurs peuvent produire du VEGF <sup>175</sup>, un facteur de croissance qui favorise le développement de nouveaux vaisseaux sanguins.

Le co-développement des systèmes nerveux et vasculaire dans l'intestin est sujet de controverse. Une étude de 2009 chez le poulet a montré que l'inhibition du développement des EC empêche la migration des ENCC <sup>176</sup>. Certains travaux ont montré une corrélation dans la formation des réseaux nerveux et vasculaires chez des embryons de souris <sup>177</sup>, et d'autres, leur non-corrélation au cours du développement embryonnaire du poulet et de la caille <sup>178</sup>. Une de ces études a montré des interactions entre cellules de SNE et cellules vasculaires issues de mésentère. La co-culture de ces deux types de cellules résultait en une augmentation de la prolifération et différenciation des cellules du SNE, ainsi que de la migration des cellules vasculaires vers les progéniteurs du SNE. Finalement, l'étude montre une altération de la densité vasculaire dans le côlon de souris *Ret<sup>-/-</sup>*, mais une augmentation de cette même densité chez des patients Hirschsprung <sup>177</sup>. D'autre part et cependant, une autre étude réalisée en 2013 montre au contraire un développement normal du système vasculaire digestif chez des embryons de souris dépourvus de SNE, et vice-versa <sup>178</sup>. Une explication possible à ces disparités peut se trouver dans l'analyse de stades développementaux différents, la première étude analysant des souris après leur naissance, et la deuxième des embryons à E11.5.

## IV. ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT (ET CO-DÉVELOPPEMENT) *IN VITRO*

### A. Ingénierie des cellules souches

L'étude de la période embryonnaire est traditionnellement réalisée sur des modèles animaux, pour des raisons éthiques et pratiques. Ces modèles sont indispensables car plus proches du vivo que les cellules humaines en culture issues de cellules tumorales immortalisées ou de cultures primaires, qui sont très limitées en termes de structure et de longévité. Cependant, ces modèles possèdent l'inconvénient évident d'être sujets à des mécanismes espèces-spécifiques, en plus d'être parfois coûteux ou difficiles à étudier *in utero*, pour les mammifères. Dans le cas du développement du tube digestif, on peut noter que le développement humain suit une chronologie relativement différente des modèles animaux typiquement utilisés. Chez l'humain le tube digestif est mature relativement tôt, et ressemble à sa morphologie adulte dès 22 semaines de gestation, en contraste avec les modèles - notamment la souris et le rat - dont le développement digestif n'atteint un stade similaire que bien après la naissance <sup>179</sup>.

Dans le cadre du co-développement du SNE et du reste du tube digestif, ces différences inter-espèces peuvent être exemplifiées par les contributions au développement du SNE des populations de la crête neurale sacrée et trans-mésentérique. Ces différences inter-espèces se retrouvent également dans les mécanismes dépendants d'interactions entre les différents feuillettes, comme nous l'avons vu avec par exemple l'émergence des villosités.

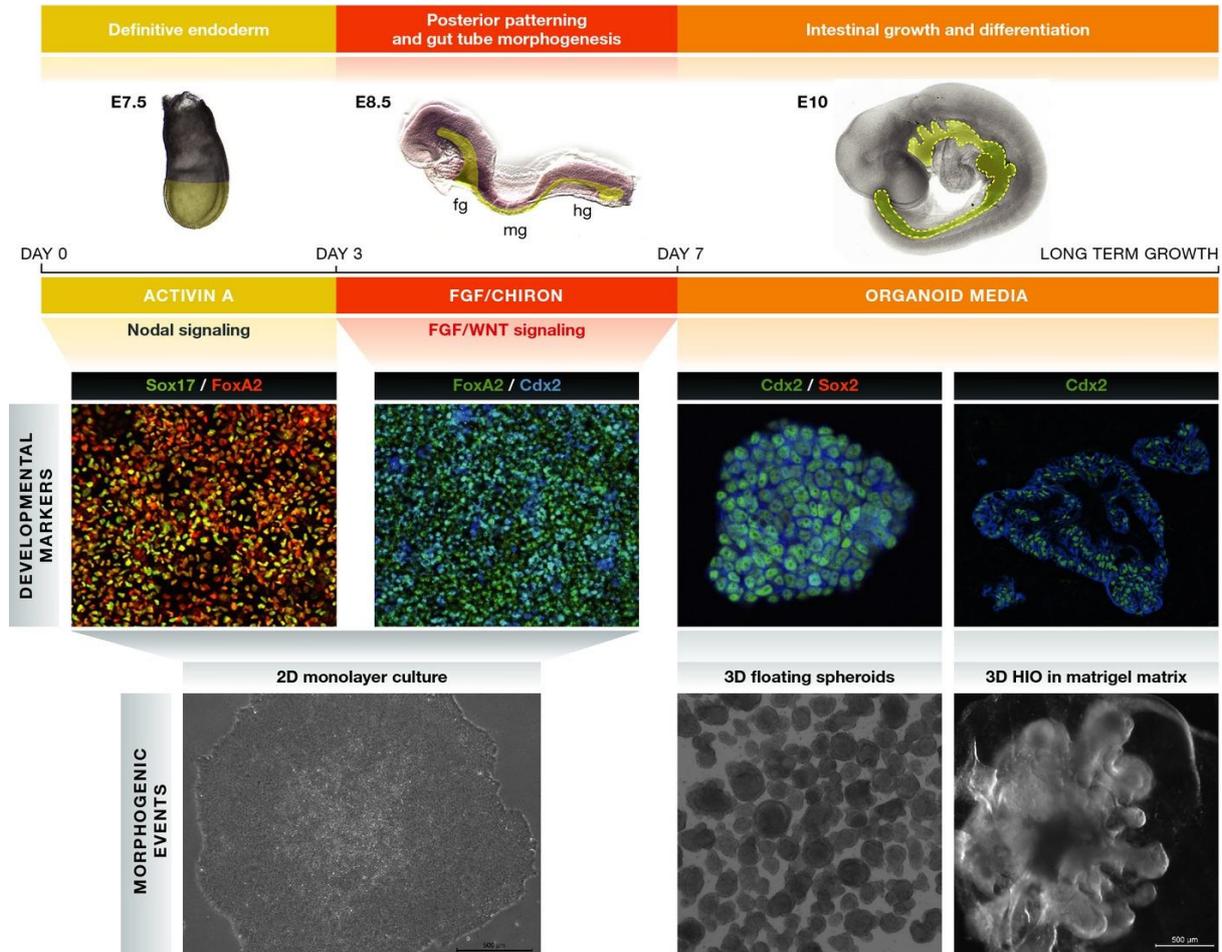
Plus récemment, l'avènement des techniques de l'ingénierie des cellules souches a permis d'avoir accès à du matériel humain *in vitro*. Ces techniques utilisent la culture des cellules souches pluripotentes humaines (hPSC), qui sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence : c'est-à-dire, capacité à se différencier en tout type de cellule (excepté celles des annexes embryonnaires). Les cellules pluripotentes sont ainsi capables de produire les types cellulaires et structures embryonnaires issues des trois feuillettes embryonnaires. Les lignées d'hPSC peuvent être d'origine embryonnaire, isolées à partir de blastocystes (cellules souches embryonnaires humaines - hESC) ou induites à partir de cellules somatiques (cellules pluripotentes induites - iPSC). Les premières cellules souches embryonnaires (ESC), issues de blastocystes souris, sont cultivées *in vitro* par GR Martin en 1981 <sup>10</sup>; puis en 1998 les premières cellules souches embryonnaires humaines (hESC) par Jamie Thomson <sup>11</sup>. Les iPSC sont produites par reprogrammation cellulaire, inventée par Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi en 2006 <sup>180</sup>.

Les hPSC peuvent donc être différenciées en le type cellulaire ou tissu d'intérêt au cours de protocoles de différenciation dirigée, des processus qui impliquent principalement la culture par étape successive avec des facteurs de différenciation spécifiques. Les modèles issus de l'ingénierie des cellules souches permettent donc, en plus d'être des modèles du développement embryonnaire humain, d'utiliser des cellules humaines provenant de patients avec un phénotype d'intérêt, ou encore des cellules modifiées génétiquement.

En plus de la production de cellules de types cellulaires d'intérêt, la différenciation dirigée d'hPSC permet également la formation *in vitro* de structures désignées sous le nom d'« organoïdes ». Un organoïde est défini comme une structure cellulaire tri-dimensionnelle produite *in vitro* et capable d'auto-organisation en structure biologique <sup>15</sup>. Les organoïdes sont notamment d'intérêt en biologie du développement puisqu'ils permettent, d'une part, l'accès

à du matériel biologique humain, mais de plus car ils permettent d'observer les phénomènes de différenciation et de morphogénèse inaccessibles autrement.

### B. Développement du tube digestif *in vitro*



**Figure 23 : Morphogénèse du tube digestif, *in vivo* et *in vitro***

(D'après Sinagoga et Wells 2015) Mise en parallèle des grands événements inductifs de la formation du tube digestif chez la souris et dans le modèle HIO. Sox17, Foxa2 : marqueurs de l'endoderme définitif. Cdx2 : marqueur de l'intestin postérieur. Sox2 : marqueur de l'intestin antérieur.

Le protocole de différenciation d'organoïdes de l'intestin (appelés HIO – Human Intestinal Organoids) a été mis en place en 2011 par Spence et al. <sup>16</sup>. Celui-ci repose sur la formation d'endoderme définitif par l'exposition d'hPSC à de l'Activine A pendant 3 jours (figure 23), un mimétique de Nodal appartenant à la superfamille du Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), d'après un protocole de D'Amour et al. <sup>181</sup>. *In vivo* chez les vertébrés, Nodal se fixe à un complexe de récepteurs composé de Alk4 ou 7 et ActRIIA ou B) ainsi que corécepteur Cripto. L'activation de ce complexe à une activité sérine-thréonine kinase qui permet la phosphorylation d'un complexe Smad2/3/4, qui va se relocaliser dans le noyau pour activer le programme transcriptionnel endodermique qui contient des facteurs de transcriptions dont Sox17, Foxa2, Mix, Gata4/6 et Eomes <sup>152</sup>. L'Activine A est utilisée plutôt que Nodal lui-même car

son utilisation ne nécessite pas le co-activateur Cripto, et produit une induction de l'endoderme plus efficace <sup>152</sup>.

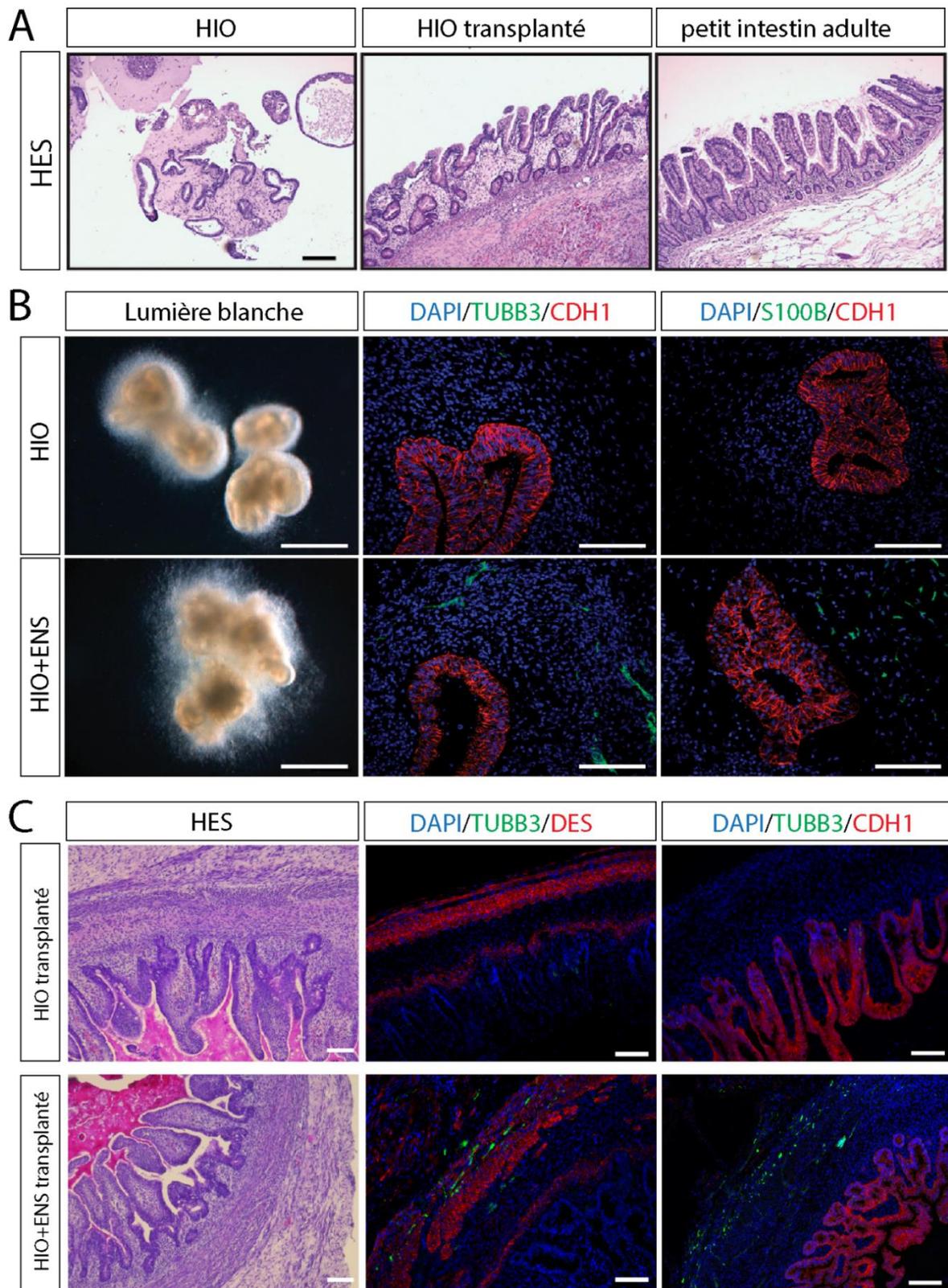
L'endoderme définitif produit est ensuite régionalisé en tissu intestinal par activation des WNT et FGF pendant 4 jours pour produire des sphéroïdes intestinaux (figure 23). La voie WNT est activée par ajout de CHIR99021. CHIR est un inhibiteur de la GSK3, une kinase qui a pour rôle de phosphoryler la B-caténine (un facteur de transcription effecteur de la voie de signalisation Wnt), ce qui déclenche sa dégradation. CHIR permet donc la stabilisation de la B-caténine et ainsi l'activation de la voie WNT. La voie FGF est activée par ajout de FGF4. La combinaison de l'activation des voies WNT et FGF permet la postériorisation de l'endoderme définitif en induisant l'expression de CDX2 <sup>152</sup>, qui est un régulateur central de la différenciation de l'intestin.

Les sphéroïdes intestinaux sont par la suite cultivés pendant 28 jours en Matrigel, un gel à la composition similaire à une membrane basale qui est issue de sarcome de souris EHS (Engelbreth-Holm-Swarm). Le matrigel est riche en protéines de la MEC, dont de la laminine, du collagène IV et des protéoglycans. Le tissu intestinal produit est CDX2+ (intestinal), et son identité est un mélange de jéjunum (GATA4+) et iléon (GATA6+) <sup>16</sup>. Il est également possible de produire des tissus d'intestin antérieur (œsophage, estomac) ou postérieur (côlon) par modulation des facteurs de différenciation après l'induction d'endoderme définitif <sup>182</sup>.

Ces organoïdes 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, cellules de Goblet, et cellules entéroendocrines. Cet épithélium présente des protrusions qualifiées de « villus-like » mais pas de villosités et cryptes à proprement parler <sup>183</sup>. Ces structures ne sont pas de « vrais » villosités car elles ne possèdent pas l'architecture pericryptale/intervilli nécessaire au bon fonctionnement des villosités, mais elles possèdent cependant une restriction de la prolifération à la zone intervilli réminiscente de l'architecture *in vivo* <sup>183</sup>. Il manque de plus à l'épithélium des HIO quelques types cellulaires de sa contrepartie *in vivo*, telles que les cellules Tuft et cellules M. Cependant, les HIO possèdent plusieurs propriétés fonctionnelles intestinales : leur épithélium produit du mucus, et possèdent un système d'absorption dipeptides fonctionnel <sup>16</sup>.

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 différenciation. Elles sont issues de cellules du mésoderme qui sont générées lors de l'induction d'endoderme définitif en petit nombre. L'ajout de FGF4 a pour effet, en plus de la postériorisation de l'endoderme, la prolifération et donc l'expansion de mésenchyme <sup>152</sup>. Ces cellules du mésenchyme, comme nous l'avons défini précédemment, sont importantes pour le développement de l'endoderme intestinal. Leur présence nous permet de plus d'étudier également le développement des populations mésenchymateuse de l'intestin, ainsi que l'importance des interactions entre les composants endodermiques et mésodermiques dans le développement de l'intestin.

Les HIO représentent un tissu qui est similaire à un intestin foetal <sup>184</sup>. Transplantés chez des souris immunodéprimées (sous la capsule sous-rénale), ils se développent pour former un tissu intestinal similaire à celui de l'intestin grêle humain adulte <sup>183</sup> (figure 24.A.), grâce à la vascularisation apportée par la souris hôte. Ceci inclut la formation de villosités et de cryptes avec des CSI fonctionnelles, les couches musculaires (figure 24.C.), ainsi que la présence d'une activité contractile dépendante des CIC <sup>185</sup>.



**Figure 24 : Caractérisation des organoïdes intestinaux dérivés de cellules souches pluripotentes**

**A.** Coupes transversales de HIO, HIO transplantés et petit intestin adulte (coloration HES (Hématoxyline-Eosine Staining)) (D'après Finkbeiner 2015) **B.** HIO et HIO+ENS in vitro, marquages TUBB3 (neurones), S100B (Cellules gliales entériques) et CDH1 (épithélium). (D'après Workman 2017, barres d'échelle : 1 mm (1<sup>ère</sup> colonne), 100 µm (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> colonne) **C.** HIO et HIO+ENS transplantés, marquages TUBB3 (neurones), DES (cellules musculaires lisses) et CDH1 (épithélium) (d'après Workman 2017, barres d'échelle : 100 µm)

Des études utilisant le séquençage en cellules uniques (scRNAseq) visant à comparer des HIO avec leur contrepartie *in vivo* (e.g. des échantillons de tube digestif fœtaux humains) ont pu montrer que les HIO reproduisent fidèlement le tissu fœtal humain. La comparaison de ces deux jeux de données montre que 70% des cellules des HIO transplantés s'associent aux cellules fœtales de l'intestin <sup>186</sup>.

Les HIO contiennent donc les composants endodermiques et mésodermiques du tube digestif en développement, mais pas son principal composant ectodermique - le SNE. Celui-ci peut cependant y être ajouté en co-cultivant des sphéroïdes intestinaux avec des vNCC, produisant ainsi des HIO qui possèdent un SNE, appelés HIOENS <sup>185</sup>. Le protocole de production des HIOENS est détaillé dans le premier article de ce projet de thèse, intitulé « Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system » <sup>187</sup>. Le protocole utilisé pour la production de vNCC est un protocole initialement développé par Bajpai et al. <sup>188</sup>, qui produit des cellules de la crête neurale. Ce protocole produit tout d'abord des sphères neuroépithéliales en suspension, qui, déposées sur une plaque de culture coâtée avec de la fibronectine, y forment une rosette neurale, à partir de laquelle migrent des cellules de la crête neurale. Le protocole permet de produire des crêtes neurales vagues en exposant les sphères neuroépithéliales à de l'acide rétinoïque, ce qui les postérise <sup>185</sup>. Il existe d'autres protocoles permettant la production d'ENCC <sup>189</sup>.

Les vNCC sont ensuite co-cultivés avec les sphéroïdes intestinaux en Matrigel, et vont envahir leur mésenchyme, (qui exprime des molécules chimioattractrices pour les vNCC tels que GDNF et EDN3), pour s'y différencier en cellules du SNE <sup>185</sup>.

*In vitro*, les vNCC forment au sein du mésenchyme des HIO des neurones (TUBB3+) et cellules gliales (S100B+) (figure 24.B.). Ces neurones incluent plusieurs sous-types neuronaux : des cellules TH+, CALB+, CALB2+, CHAT+ (cholinergique) et 5-HT (sérotonine), ce qui indique la présence de neurones excitateurs et des interneurones. Une fois transplantés pour avancer leur maturation, les HIOENS développent de plus des neurones inhibiteurs nNOS+ <sup>185</sup>. Ceux-ci sont également capables de produire une réponse contractile en réponse à une stimulation électrique, dépendante de l'activité neuronale puisqu'elle peut être inhibée par de la tétrodontoxine (TTX). Le SNE dans les HIO+ENS transplantés est également capable d'induire la relaxation du muscle lisse par ajout de sodium nitroprusside.

---

# OBJECTIFS DE THÈSE

L'origine développementale des maladies chroniques, notamment intestinales, est reconnue comme un déclencheur pathologique majeur impliquant des interactions précoces au sein du microenvironnement cellulaire. Dans ce contexte, ces interactions cellulaires sont essentielles au développement et à l'établissement des fonctions digestives pendant les périodes néonatale et postnatale. À l'état d'équilibre, le microenvironnement intestinal est un acteur majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Le système nerveux entérique (SNE), qui contrôle entre autres les fonctions motrices de l'intestin, fait partie de ce microenvironnement. Celui-ci est originaire des cellules de la crête neurale vagues (vNCC), qui colonisent le tube digestif après sa formation mais pendant son développement (entre la 4<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme). Plusieurs maladies gastro-intestinales ont une origine neuropathique où le SNE est affecté, ce qui entraîne des comorbidités élevées. Touchant souvent les enfants après la naissance, ces neuropathies gastro-intestinales peuvent également affecter les adultes par suite d'une infection, une inflammation à médiation immunitaire ou une neurodégénérescence. Les interactions qui existent entre les progéniteurs du SNE et le mésenchyme intestinal qu'ils colonisent, et les molécules impliquées dans ces interactions, sont encore mal caractérisées. Il est donc indispensable de mieux comprendre le développement du microenvironnement cellulaire intestinal pendant la période néonatale et le rôle des facteurs environnementaux dans la modulation du développement du SNE et du mésenchyme intestinal.

Un frein à la compréhension de ces processus a été le manque d'accès aux tissus embryonnaires, particulièrement chez l'Homme. Cependant, grâce aux avancées techniques issues de l'ingénierie des cellules souches, il est maintenant possible d'étudier *in vitro* ces processus grâce aux modèles issus de la différenciation dirigée des hPSC. Le modèle HIO/HIO+ENS, que nous avons décrit dans l'introduction, nous permet donc de produire du tissu intestinal humain similaire au tissu fœtal, avec ou sans SNE, et ainsi d'étudier *in vitro* le co-développement avec dans le tissu intestinal. Les nouvelles technologies issues de la biologie moléculaire – notamment le séquençage en cellules uniques (scRNAseq) permettent de plus de nos jours d'étudier de manière non supervisée à la fois la complexité des populations cellulaires hétérogènes, et d'identifier les marqueurs et signaux cellulaires produits par ces populations. Nous avons donc pris avantage de ces nouvelles technologies – cellulaires et moléculaires - pour produire à la fois les organoïdes sans et avec SNE, et ainsi comparer l'évolution des populations mésenchymateuses dans ces organoïdes, notamment grâce au scRNAseq.

Les objectifs de ce projet de thèse ont été dans un premier temps de standardiser le protocole de production des HIO+ENS. Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour la comparaison d'HIO et HIO+ENS dans le but d'étudier la composition du mésenchyme des HIO et HIO+ENS. Nous avons enfin cherché à comprendre les mécanismes moléculaires qui dirigent les modifications du mésenchyme induites par les progéniteurs du SNE.

Le premier article présenté dans ce manuscrit de thèse présente le protocole de culture des HIO+ENS. Le deuxième article explore l'effet des progéniteurs du SNE sur le développement du mésenchyme intestinal. Dans cette étude, nous avons pu montrer grâce au modèle HIO/HIO+ENS que les progéniteurs du SNE induisent des différences dans la composition du

mésenchyme – particulièrement dans les populations musculaires et vasculaires. Par ailleurs, nous avons pu montrer que ces différences sont en partie liées à la signalisation BMP produite par les progéniteurs du SNE.

## **ARTICLE 1 : PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED INTESTINAL ORGANOIDS WITH AN ENTERIC NERVOUS SYSTEM**

Cet article présente en détail le protocole de différenciation dirigée et de culture cellulaire utilisé pour la production des HIO+ENS que nous utiliserons par la suite pour étudier le rôle du SNE dans le développement du mésenchyme intestinal. Comme vous pourrez le voir dans ce protocole, la nature modulable du modèle HIO nous permet d'incrémenter facilement l'ajout de cellules progénitrices du SNE aux HIO. Ceci nous permettra, dans la seconde étude présentée, de comparer le développement des HIO et HIO+ENS.

## Pluripotent Stem Cell Derived Intestinal Organoids With An Enteric Nervous System

Elise Loffet<sup>1</sup>, Lisa Brossard<sup>1</sup>, Maxime M. Mahe<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France.

<sup>2</sup>Department of Pediatric General and Thoracic Surgery, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA;

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio;

\*Corresponding author:

Maxime M. Mahe: [maxime.mahe@inserm.fr](mailto:maxime.mahe@inserm.fr)

Keywords: human pluripotent stem cell; intestine, enteric nervous system; vagal neural crest cell; organoid

**ABSTRACT**

The use of human pluripotent stem cells (hPSCs) and differentiation techniques offer new ways to generate specific tissue. It is now possible to differentiate hPSC into human intestinal organoids that include an enteric nervous system. Using step-wise differentiation processes, we generate innervated intestinal organoids that form three-dimensional structures bearing an epithelium, neurons and glial cells embedded in a supporting mesenchyme. Innervated organoids further develop to a complex structure with similar organization and cellular differentiation as the developing intestine. These tools open up new fields of application in the study of the development and pathophysiology of enteric neuropathies. Herein, we describe the generation of both human intestinal organoids and vagal neural crest cells from hPSC and their combination into an innervated organoid. We also discuss technical considerations for these experiments, and highlight advantages and limitations of the system.

## 1. INTRODUCTION

The digestive tract is a complex tubular organ responsible for digestive and absorptive function. In direct contact with the environment, it forms a selective barrier allowing the passage of nutrients and preventing the passage of pathogens. The digestive tract originates from two germinal layers: the endoderm and mesoderm, while ectoderm-derived cells that give rise to enteric neurons migrate into the intestinal tube after it has formed. Endoderm derived tissue will contribute to the epithelial lining of the gut. On the other hand, the mesoderm will form sublamina layers organized in successive tunics: the submucosal layer, the muscularis composed of longitudinal and circular smooth muscles and the serosa. This anatomical architecture ensures gastrointestinal function (Thompson et al., 2018). Although digestion and the propulsion of the food are possible because of the intestinal epithelium and the muscle, the gut motor behaviors are coordinated by an intrinsic neuronal network: the enteric nervous system (ENS).

Often called the “second brain,” the ENS is an integrated and autonomous nervous system that coordinates complex behaviors of the gut by controlling peristaltic movements and changing blood flow and secretion of water, electrolytes and hormones (Heanue & Pachnis, 2007). The developed ENS is distributed along the entire length of the digestive tract in two major plexuses (i.e. myenteric and submucosal). The myenteric neurons coordinate motor behaviours of the intestinal muscle layers i.e. gut motility. Submucosal neurons control mucosal processes *via* local reflexes that are triggered by local distension of the intestinal wall, distortion of the mucosa, and chemical contents in the lumen (Grundy & Schemann, 2007). These processes result from a direct neuronal activation but also involve enteroendocrine cells which, upon stimulation by luminal nutrients or forces, release mediators such as serotonin (Alcaino et al., 2018; Neunlist & Schemann, 2014). Developmentally, the ENS originates from the ectoderm. The ectodermal contributions to the gut are derived from migrating vagal neural crest cells (vNCC) that primarily delaminate from the neural tube, with a minor contribution from the sacral neural crest cells (Nagy & Goldstein, 2017). In humans, the primary gut tube is formed by 3-4 weeks of gestation, while vNCCs migrate out of the neural tube prior to week 4. By 7 weeks of gestation, the vNCCs have colonized the entire gastro-intestinal tract to differentiate in enteric neurons and enteric glial cells (Fu et al., 2004). From week 7, enteric neuronal cell bodies coalesce into ganglia to form the

mentioned plexuses (Wallace & Burns, 2005). Enteric neuronal projections make connections with other ganglia or with non-neuronal tissues to control the overall function of the gut. In addition to act as a mechanical support for enteric neurons, the enteric glia participates to the maintenance of intestinal homeostasis (Neunlist et al., 2013). The gut is anatomically mature by 11 weeks of gestation but the ENS becomes functional by the end of the first trimester and continues to develop thereafter (McCann et al., 2019).

The use of human pluripotent stem cells (hSPC) and the development of methods to differentiate them into various cell types and tissue lineages have made the *in vitro* generation of complex human tissue possible, including the generation of human intestinal organoids (HIO). Using a stepwise differentiation process that mimics embryonic intestinal development, hPSCs can be differentiated into definitive endoderm and then into hindgut spheroids that will form three dimensional intestinal structures. After 28 days in culture, HIOs possess a polarized epithelium surrounded by supporting mesenchymal cells (Spence et al., 2011). Although HIOs resemble a functional intestine, they lack an ENS. To generate innervated HIOs, hPSC-derived vagal neural crest cells (vNCC) and hindgut spheroids can be combined in a 3D human intestinal organoid with a neuronal component (HIO+ENS). These organoids are reminiscent of a normal HIO with the exception they are surrounded by neurons and glial cells (Workman et al., 2017). HIO+ENS offer new opportunities in the study of the development and pathophysiology of human enteric neuropathies.

Herein, we describe a method to produce innervated HIOs from hPSCs and we outline methods to perform immunostaining assays that can be used to characterize innervated HIOs. We include notes on technical considerations for these experiments, and highlight key advantages and limitations of the system.

## **2. APPLICATIONS OF INTESTINAL ORGANOID WITH AN ENTERIC NERVOUS SYSTEM**

### **2.1. MEDICAL NEED**

Several gastrointestinal diseases have a neuropathic origin where the ENS is impaired. Common enteric neuropathies include oesophageal achalasia, gastroparesis, enteric dysmotility, intestinal pseudo-obstruction, whereas more rare forms such as Hirschsprung's disease have a genetic basis and are associated with absence of enteric neurons. Often affecting children after birth, these gastrointestinal neuropathies can occur in adults subsequently to infection, immune mediated inflammation or neurodegeneration (Westfal & Goldstein, 2017). However, the pathogenetic mechanisms leading to enteric neuropathies are yet to be precisely understood. With the goal of generating a comprehensive map, comparisons between innervated organoids generated from control and diseased patients will enable the identification of dysregulated genes, pathways or cell interactions, to create insights into the pathogenesis of enteric neuropathies and potential treatments.

## **2.2. RESEARCH NEED**

Our ability to understand gastrointestinal physiology in particular with the ENS has been limited to animal models and cellular models that are yet to model with fidelity human physiology. The generation of a human innervated small intestine from hPSCs constitutes an approach that offers an understanding of human cellular functions and relationships with the environment and represent a significant advance in our ability to study human gastrointestinal development, physiology and diseases. The combination of organoid models, chemical and genetic perturbations and OMIC technologies including single-cell transcriptomics, represents an exciting avenue to address cell lineages and relationships, and gene networks. In addition, the transplantation of these organoids in immunocompromised animals alleviate the possibilities to understand the development of higher order tissue with enhanced physiological output (Poling et al., 2018; Workman et al., 2017). These organoid systems bring us closer to the human physiology and hold great promises to understand basic gastrointestinal physiology in health and diseases.

## 2. PROTOCOL OVERVIEW

This protocol describes the generation of innervated human intestinal organoids (HIO+ENS) from hPSCs (Figure 1). Three main steps include vagal neural crest cells (vNCC) differentiation; human intestinal organoid (HIO) differentiation, followed by HIO-vNCCs co-culture in order to generate an HIO+ENS. The resulting organoid forms a 3D structure bearing a central epithelium surrounded by mesenchymal cells with enteric neurons and glial cells embedded within the mesenchyme. The overall process takes 41 days including 13 days to differentiate vNCCs, 9 days to differentiate intestinal HIOs and 28 days of HIO-vNCCs co-culture.

## 3. STEP BY STEP METHODS

### 3.1. HPSC CULTURE AND MAINTENANCE PRIOR TO DIFFERENTIATION

The maintenance of high quality hPSCs is crucial for differentiation and efficient production of both vNCCs and HIOs. Although many different hPSC cell lines can be used, each cell line behaves differently in culture i.e. cell growth. Culture conditions may be adjusted regarding maintenance, frequency of cell passaging and cell density at seeding prior differentiation.

#### 3.1.1. MATERIALS AND REAGENTS

- hPSC growing feeder-free. We routinely use the ES cell line WA01 also known as H1 (WiCell) and the iPS cell line f71.019 derived from normal human adult dermal fibroblasts (Gaignerie et al., 2018).
- Matrigel (354277, hESC-Qualified, LDEV-free, Corning)
- mTESR-1 (85850, Stem Cell Technologies)
- DMEM/F-12, HEPES (31330-038, Life Technologies)

- DPBS 1X (CS1PBS0101, Eurobio)
- StemMACS Passaging Solution XF (130-104-688, Miltenyi Biotec)
- Tissue culture-treated 6-well plate (3516, Corning)

### 3.1.2 PROTOCOL

hPSC culture requires the pre-coating of tissue culture plates with a suitable extracellular matrix for the attachment of cells. Thus, hESC-qualified Matrigel coated 6-well plates can be prepared prior hPSC maintenance and can be stored at 4°C for a maximum of 5 days.

#### 3.1.2.1 MAINTENANCE AND PASSAGING PRIOR DIFFERENTIATION

##### *hPSC maintenance*

1. Check hPSC colonies under an inverted microscope
2. Mark differentiated cells using a non-permanent marker

*Note: We check for differentiated cells two days after passaging and everyday thereafter. Pluripotent colonies present cells with a defined nucleus, they are homogeneous and have well-defined borders. Differentiated colonies present either large cells without clear colony borders or a heterogeneous zone at the center of the colony, with occasionally three-dimensional structures arising from the center.*

3. Aspirate both media and marked hPSC colonies using a pipette tip hooked to a vacuum pump
4. Add 1.5 mL of mTESR-1 per well
5. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

##### *hPSC passaging*

1. Split cells when confluence reaches 70-80%

*Note: hPSCs should be passaged at least once every 7 days.*

2. Identify and mark differentiated clusters of cells under an inverted microscope
3. Aspirate both media and marked areas using a pipette tip hooked to a vacuum pump
4. Wash with 1 mL of DPBS per well

5. Aspirate DPBS

6. Add 1 mL of StemMACS™ Passaging Solution XF per well

7. Incubate the plate at room temperature for 1 to 4 minutes depending on the cell line

*Note: cell colonies become refractive to the light under an inverted microscope when colonies start to detached from the dish.*

8. Aspirate the passaging solution when colonies' border start to lift off the dish

9. Add 1 mL of mTESR-1 per well

10. Scrape the colonies using a sterile 200µL pipette tip following a grid pattern

*Note: Using this method, colonies will be cut in even squares.*

11. Gently pipette back and forth using a 1 mL micropipette to detach cell clumps from the dish

12. Collect cell clumps into a 15 mL conical tube using a 1 mL micropipette

13. Distribute cell clumps into a hESC-qualified Matrigel pre-coated 6-well plates using a 1:10 ratio.

*Note: We typically split at a ratio of 1:10 and adjust it from 1:6 to 1:18, depending on colonies density and cell growth rate.*

14. Move the plate back and forth to evenly distribute the clumps in the well.

*Note: avoid swirling the media as colony clumps will aggregate in the center of the well, and will not grow evenly.*

15. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

*Note: hPSCs should be kept in culture for 3 to 7 days and passaged when they reach 80% confluence.*

*Note: for passaging of hPSCs to begin differentiation of vNCCs, see section 3.2. For differentiation into HIOs, see section 3.3.*

### **3.2. VAGAL NEURAL CREST CELLS (vNCC) DIFFERENTIATION**

The protocol outlined here will lead to the generation of vagal neural crest cells (vNCC) in adhesion cultures in a 6-well plate format.

#### **3.2.1. MATERIALS AND REAGENTS**

All solutions should be prepared fresh using sterile cell culture grade reagents.

- mTESR-1 (85850, Stem Cell Technologies)
- Collagenase, Type I (17018029, ThermoFisher) 500 U/mL working solution in mTESR-1
- Accutase (07920, Stem Cell Technologies)
- DMEM/F-12, HEPES (31330-038, Life Technologies)
- Neurobasal Medium (21103049, ThermoFisher)
- B-27 Supplement (50X) (17504-044, ThermoFisher)
- N-2 Supplement (100X) (17502-048, ThermoFisher)
- Penicillin-Streptomycin (15140122, ThermoFisher)
- Insulin (RP-10908, Invitrogen) 2 mg/mL stock in sterile 0.005N HCl, final concentration 5 µg/mL
- Human recombinant Fibroblast Growth Factor basic (FGF2; 130-093-840, Miltenyi Biotec), 100 µg/ml stock in sterile H<sub>2</sub>O, final concentration 20 ng/ml
- Human recombinant Epidermal Growth Factor (EGF; 130-097-749, Miltenyi Biotec), 500 µg/ml stock in sterile PBS/0.1% Bovine Serum Albumin, final concentration 50 ng/ml
- ROCK specific inhibitor Y27632 (ROCKi; 1254, Tocris Bioscience), 10 mM stock in sterile H<sub>2</sub>O, final concentration 10 µM
- GlutaMAX (35050061, ThermoFisher)
- Retinoic Acid (R2625-50MG, Sigma-Aldrich) 20 mM stock in DMSO, final concentration 2 µM
- *vNCC medium*: 50% DMEM/F-12, HEPES, 50% Neurobasal Medium supplemented with 2 mM GlutaMAX, 1X B-27 and N2 supplements, Insulin, FG2, EGF and 100 U/mL Penicillin-Streptomycin
- Fibronectin (1918-FN, R&D), 1.5 µg/mL final concentration in sterile DPBS
- 35x10 mm CytoOne Dish, Non-Treated (CC7672-3340, Starlab)

### 3.2.2 PROTOCOL

#### 3.2.2.1 GENERATION OF PSC-DERIVED NEUROSPHERES (DAY 0 TO 6)

*Day 0 (neurosphere generation) (Fig. 2A)*

1. Remove differentiated cells from a well of hPSCs (see 3.2.1.1)

2. Wash with 2 mLs of DMEM/F12, HEPES

*Note: Bring DMEM/F12, HEPES to room temperature for about 15 minutes and use directly.*

3. Aspirate DMEM/F12, HEPES

4. Add 1 mL of collagenase Type I prewarmed at 37°C

5. Incubate the plate for 1h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

6. Confirm detachment of the colonies' border under a microscope

7. Add 5 mLs of DMEM/F12, HEPES

8. Gently flush the well using a 1 mL micropipette to detach colonies

*Note: If colonies do not fully detach, gently scrape the bottom of the plate while flushing with the 1 mL micropipette.*

9. Collect the floating cell clumps into a 15 mLs conical tube

10. Let the clumps settle in the conical tube

11. Aspirate the supernatant without disturbing the pellet

12. Wash with 5 mLs of DMEM/F12, HEPES

13. Repeat steps 10 to 12

14. Add 3 mLs of vNCC media in the 15 mLs conical tube

15. Gently resuspend the clumps using a 1 mL micropipette

16. Transfer 3 mLs of cell suspension in a sterile 35x10 mm non-treated culture dish

17. Return the dish to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

*Note: The clumps will form free-floating spheres over the next day (Figure 2B).*

*Days 1 to 4 (daily media change) (Fig. 2B)*

1. Shake the dish to regroup the neurospheres in the center of the well

2. Collect the spheres into a 15 mLs conical tube using a 1 mL micropipette

3. Let the neurospheres settle in the conical tube

4. Aspirate the supernatant without disturbing the pellet
5. Add 1.5 mL of vNCC media in the 15 mLs conical tube
6. Gently resuspend the clumps using a 1 mL micropipette
7. Prepare the culture dish previously used by adding 1.5 mL of fresh vNCC media
8. Transfer 1.5 mL of sphere suspension from the 15 mLs conical tube to the dish using a 1 mL micropipette

*Note: the total volume expected per dish is 3 mLs.*

9. Return the dish to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
10. Change the vNCC media daily, repeating steps 1 to 9 until day 4

*Days 4 to 6 (induction of vagal identity)*

1. Prepare 3 mLs of vNCC media per dish supplemented with 2 µM retinoic acid
2. Shake the dish so that the neurospheres regroup in the center
3. Collect the spheres into a 15 mLs conical tube
4. Let the neurospheres settle
5. Aspirate out the supernatant without disturbing the pellet
6. Add 1.5 mL of vNCC media supplemented with 2 µM retinoic acid in the 15 mLs conical tube
7. Prepare the culture dish previously used by adding 1.5 mL of fresh vNCC media supplemented with 2 µM retinoic acid
8. Transfer 1.5 mL of neurosphere suspension from the 15 mLs conical tube to the dish using a 1 mL micropipette
9. Return the dish to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
10. Change the vNCC media the next day, repeating steps 1 to 9

### **3.2.2.2 PASSAGING OF NEUROSPHERES ON FIBRONECTIN-COATED PLATES (DAY 6 TO 13)**

vNCC culture requires the pre-coating of tissue culture plates with fibronectin. Thus, fibronectin coated 6-well plates must be prepared at least an hour prior to passaging using 1.5 µg/mL fibronectin in sterile DPBS. We recommend making 4 wells of a 6-well plate for one 35x10 mm dish of neurospheres. The pre-coated plates can be stored at 4°C for a maximum of 3 days.

#### *Day 6 to 10*

1. Shake plate to regroup the neurospheres in the center of the well
2. Pick and count spheres under a stereoscope

*Note: a collection of 25 to 50 neurospheres is recommended per fibronectin-coated well.*

3. Transfer 25-50 neurospheres into a 15 mLs conical tube
4. Wait for the spheres to settle in the tube
5. Aspirate the supernatant without disturbing the pellet
6. Gently resuspend 25-50 neurospheres in 1.5 mL of vNCC media
7. Transfer the neurospheres onto the fibronectin pre-coated plate using a final volume of 1.5 mL of vNCC media per well.
8. Shake the plate back and forth to evenly distribute the neurospheres in the well
9. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

*Note: Neurospheres will adhere to the fibronectin-coated plate and form rosettes (Fig. 2C).*

10. Change the media everyday using 1.5 mL vNCC media per well until day 9

#### *Days 10 to 13 (passaging of neural crest cells)*

1. Aspirate vNCC media.
2. Wash with 1 mL of DMEM/F12, HEPES
3. Add 1 mL of Accutase
4. Incubate 2 min at 37°C

*Note: Confirm cell detachment under an inverted microscope. Only migrating vagal neural crest cells are picked up, the rosettes remain attached on the plate. We recommend a 2 minutes incubation with Accutase. Longer treatment will result in a detachment of the rosettes.*

5. Add 5 mLs of DMEM/F12
  6. Transfer the cell suspension into a 15 mL conical tube
  7. Centrifuge at  $300 \times g$  for 5 min
  8. Aspirate the supernatant without disturbing the pellet
  9. Resuspend the cell pellet in 1 mL of vNCC media
  10. Count cells using a Malassez counting chamber or other cell counting method.
  11. Seed 180 000 single cells per well of a sterile tissue culture-treated 6-well plate (20 000 cell/cm<sup>2</sup>) in 1.5 mL of vNCC media.
  12. Shake the plate back and forth evenly to distribute the cell suspension in the well
  13. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
- Note: Cells will adhere overnight to the bottom of the 6-well plate.*
14. Change the vNCC media everyday with 1.5 mL per well until day 13

*Beyond day 13 (passaging of neural crest cells)*

vNCCs can be passaged every 3-4 days. Thus, we repeat passaging of the neural crest cells from step 1 to 13. vNCCs maintain their phenotype up to 3 passages before combination with intestinal spheroids (*Fig. 2D*). Although we do not typically use it, the vNCCs from the first or second passages can be frozen and thawed out using standard techniques.

### **3.3. HIO DIFFERENTIATION AND CULTURE**

The protocol outlined here will lead to the generation of human hindgut spheroids emerging from adhesion cultures in a 24-well plate format. The spheroids will be used in combination with the vNCCs produced. We dissociate hPSC colonies into single cells rather than cell clumps to obtain a robust and reproducible spheroid generation.

#### **3.3.1. MATERIALS AND REAGENTS**

All solutions should be prepared fresh using sterile cell culture grade reagents.

- mTESR-1 (85850, Stem Cell Technologies)
- Matrigel (354277, hESC-Qualified, LDEV-free, Corning)
- ROCK inhibitor Y27632 (ROCKi; 1254, Tocris Bioscience), 10 mM stock in sterile H<sub>2</sub>O, final concentration 10  $\mu$ M
- DMEM/F-12, HEPES (31330-038, Life Technologies)
- Accutase (07920, Stem Cell Technologies)
- RPMI Media 1640 (21875-034, ThermoFisher)
- MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (NEAA, 11140-035, ThermoFisher)
- Fetal Bovine Serum (dFBS, 26140087, Life Technologies)
- Activin A (338-AC, R&D System), 500  $\mu$ g/mL stock in 4 mM HCl, final concentration 100 ng/ml
- Human recombinant Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4; 235-F4-01M, R&D System), 100  $\mu$ g/mL stock in sterile PBS, 0.1% BSA, final concentration 500 ng/ml
- Chiron (CHIR99021, 4423/10, Tocris Bioscience), reconstituted in DMSO at 10 mM stock in sterile DMSO, final concentration 3  $\mu$ M
- Hindgut differentiation medium: RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA, 2% dFBS, 500 ng/ml FGF4 and 3  $\mu$ M Chiron
- Nunclon Delta 24-well plates (142475, ThermoFisher)

### 3.3.2. HIO CULTURE PROTOCOL (DAY 0 TO 9)

HIO differentiation requires the pre-coating of tissue culture plates with Matrigel. hESC-qualified Matrigel coated 24-well plates can be prepared prior differentiation and can be stored at 4°C for a maximum of 5 days. To seed a 24-well plate with hPSCs, we recommend using 2 wells of a 6-well plate of hPSC at 80% confluence.

*Day 0 to 2 (hPSC passaging and plating) (Fig. 3A)*

1. Remove differentiated cells from a well of hPSCs (see 3.2.1.1)
2. Wash each well to be passaged with 1 mL of DMEM/F12, HEPES
3. Add 1 mL of room temperature Accutase to each well
4. Incubate 5 minutes at 37 ° C

*Note: Cell clumps will detach from the bottom of the plate. The incubation time can be extended up to 7 total minutes if colonies remain attached.*

5. Add 2 mLs of DMEM/F12, HEPES
6. Pipette back and forth to dissociate and break cell clumps into single cells
7. Collect the cell suspension from all wells of a 6-well plate in a 15 mLs conical tube.

*Note: Proceed rapidly to the following steps to avoid excessive cell death as the enzyme Accutase is just diluted and not inactivated*

8. Centrifuge for 1 min at 300 x g
9. Aspirate the supernatant
10. Re-suspend the cell pellet with 1 mL of mTESR-1 with ROCKi
11. Count cells using a Mallasez chamber and calculate the volume needed of cell suspension to seed 24 wells of a 24 well plate

*Note: We typically seed 100 000 cells per well of a 24 well plate. Therefore, we need  $2,4 \cdot 10^6$  cells per 12 mLs of mTESR-1 with ROCKi.*

12. Add the calculated volume of cell suspension in a 15 mLs conical tube containing 12 mLs of mTESR-1 with ROCKi
13. Distribute 500  $\mu$ L of cell suspension per well of a 24 well plate, using a 1 mL micropipette

*Note: Pipette back and forth the cell suspension in the 15 mLs conical tube every 6 wells to avoid cell sedimentation during the cell seeding*

14. Shake the plate back and forth to distribute the cells evenly in the wells
15. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours
16. Aspirate the media
17. Add 500  $\mu$ L of mTESR-1 per well
18. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours (*Fig. 3B*)

*Day 2 to 5 (Definitive endoderm differentiation)*

1. Aspirate media on day 2
2. Add 500  $\mu$ L of RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA and 100 ng/ml Activin A per well  
(Fig. 3C)
3. Aspirate media on day 3
4. Add 500  $\mu$ L of RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA, 0,2% dFBS and 100 ng/ml Activin A per well
5. Aspirate media on day 4
6. Add 500  $\mu$ L of RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA, 2% dFBS and 100 ng/ml Activin A per well

*Day 5 to 9 (Intestinal tissue differentiation) (Fig. 3D)*

1. Aspirate media
2. Add 500  $\mu$ L of Hindgut differentiation medium
3. Repeat steps 1 and 2 on 4 consecutive days

*Note: Spheroids may appear on day 7 or 8. In this case, use a 1 mL micropipette to discard the media instead of using a vacuum aspiration. When spheroids begin to emerge from the culture, continue to section 3.4 to combine spheroids with vNCCs.*

### **3.4. GENERATION OF HIO+ENS**

When spheroids emerge by day 9, vNCCs can be combined prior their inclusion in a extracellular matrix gel (Matrigel).

#### **3.4.1. MATERIALS AND REAGENTS**

- Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, (GFR, LDEV-free , 354230, Corning)

- DMEM/F12, HEPES (31330-038, Life Technologies)
- Accutase (07920, StemCell Technologies)
- Advanced DMEM/F-12 (12634-010, ThermoFisher)
- B-27 Supplement (50X) (17504-044, ThermoFisher)
- N-2 Supplement (100X) (17502-048, ThermoFisher)
- HEPES (15630-056, ThermoFisher)
- GlutaMAX (35050-038, ThermoFisher)
- Penicillin-Streptomycin (15140122, ThermoFisher)
- Human recombinant Epidermal Growth Factor (EGF; 130-097-749, Miltenyi Biotec), 500 ug/ml stock in sterile PBS/0.1% Bovine Serum Albumin, final concentration 50 ng/ml
- *Minigut media*: Advanced DMEM/F-12 supplemented with 1X B27 and 1X N2 supplements, 10 mM HEPES, 2 mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin-Streptomycin and 50 ng/ml EGF
- Nunclon Delta 24-well plates (142475, ThermoFisher)

### 3.4.2. PROTOCOL

#### *Recovery of intestinal spheroids*

1. Recover floating spheroids using a 1 mL micropipette under a stereo-microscope

*Note: While collecting spheroids, we recommend that a rough estimate of the number of spheroids is obtained, in order to determine the number of vNCCs that will be required.*

2. Collect the spheroids in a 15 mLs conical tube. Multiple wells from a 24 well plate can be combined into one tube.

3. Wait for the spheroids to settle in the tube

4. Aspirate out media

5. Add 1 mL of DMEM/F12

6. Place the 15 mLs conical tube in an incubator and proceed to the recovery of vNCCs

#### *Recovery of vNCCs*

*A well of a 6-well plate of vNCCs usually contains around 0,4-0,5. 10<sup>6</sup> cells. We recommend using a ratio of 1000 vNCCs per spheroid.*

1. Aspirate media
2. Wash with 1 mL DMEM/F12
3. Add 1 mL Accutase
4. Incubate 2-3 min at 37°C.
5. Add 5 mLs of DMEM/F12
6. Transfer the cell suspension in a 15 mLs conical tube.
7. Centrifuge at 300 x g for 5 min.
8. Aspirate supernatant without disturbing the pellet
9. Resuspend the cell pellet in 1 mL DMEM/F12
10. Count cells using a Malassez counting chamber or other cell counting method.
11. Proceed to the co-culture of intestinal spheroids and vNCCs

#### *Co-culture of intestinal spheroids and vNCCs (Fig. 4A-D)*

1. Add the required volume of vNCC suspension to the 15 mLs conical tube containing the spheroids

*Note: We recommend using a ratio of 1000 vNCCs per spheroid.*

2. Centrifuge 2 min at 300 x g
3. Aspirate supernatant
4. Gently resuspend the spheroids and vNCCs in ice-cold Matrigel, pipetting up and down gently to evenly mix vNCCs with spheroids.

*Note: Approximately 20 to 40 spheroids per 20 µL of Matrigel can be embedded. Matrigel should be kept on ice at all time to avoid polymerization.*

5. Distribute 20 µL droplets of ice-cold Matrigel (without vNCCs+spheroids) in the center of a 24-well plate.

*Note: We realize a Matrigel bed first to avoid vNCC accumulation at the bottom of the plate.*

6. Overlay the existing Matrigel drop with 20 µL of hindgut spheroids+vNCCs Matrigel suspension
7. Allow Matrigel to start polymerization for 2-3 minutes at room temperature

8. Turn the cell culture plate upside-down
9. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 20 to 30 minutes
10. Overlay the Matrigel drop with 500 µL of Minigut media
11. Replace media twice a week for 14 days

#### *Passaging of innervated intestinal organoids*

Organoids should be passaged after 2 weeks of culture and placed in fresh Matrigel.

1. Collect the Matrigel drop containing HIO+ENS with a 1 mL micropipette under a stereomicroscope using sterile culture condition

*Note: 1 mL pipette tips can be cut to facilitate HIO+ENS removal from the Matrigel.*

2. Transfer HIO+ENS in a sterile petri dish filled with DMEM/F12, HEPES
3. Under a stereomicroscope, separate HIO+ENS from remnant Matrigel using fine forceps
4. If multiple HIO+ENS structures appear to be fused together, separate them into individual structures using fine forceps

*Note: Under the stereomicroscope, single HIO+ENS can be selected and separated by identifying a central epithelial core.*

5. Collect HIO+ENS in a 15 mLs conical tube
6. Allow HIO+ENS to settle to the bottom of the tube

*Note: If HIO+ENS do not settle, briefly spin the tube at 300 x g.*

7. Aspirate supernatant
8. Resuspend HIO+ENS in ice-cold Matrigel

*Note: Approximately 5-10 HIO+ENS per 35 µL of Matrigel can be embedded.*

9. Distribute 35 µL of Matrigel containing HIO+ENS in the center of the well of a 24-well plate.
10. Allow Matrigel to start polymerization for 2-3 minutes at room temperature
11. Turn the cell culture plate upside-down
12. Return the plate to the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 20 to 30 minutes
13. Overlay the Matrigel drop with 500 µL of Minigut media
14. Replace media twice a week for 14 days

### 3.5. DIFFERENTIATION BENCHMARKING

Differentiation of cell types can be monitored using a combination of both gene or/and protein expression. For example, definitive endoderm can be assessed by controlling the proportion of CXCR4-expressing cell by flow cytometry or FOXA2 and SOX17 positive cells using immunofluorescence. Similarly, the expression of CDX2 can be verified in hindgut spheroids. Finally, the expression of CD49d, HNK-1 and P75<sup>NTR</sup> expression can be tested in vNCCs. Common markers used for benchmarking the differentiation steps for both HIOs and vNCCs are indicated in Table 1. The provided list is not exhaustive and additional markers can also be used to assess the differentiation.

### 3.6. ANALYSIS – FLUORESCENT IMMUNOSTAINING

The following protocol describes immunostaining on paraffin-embedded sections of intestinal organoids. This technique may be used for imaging of specific targets or for quality control during and after differentiation.

#### 3.6.1. MATERIALS AND REAGENTS

- DPBS 1X (CS1PBS0101, Eurobio)
- Paraformaldehyde, 2% diluted in DPBS
- Glycine (50046, Sigma-Aldrich)
- Histogel (HG-4000-012, ThermoFisher)
- Xylene
- Butanol
- Ethanol 100%, 95%, 90%, 75% and 70%
- Dako target retrieval solution 10X (S1699, Agilent)
- Bovine Serum Albumin (BSA, A7030, Sigma-Aldrich)

- Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich)
- Tween-20 (P9416, Sigma-Aldrich)
- Horse serum (16050122, ThermoFischer)
- Rabbit anti-CDX2 antibody (ab227201, Abcam)
- Mouse Anti-E-cadherin antibody (MAB7481, R&D Systems)
- Anti-rabbit Alexa Fluor 568 (A10042, ThermoFischer)
- Anti-rabbit Alexa Fluor 488 (A-21206, ThermoFischer)
- DAPI (D1306, ThermoFischer)
- *Washing solution*: DPBS supplemented with 0.5% Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA
- *Blocking solution*: DPBS supplemented with 0.5% Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA and 10% horse serum
- Prolong glass antifade mounting solution (P36982, ThermoFisher)
- Tissue processor
- Paraffin embedding station
- Pressure cooker

### 3.6.2. PROTOCOL

#### *Organoid processing and paraffin section*

1. Aspirate media and add 500  $\mu$ L of a 2% PFA solution to each well
2. Incubate for 2 hours at 4°C
3. Aspirate PFA solution
4. Wash with 500  $\mu$ L of DPBS/0,75% Glycine, under agitation for 10 minutes
5. Repeat the procedure 3 times
6. Retrieve HIO+ENS out of well
7. Embed 3-4 HIO+ENS in 30  $\mu$ L of Histogel
8. Transfer HIO+ENS into an appropriately labeled tissue processing embedding cassette.

9. Place samples in a tissue processor and proceed overnight to a standard tissue processing protocol:

-70% Ethanol x 2 for 30 min each

-75% Ethanol for 1 h

-90% Ethanol for 1 h

-95% Ethanol for 1 h

-100% Ethanol x 2 for 1 h each

-100% Ethanol for 20 min

-100% Butanol for 20 min

-Xylene x 3 for 1 h each

-Paraffin x 3 for 1 h each

10. Remove samples from tissue processor and embed them into appropriately sized disposable base molds

11. Discard the lid of the cassette and affix the bottom portion on top of the mold creating a tissue block

12. Remove the disposable base mold from the paraffin tissue bloc

13. Section into the block slightly, exposing the desired tissue face

14. Rehydrate the tissue soaking in a bath of PBS for 1 h at room temperature (RT), before chilling on ice

15. Section the tissue into ribbons 3  $\mu\text{m}$  thick and float sections until wrinkles disappear in a tissue flotation bath

15. Mount sections on to microscope slides

16. Bake the microscope slides at 60 °C for 1 h

17. Store microscope slides at room temperature until further use

### *Staining*

1. Warm microscope slides 30 min at 65°C.

2. Rehydrate microscope slides by immersing them in the following series of baths:

-Xylenes x2 for 7 min each

-100% EtOH for 5 min each

-95% EtOH for 4 min

-70% EtOH for 3 min

-Deionized water x2 for 2min

3. Perform heat induced epitope retrieval in Dako Target retrieval solution for 1 min 30s at 110°C

4. Permeabilize organoid sections in 0.5% Triton X-100/PBS at room temperature for 30 min

5. Wash in wash solution for 10 min with gentle agitation

6. Repeat the procedure 2 times

7. Outline tissue sections with a hydrophobic pen to contain reagents

8. Wash slides in wash solution for 10 min each with gentle agitation

9. Repeat the procedure 3 times

10. Incubate slides with blocking solution for 1 h in a square bioassay dish lined with a damp paper towel to maintain humidity in the chamber

11. Aspirate blocking solution

Note: Do not wash slides.

12. Incubate slides with rabbit anti-CDX2 at [1:500] and mouse anti-CDH1 at [1:500] in blocking solution at 4 °C overnight in humidity chamber

13. Wash slides in wash solution for 10 min each with gentle agitation

14. Repeat the procedure 3 times

15. Incubate slides with donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568 (binds to anti-CDX2 antibody) and donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (binds to anti-CDH1 antibody) at [1:500] in blocking solution at 4 °C overnight in a humidity chamber.

16. Wash slides in washing solution for 10 min with gentle agitation while protected from light

17. Repeat the procedure 3 times

18. Incubate slides with 1 µg/mL of DAPI in PBS for 10 min while protected from light

19. Wash microscope slides in PBS for 3 x 10 min each, while protected from light

20. Mount microscope slides with coverslips using Prolong mounting solution, or another aqueous mounting medium

Note: Wait at least 24 hours to image slides.

21. Proceed to imaging and cell counting under a fluorescent microscope (Fig. 5).



## 4 TROUBLESHOOTING & OPTIMIZATION

Problems may occur during the differentiation and culture processes. We listed below possible solutions to overcome these issues.

<b>Problem</b>	<b>Solution</b>
The definitive endoderm monolayer is not confluent	You can adjust hPSC cell starting density and/or control for Activin A activity
The yield of hindgut spheroid is low	You need to adjust PSC cell starting density
Neurospheres do not adhere on the plates	The fibronectin pre-coating is not working. Plates must be coated at least an hour prior the experiment
vNCC do not differentiate into enteric neurons and glial cells within the HIO	The number of vNCC is either too low or high. Although, a range of vNCC densities can be used, we recommend using 1000 vNCCs per hindgut spheroid
HIO+ENS are growing flat in the culture plate	The organoids start to adhere and grow on the plastic. When HIO+ENS are embedded in Matrigel, we recommend inverting the plate during the polymerization process
HIO+ENS do not have an epithelium after 28 days in culture	It is possible that mesenchymal cells have outgrown the epithelium. Using fine forceps, we recommend to remove excess of mesenchyme during the passaging procedure.

hPSC cell lines may present some differentiated cells if unchecked, thereby introducing unwanted cell types during the differentiation process. For these reasons, we recommend to thoroughly check and remove differentiated cells/colonies prior to starting the protocol. If the unwanted spontaneous

differentiation increases in hPSC cultures across passages, we suggest to discard the current cells and thaw out a lower passage cryovial of undifferentiated hPSCs.

Optimal conditions for intestinal differentiation may vary for different pluripotent stem cell lines. The starting cell density is a critical aspect that needs to be tested for every hPSC line. This range is variable but a reasonable starting point is 100,000 cells per well of a 24-well plate. We recommend testing several densities ranging from 80,000 to 140,000 cells for each differentiation. The success of differentiation can be approximated by the hindgut spheroid yield. For example, one can reasonably assume that if very few spheroids are produced, the differentiation process was sub-optimal, and the endoderm and hindgut differentiation will need to be optimized. As hPSC lines may vary across differentiation, we recommend using well-established ES lines as a gold-standard for these experiments. Thus, H1 (WA01, Wicell) or H9 (WA09, Wicell) human embryonic stem cells consistently give robust differentiation into intestinal organoids and can be used as positive controls for other iPSC lines.

Sources of reagent and lot testing are also critical for reproducibility across experiments. Recombinant protein or small molecule activity may differ. Thus, lot testing is highly recommended especially for Activin A, FGFs and CHIR99021. The testing can be performed using the aforementioned control markers during the differentiation process.

## 5. PRECURSOR AND ALTERNATIVE TECHNIQUES

Previous groups have achieved the directed differentiation of human intestinal organoids (Spence et al., 2011). Although, we primarily focused this method on the generation of small intestinal tissue from hPSCs, organoids can be differentiated to form specific regionalized areas of the gut. The directed differentiation using combined anterior-posterior signaling allows us to generate both foregut and hindgut tissues. Hence, the temporal activation of WNT/FGF/BMP/Retinoic acid/EGF signaling during the differentiation process can drive the tissue's fate toward oesophagus (Trisno et al., 2018), stomach (McCracken et al., 2014, 2017), jejunum- to ileum-like tissues (Tsai et al., 2017) or colon (Múnera et al., 2017). Based on the generation of human intestinal organoid, we can engineer in an ENS using enteric vNCCs. Using similar protocols, previous groups have demonstrated the directed differentiation of hPSCs into neural crest cells (NCC) (Bajpai et al., 2010; Curchoe et al., 2010) including enteric vagal

neural crest cells (vNCC) (Barber et al., 2019; Fattahi et al., 2016; Lau et al., 2019). Interestingly, hPSC-derived vNCCs can be combined within different gut regions including the colon (Lau et al., 2019).

As we translate embryological development in a dish, the maturation stage of the organoids reflects the corresponding embryonic stage and is reminiscent of a fetal intestine (Finkbeiner et al., 2015). This lack of maturation may represent an issue as far as the comparability of these engineered organoids to postnatal human tissue. *in vivo* engraftment of HIO in immunocompromised mice can be used to further tissue expansion, maturation and function (Watson et al., 2014). Transplanted HIO+ENS similarly develop into a mature intestinal tissue with crypts, villi, laminated subepithelial, and mesenchymal layers. Strikingly, these HIO+ENS exhibit similar features to the human ENS including neuronal bundles reassembling a myenteric-like plexus and a peristaltic like activity (Workman et al., 2017).

## 6. SUMMARY

The technique described in this protocol leads to the production of innervated human intestinal organoids. The key steps include the parallel differentiation of intestinal spheroids and vNCC from hPSC, and their combination into a self-assembled innervated intestinal organoid.

Using this organoid system coupled with perturbations of developmental pathways will allow us to directly address developmental processes and disease-related mechanisms. This includes both acute and chronic enteric neuropathies. In addition, patient specific or gene edited iPSC lines, can also be used to model tissue specific diseases. For example, a mutation in the Paired-like homeobox 2b (PHOX2B) gene has been associated with Hirschsprung's disease and was successfully reproduced with the HIO+ENS (Workman et al., 2017).

Although HIO+ENS are a step forward in generating intestinal tissue with greater functionality, important facets including an immune system or bacteria are absent. Strategies wherein the immune system is added to HIO+ENS will further improve the system. The transition of a sterile gut to colonization by a microbiome, using dedicated techniques, is also an important consideration (Hill et al., 2017). Finally, surgical strategies with transplanted HIOs offer opportunities to shed light on the role of the luminal content in intestinal maturation and gut function (Mahe et al., 2017).

**ACKNOWLEDGMENTS**

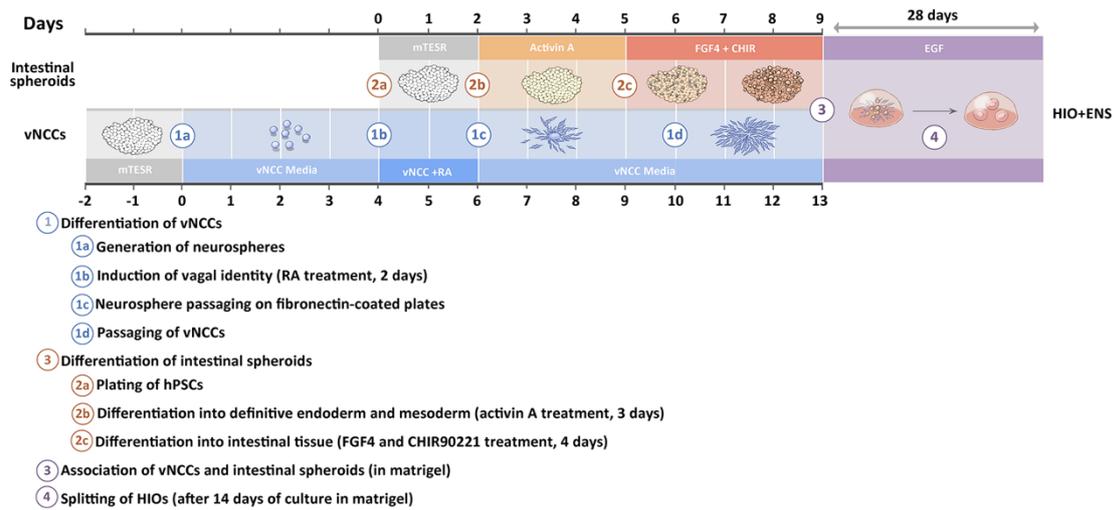
This work was supported in part by ANR-17-CE14-0021 (SyNEDI to M.M.M.) and a “New Team” grant (BOGUS to M.M.M.) from the Bioregate Regenerative Medicine Cluster, University of Nantes and Région Pays de la Loire.

TABLE LEGENDS:

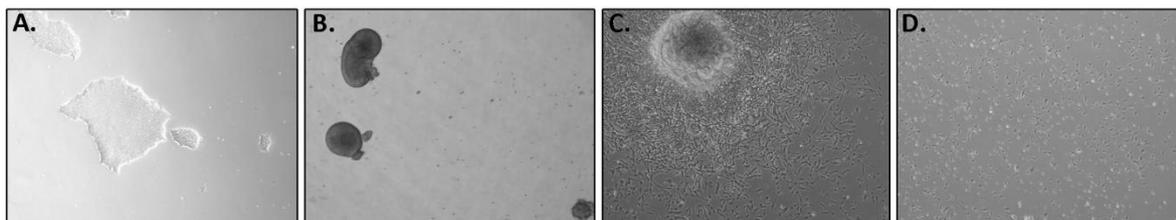
Section	Cell type	Markers	Analysis
3.2.2.2	vNCCs	HNK-1 (CD57)	qPCR, IF
		Neurotrophin Receptor p75 (p75NTR)	qPCR, IF
		SRY-Box Transcription Factor 10 (SOX10)	qPCR, IF
		Integrin Alpha 4 (CD49d)	FC
3.3.2	definitive endoderm	SRY-Box Transcription Factor 17 (SOX17)	qPCR, IF
		Forkhead Box A2 (FOXA2)	qPCR, IF
3.3.2	mid/hindgut spheroids	Caudal Type Homeobox 2 (CDX2)	qPCR, IF
3.3/3.4	epithelial cells	Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)	IF
		E-Cadherin (CDH1)	IF
3.3/3.4	fibroblasts	Vimentin (VIM)	IF
3.3/3.4	myofibroblasts	Alpha Smooth Muscle Actin (ACTA2)	IF
3.4	glial cells	Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	IF
		S100 Calcium Binding Protein B (S100B)	IF
3.4	neurons	Tubulin Beta 3 Class III (TUBB3)	IF
		Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCHL1)	IF

**Table 1: Markers used for benchmarking the differentiation steps.** A combination of markers can be used to confirm the efficiency and quality of differentiation using semi-quantitative PCR (qPCR), immunofluorescence staining (IF) or flow cytometry (FC).

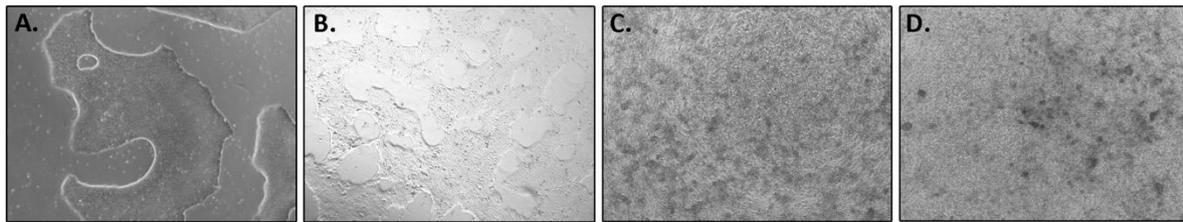
## FIGURE LEGENDS:



**Figure 1: Innervated human intestinal organoids differentiation protocol overview.** The experiment starts with the vagal neural crest cells (vNCC) differentiation, followed by the human intestinal organoid generation (HIO). Association of both vNCCs and HIOs is performed at day 13. The combined cells result in the self-assembled intestinal organoid containing enteric glia and neurons (HIO+ENS).

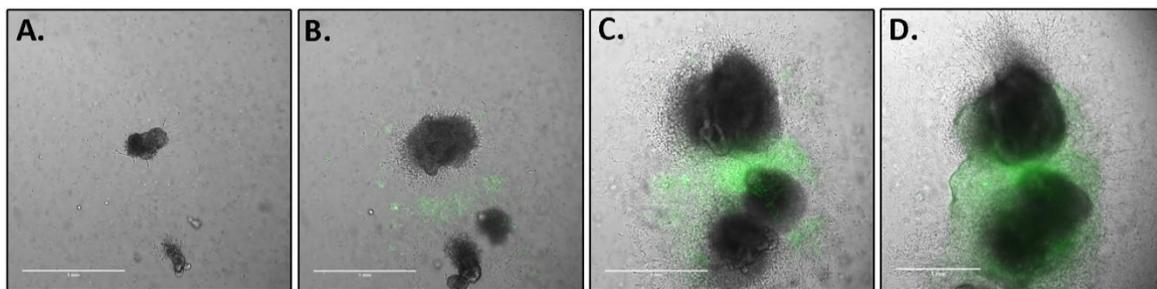


**Figure 2: Representative images of vagal neural crest cell differentiation.** **A.** hPSCs prior vNCC differentiation. **B.** Floating neurospheres (day 3). **C.** vNCCs migrating out of a neural rosette (day 9). **D.** vNCCs in culture after one passage (day 11).



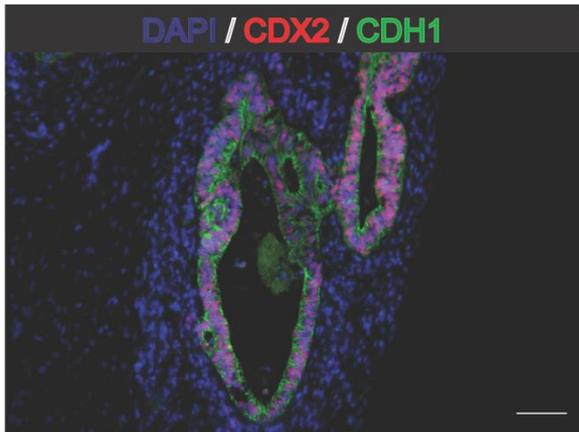
**Figure 3: Representative images of hindgut spheroid differentiation.**

**A.** hPSCs prior differentiation. **B.** Definitive endoderm differentiation (day 7). **C.** Cells forming tridimensional ridges during hindgut specification (day 10). **D.** End of intestinal spheroids differentiation (day 12). Spheroids are detaching from the adherent cell layer.



**Figure 4: Growth of innervated intestinal organoid in Matrigel over 13 days.**

GFP-expressing vagal neural crest cell differentiation (vNCC) are showed in green. **A.** Innervated intestinal organoid (HIO+ENS) a day after the combination of hindgut spheroids and vNCCs. **B.** HIO+ENS after 5 days in culture. **C.** HIO+ENS after 9 days in culture. **D.** HIO+ENS after 13 days in culture prior splitting. (Scale bars: 1 mm)



**Figure 5: Immunostaining of an intestinal organoid grown for 28 days in Matrigel.**

The intestinal organoid forms a central epithelium stained for E-cadherin (CDH1, green), CDX2 (red) and nuclei (DAPI, blue). A supporting mesenchyme surrounds the epithelium. (Scale bar: 50 $\mu$ m)

## REFERENCES:

- Alcaino, C., Knutson, K. R., Treichel, A. J., Yildiz, G., Strege, P. R., Linden, D. R., Li, J. H., Leiter, A. B., Szurszewski, J. H., Farrugia, G., & Beyder, A. (2018). A population of gut epithelial enterochromaffin cells is mechanosensitive and requires Piezo2 to convert force into serotonin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(32), E7632–E7641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804938115>
- Bajpai, R., Chen, D. A., Rada-Iglesias, A., Zhang, J., Xiong, Y., Helms, J., Chang, C.-P., Zhao, Y., Swigut, T., & Wysocka, J. (2010). CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*, *463*(7283), 958–962. <https://doi.org/10.1038/nature08733>
- Barber, K., Studer, L., & Fattahi, F. (2019). Derivation of enteric neuron lineages from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *14*(4), 1261–1279. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0141-y>
- Curchoe, C. L., Maurer, J., McKeown, S. J., Cattarossi, G., Cimadamore, F., Nilbratt, M., Snyder, E. Y., Bronner-Fraser, M., & Terskikh, A. V. (2010). Early Acquisition of Neural Crest Competence During hESCs Neuralization. *PLoS ONE*, *5*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013890>
- Fattahi, F., Steinbeck, J. A., Kriks, S., Tchieu, J., Zimmer, B., Kishinevsky, S., Zeltner, N., Mica, Y., El-Nachef, W., Zhao, H., de Stanchina, E., Gershon, M. D., Grikscheit, T. C., Chen, S., & Studer, L. (2016). Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature*, *531*(7592), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature16951>
- Finkbeiner, S. R., Hill, D. R., Alheim, C. H., Dedhia, P. H., Taylor, M. J., Tsai, Y.-H., Chin, A. M., Mahe, M. M., Watson, C. L., Freeman, J. J., Nattiv, R., Thomson, M., Klein, O. D., Shroyer, N. F., Helmuth, M. A., Teitelbaum, D. H., Dempsey, P. J., & Spence, J. R. (2015). Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.010>
- Fu, M., Tam, P. K. H., Sham, M. H., & Lui, V. C. H. (2004). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: A topographical study. *Anatomy and Embryology*, *208*(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s00429-003-0371-0>
- Gaignerie, A., Lefort, N., Rousselle, M., Forest-Choquet, V., Flippe, L., Francois-Campion, V., Girardeau, A., Caillaud, A., Chariou, C., Francheteau, Q., Derevier, A., Chaubron, F., Knöbel, S., Gaborit, N., Si-Tayeb, K., & David, L. (2018). Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Scientific Reports*, *8*(1), 14363. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32645-2>
- Grundy, D., & Schemann, M. (2007). Enteric nervous system. *Current Opinion in Gastroenterology*, *23*(2), 121–126. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3280287a23>
- Heanue, T. A., & Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: Advances in genetic and stem cell studies. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(6), 466–479. <https://doi.org/10.1038/nrn2137>
- Hill, D. R., Huang, S., Nagy, M. S., Yadagiri, V. K., Fields, C., Mukherjee, D., Bons, B., Dedhia, P. H., Chin, A. M., Tsai, Y.-H., Thodla, S., Schmidt, T. M., Walk, S., Young, V. B., & Spence, J. R. (2017). Bacterial colonization stimulates a complex physiological response in the immature human intestinal epithelium. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.29132>
- Lau, S.-T., Li, Z., Pui-Ling Lai, F., Nga-Chu Lui, K., Li, P., Munera, J. O., Pan, G., Mahe, M. M., Hui, C.-C., Wells, J. M., & Ngan, E. S.-W. (2019). Activation of Hedgehog Signaling Promotes Development of

Mouse and Human Enteric Neural Crest Cells, Based on Single-Cell Transcriptome Analyses. *Gastroenterology*, 157(6), 1556-1571.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.019>

Mahe, M. M., Brown, N. E., Poling, H. M., & Helmrath, M. A. (2017). In Vivo Model of Small Intestine. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1597, 229–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_17)

McCann, C. J., Alves, M. M., Brosens, E., Natarajan, D., Perin, S., Chapman, C., Hofstra, R. M., Burns, A. J., & Thapar, N. (2019). Neuronal Development and Onset of Electrical Activity in the Human Enteric Nervous System. *Gastroenterology*, 156(5), 1483-1495.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.020>

McCracken, K. W., Aihara, E., Martin, B., Crawford, C. M., Broda, T., Treguier, J., Zhang, X., Shannon, J. M., Montrose, M. H., & Wells, J. M. (2017). Wnt/ $\beta$ -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. *Nature*, 541(7636), 182–187. <https://doi.org/10.1038/nature21021>

McCracken, K. W., Catá, E. M., Crawford, C. M., Sinagoga, K. L., Schumacher, M., Rockich, B. E., Tsai, Y.-H., Mayhew, C. N., Spence, J. R., Zavros, Y., & Wells, J. M. (2014). Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516(7531), 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature13863>

Múnera, J. O., Sundaram, N., Rankin, S. A., Hill, D., Watson, C., Mahe, M., Vallance, J. E., Shroyer, N. F., Sinagoga, K. L., Zarzoso-Lacoste, A., Hudson, J. R., Howell, J. C., Chatuvedi, P., Spence, J. R., Shannon, J. M., Zorn, A. M., Helmrath, M. A., & Wells, J. M. (2017). Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Colonic Organoids via Transient Activation of BMP Signaling. *Cell Stem Cell*, 21(1), 51-64.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.05.020>

Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.006>

Neunlist, M., & Schemann, M. (2014). Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 14), 2959–2965. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272948>

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Derkinderen, P., des Varannes, S. B., & Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: A new actor in gut health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(2), 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221>

Poling, H. M., Wu, D., Brown, N., Baker, M., Hausfeld, T. A., Huynh, N., Chaffron, S., Dunn, J. C. Y., Hogan, S. P., Wells, J. M., Helmrath, M. A., & Mahe, M. M. (2018). Mechanically induced development and maturation of human intestinal organoids in vivo. *Nature Biomedical Engineering*, 2(6), 429–442. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0243-9>

Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., Shroyer, N. F., & Wells, J. M. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature09691>

Thompson, C. A., DeLaForest, A., & Battle, M. A. (2018). Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Developmental Biology*, 435(2), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.006>

Trisno, S. L., Philo, K. E. D., McCracken, K. W., Catá, E. M., Ruiz-Torres, S., Rankin, S. A., Han, L., Nasr, T., Chaturvedi, P., Rothenberg, M. E., Mandegar, M. A., Wells, S. I., Zorn, A. M., & Wells, J. M.

(2018). Esophageal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Delineate Sox2 Functions during Esophageal Specification. *Cell Stem Cell*, 23(4), 501-515.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.008>

Tsai, Y.-H., Nattiv, R., Dedhia, P. H., Nagy, M. S., Chin, A. M., Thomson, M., Klein, O. D., & Spence, J. R. (2017). In vitro patterning of pluripotent stem cell-derived intestine recapitulates in vivo human development. *Development (Cambridge, England)*, 144(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1242/dev.138453>

Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, 319(3), 367–382. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1023-2>

Watson, C. L., Mahe, M. M., Munera, J., Howell, J. C., Sundaram, N., Poling, H. M., Schweitzer, J. I., Vallance, J. E., Mayhew, C. N., Sun, Y., Grabowski, G., Finkbeiner, S. R., Spence, J. R., Shroyer, N. F., Wells, J. M., & Helmrath, M. A. (2014). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 20(11), 1310–1314. <https://doi.org/10.1038/nm.3737>

Westfal, M. L., & Goldstein, A. M. (2017). Pediatric enteric neuropathies: Diagnosis and current management. *Current Opinion in Pediatrics*, 29(3), 347–353. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000486>

Workman, M. J., Mahe, M. M., Trisno, S., Poling, H. M., Watson, C. L., Sundaram, N., Chang, C.-F., Schiesser, J., Aubert, P., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Miyaoka, Y., Mandegar, M. A., Conklin, B. R., Neunlist, M., Brugmann, S. A., Helmrath, M. A., & Wells, J. M. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23(1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/nm.4233>

## ARTICLE 2 : THE HUMAN DEVELOPING ENTERIC NERVOUS SYSTEM PATTERNS INTESTINAL MESENCHYME THROUGH BMP SIGNALING

Grâce au modèle HIO/HIO+ENS, il nous est donc possible de reproduire in vitro l'organogénèse de l'intestin. De plus, la nature modulable de ce modèle nous permet d'incrémenter différents composants du tube digestif en développement – ici, avec le SNE. L'utilisation de ce système organoïde couplé à des perturbations des voies de développement nous permet donc d'étudier directement les processus de développement physiologique de l'intestin humain dans sa période précoce, et ainsi d'explorer l'influence des progéniteurs du SNE sur le développement du mésenchyme intestinal.

Dans cet article, nous avons donc comparé le développement d'HIO et HIO+ENS par bulk et scRNAseq, pour identifier les modifications présentes dans le mésenchyme des organoïdes possédant un SNE. Ensuite, nous avons cherché à identifier des voies de signalisation dont les ligands seraient produits par les cellules du SNE. Enfin, nous cherchons à tester l'effet de ces voies de signalisations sur le développement des HIO, par culture avec les ligands détectés, pour évaluer l'effet de la voie de signalisation sur le développement du SNE. Cette stratégie est schématisée dans la figure 25.

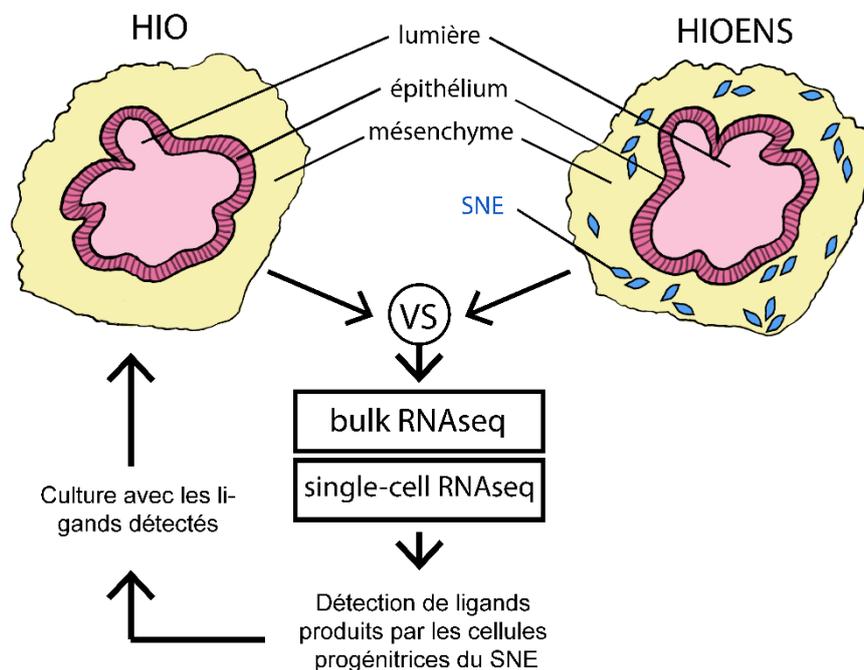


Figure 25 : Stratégie de l'étude réalisée

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des modifications des populations musculaires et vasculaires dans les HIO+ENS, et mis en cause la voie BMP (plus spécifiquement, le ligand BMP7) dans ces modifications.

## The human developing enteric nervous system patterns intestinal mesenchyme through BMP signaling

Elise Loffet<sup>1</sup>, Lisa Brossard<sup>1</sup>, Holly M. Poling<sup>2</sup>, Nicole Brown<sup>2</sup>, James M. Wells<sup>3,4</sup>, Michael A. Helmrath<sup>2,5</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>, Maxime M. Mahe<sup>1,2,5\*</sup>.

<sup>1</sup>Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France.

<sup>2</sup>Department of Pediatric General and Thoracic Surgery, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA;

<sup>3</sup>Division of Developmental Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229 USA

<sup>4</sup>Division of Endocrinology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229 USA.

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio;

\*Corresponding author:

Maxime M. Mahe: [maxime.mahe@inserm.fr](mailto:maxime.mahe@inserm.fr)

**Keywords:** human pluripotent stem cell; intestine, enteric nervous system; vagal neural crest cell; mesenchyme; organoid

## Abstract

The organs of the gastro-intestinal tract are commonly designated as endoderm-derived, as the epithelium lining shaping the gut tube is an endoderm derivative. Yet, the physiological and functioning organs of the digestive system truly arise from interactions between tissues of multiple embryonic origins including the neural crest cells. The contribution of neural crest derivatives to gut patterning e.g. ENS progenitor cells, has been explored in avian models but the mechanisms in humans remain elusive. Herein, we investigated the effect of the ENS on the development of mesenchymal cell types such as the muscular and vascular components of the gut, by comparing the development of mesenchymal cells in intestinal organoids with and without a neural component. We found that ENS cells positively impacted the development of muscular and vascular populations in human intestinal organoids grown *in vitro* and *in vivo*. We confirmed our findings using a human fetal atlas. We finally identified ENS-mediated BMP expression as a possible effector of neural crest cell-mediated intestinal mesenchymal patterning.

## Introduction

The formation of the gastro-intestinal (GI) tract starts during the third week of embryonic development, as the three germ layers (endoderm, mesoderm, ectoderm) develop, and endoderm subsequently folds in on itself to form the primary gut tube <sup>1</sup>. The organs of the GI tract are commonly designated as endoderm-derived, as the epithelium lining of the gut tube is an endoderm derivative. Yet, the physiological and functioning organs of the digestive system truly arise from the co-development of tissues with multiple embryonic origins. The mesenchyme that surrounds and supports the intestinal epithelium emerges from splanchnic mesoderm. This mesenchyme has important physiological roles including the formation of muscle layers, which carry out intestinal motility, as well as vascular tissues. Interactions that take place between mesenchymal (mesoderm) and epithelial (endoderm) tissues during intestinal development have been previously studied <sup>2</sup> and found to be implicated in mechanisms ranging from gut regionalization in chick <sup>3</sup> or tube lengthening<sup>4</sup>.

The third germ layer, ectoderm, also contributes to the formation of the gut tube through the enteric nervous system (ENS) formation. The ENS is an autonomous subdivision of the peripheral nervous system that controls several fundamental aspects of intestinal physiology, such as intestinal motility, epithelial permeability, and exchange of fluids in the gastro-intestinal tract <sup>5</sup>. It can be separated in two plexi, one located in between the circular and longitudinal muscle layers (myenteric plexus) and the second one located between the circular muscle and the submucosa (submucosal plexus). The ENS' embryonic origins can be traced to the neural crest, a vertebrate-specific multipotent cell population that can differentiate into a diverse set of cell types with widely varying functions and properties. From facial bones and cartilage to endocrine cells of the adrenal gland, the neural crest contributes to numerous organ systems, making it an embryological structure of high interest, so much so that it has sometimes been described as a fourth germ layer<sup>6</sup>.

In the 4th week of human embryonic development (E8.5 in mouse), the neural crest cells (ENCCs) of the vagal region (somite 1-7) delaminate from the neural tube and start migrating along the GI tract. They subsequently colonize the entire length of the gut through a rostro-caudal chain migration that ends by week 7th (E13.5) to form the ENS <sup>7</sup>. The study of ENS development is also relevant to developmental pathologies such as Hirschsprung's disease, a disorder in which the ENS fails to form and results in aganglionosis of the distal end of the digestive tube.

Embryonic development of the ENS is an active field of study, however, there has been only limited interest towards the interactions between the developing ENS and its surrounding mesenchymal populations. Neural crest cells are known to interact with the tissues being colonized, but studies mostly focus on the effect that surrounding populations have on neural

crest cells. These studies highlighted mechanisms linked to neural crest's migration<sup>8</sup> and differentiation<sup>9</sup>. In a recent study, Faure et al. showed that the developing ENS can have a patterning effect on mesodermal populations. They demonstrated that in chick embryos, in which the vagal neural crest was ablated before their migration, the development of smooth muscle in the stomach was impaired<sup>10</sup>. In the posterior developing gut, smooth muscle cells appear shortly after ENCCs colonization in the pre-ombilical section, and after colonization in the post-ombilical section<sup>11,12</sup>. The contribution of neural crest derivatives to tissue patterning has also previously been demonstrated in other organs. For example, the cranial neural crest influences migration and late differentiation of muscle in the head mesenchyme<sup>13</sup> or myogenesis of skeletal muscle in the somites<sup>14</sup>.

In this context, we aimed to explore how the developing ENS might influence surrounding populations during development of the small intestine in humans. Recent advances in the field of stem cell engineering have provided with new and useful models to study development, such as human intestinal organoids (HIOs) derived from human pluripotent stem cells (hPSCs). HIOs reproduce human intestinal organogenesis and early gut development<sup>1</sup> and contain both an epithelium and surrounding mesenchyme. We recently included enteric nervous cells through a co-coculture with vagal neural crest cells<sup>15,16</sup>, making it possible to use the HIO model to study interactions between the developing ENS and other intestinal cell populations.

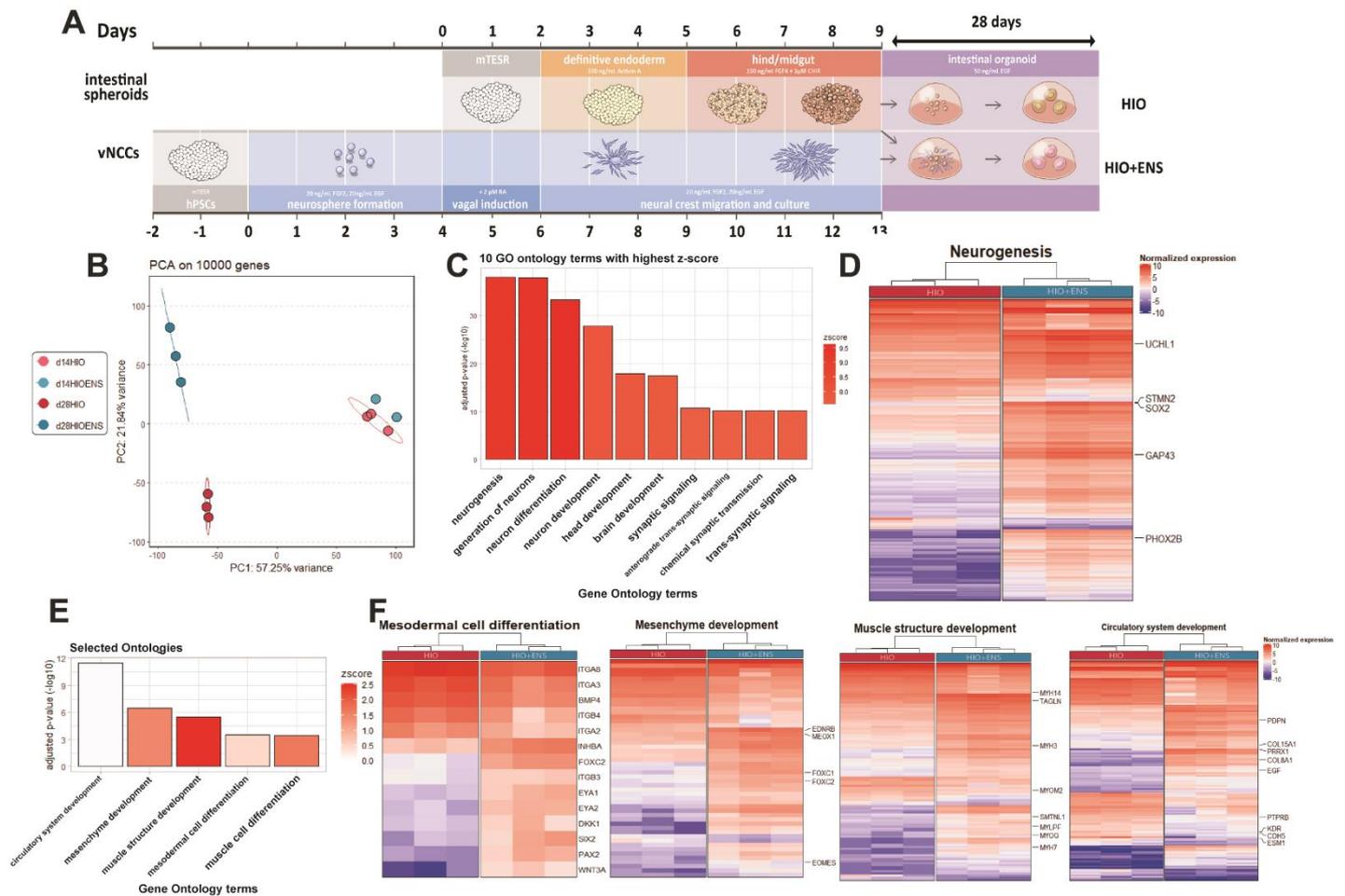
Herein, we aimed to investigate the effect of the ENS on the development of mesenchymal cell types such as the muscular and vascular components of the gut, by comparing the development of mesenchymal cells in intestinal organoids with and without a neural component. We found that ENS cells positively impacted the development of muscular and vascular populations in organoids grown *in vitro*. We finally identified ENS-mediated BMP expression as a possible effector of intestinal mesenchymal patterning.

## Results

### *The developing enteric nervous system alters mesenchymal gene expression*

Human Intestinal Organoids without (HIOs) and with an enteric nervous system (HIO+ENS), were produced according to previously described protocol<sup>16</sup> (Figure 1A). HIOs were produced through directed differentiation of human pluripotent stem cells and grown in Matrigel for 28 days. Both HIOs and HIO+ENS presented a central lumen lined with CDX2+ epithelial cells and surrounded by a supportive mesenchyme. HIO+ENS were produced by co-culturing HIOs with hPSC-derived vNCCs. vNCCs-derived cells differentiated into neurons and enteric glial cells<sup>15</sup>. We first compared the development of HIOs and HIO+ENS using differential analysis of bulk RNA sequencing. HIOs and HIO+ENS from 3 independent differentiations were analyzed at 14 and

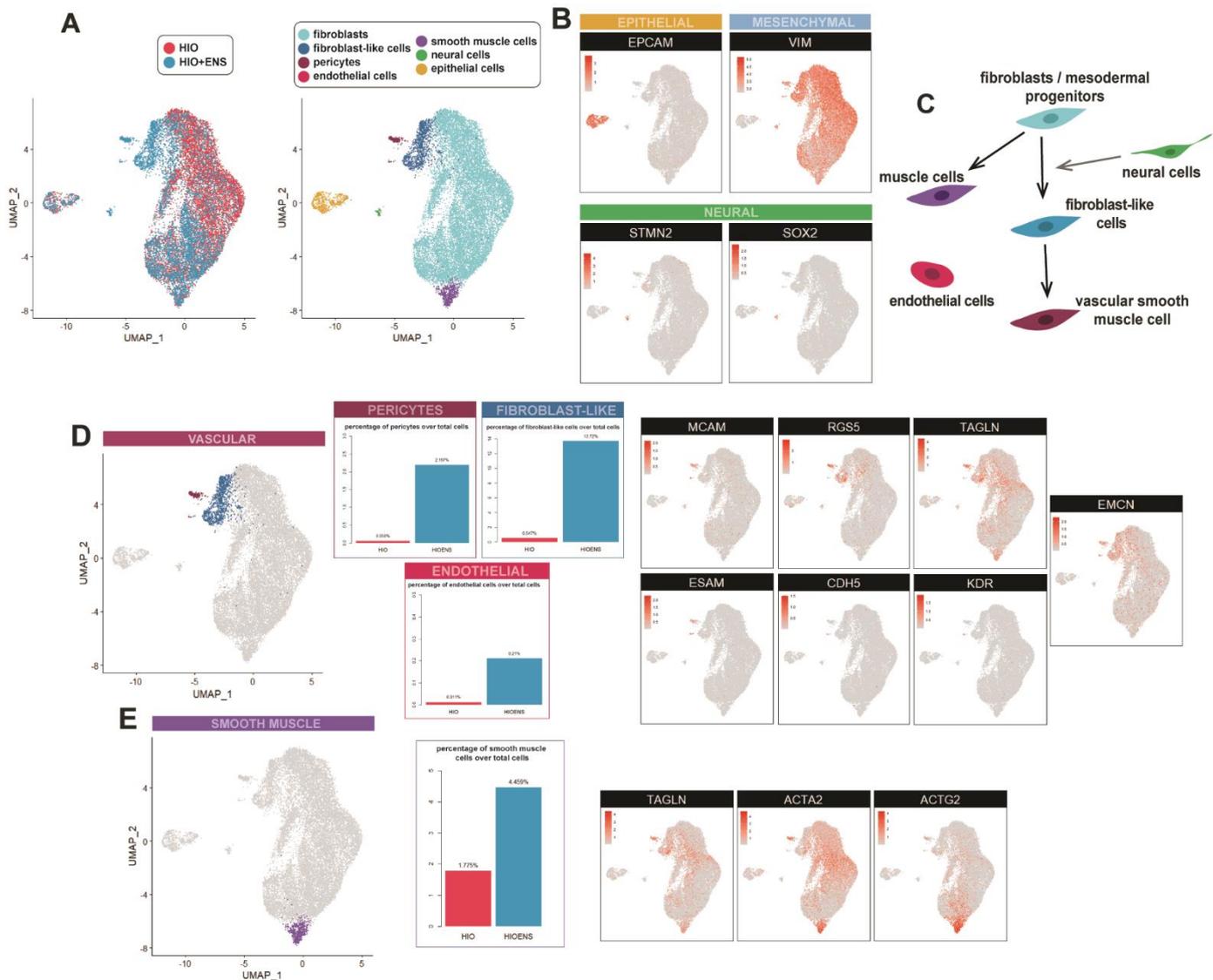
28 days of culture in Matrigel. Principal Component Analysis (PCA) showed significant difference between HIO and HIO+ENS at 28 days of culture (Figure 1B). Subsequent analysis revealed 1038 down-regulated genes and 2065 up-regulated genes in HIO+ENS compared to HIO at 28 days of culture (cut-off of 0.05 for adjusted p-value and 1.5 for log<sub>2</sub> Fold Change). Gene Ontology analysis of the genes that were differentially expressed revealed these changes to be mostly due to neurodevelopment of the ENS (Figure 1C-D), i.e. "Neurogenesis" (adjusted p-value : 1.045e-38, z-score : 9.302), "generation of neurons" (adjusted p-value : 1.635e-38, z-score : 9.420) or "neuron differentiation" (adjusted p-value : 6.230e-34, z-score : 9.623). Nonetheless, we found a number of underlying ontologies that were linked to mesenchyme development, i.e. "Mesodermal cell differentiation" (adjusted p-value : 3.144e-04, z-score : 0.471), "Mesenchyme development" (adjusted p-value : 3.352e-07, z-score : 1.492), "Muscle structure development" (adjusted p-value : 3.148e-06, z-score : 2.547), "Circulatory system development" (adjusted p-value : 3.077e-12, z-score : -0.053) (Figure 1E-F). We found several significantly upregulated genes included TAGLN, a marker of early smooth muscle differentiation <sup>17</sup> (log<sub>2</sub>Fold Change = 2.49, padj = 2.45e-20); MYOG, a muscle-specific transcription factor <sup>18</sup> (log<sub>2</sub>Fold Change = 4.76, padj = 1.04e-05 ); PPRX1, the mesodermal homeobox transcription factor involved in myoblast differentiation <sup>19</sup> and vascular development <sup>20</sup> (log<sub>2</sub>Fold Change = 4.54, padj = 4.95e-4) and MEOX1, the mesodermal homeobox gene 1 (log<sub>2</sub>Fold Change = 2.5, padj = 5.38e-7), described as a intestine-specific marker in human fetal intestine endothelial cells <sup>21</sup> and linked to muscle stem cell growth in zebrafish <sup>22</sup>. This unbiased analysis revealed broad changes within the HIO+ENS and suggested changes in mesenchyme patterning.



**Figure 1 : Characterization of the transcriptomic differences between HIO and HIO+ENS. A.** Schematic representation of hPSCs differentiation into HIO and HIO+ENS. **B.** Principal Component Analysis (PCA) of HIO and HIO+ENS bulk RNAseq data. **C.** 0 gene ontology with strongest z-score (association to HIO+ENS). **D.** Heatmap of gene expression linked to Neurogenesis. **E.** Significant gene ontologies linked to mesenchymal development. Plotted genes are significantly down- or up-regulated ( $\log_2FC > 1.5$  or  $< 1.5$ ). **F.** Heatmap of gene expression in genes linked to Ontologies of interests: (mesodermal cell differentiation, mesenchyme development, muscle structure development and circulatory system development). Plotted genes are significantly down- or up-regulated ( $\log_2FC > 1.5$  or  $< 1.5$ ).

*The developing ENS contributes to mesenchymal cell differentiation at the single cell level.*

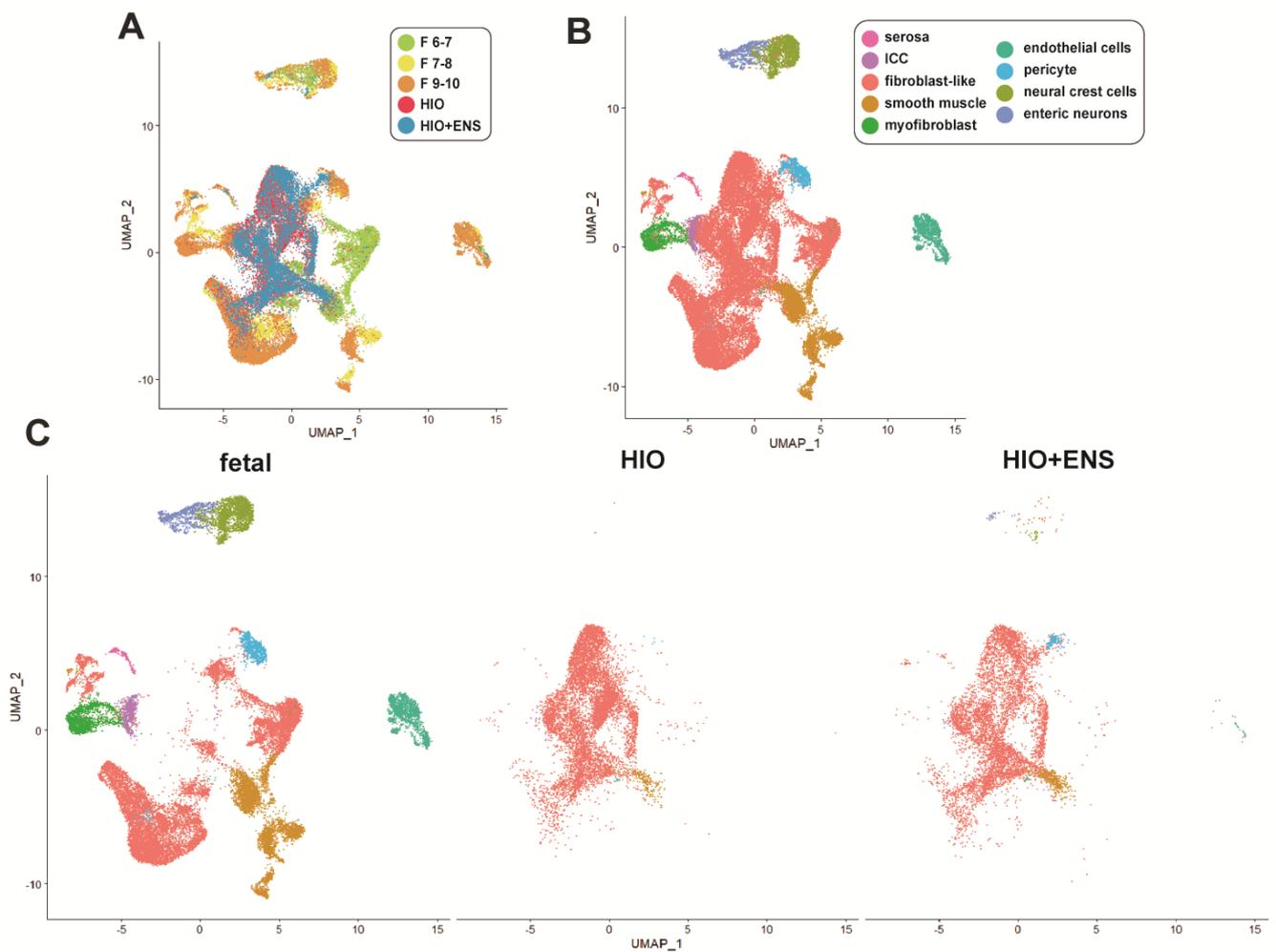
We next analyzed HIO and HIO+ENS at 28 days of culture using a single-cell RNA sequencing approach to characterize the mesenchymal populations affected by the addition of a neural component. We analyzed and concatenated cells from HIOs and cells from HIO+ENS and visualized resulting data using a UMAP dimension reduction. The datasets contained epithelial (EPCAM+ CDX2+), neural (STMN2+ SOX2+) and mesenchymal (VIM+) cells (Figure 2A-B). Mesenchymal cells could be subdivided into fibroblasts (VIM+), smooth muscle cells (TAGLN+ ACTA2+ ACTG2+), endothelial cells (CDH5+ KDR+ ESAM+), pericytes (ESAM+ TAGLN+ MCAM+ RGS5+) and fibroblasts-like cells (Figure 2D-E). We performed a pseudo-time analysis of mesenchymal populations in HIO+ENS to infer their developmental cell transitions. The resulting trajectories suggested that fibroblast-like cells could be progenitors of pericytes (Figure 2C; Supplemental Figure S1). We verified that pericytes could originate from fibroblast-like cells, and the gene expression found in the pericyte cluster, such as TAGLN, RGS5 and EMCN, confirmed this observation (Figure 2D). We found HIO+ENS to have an enriched smooth muscle cell population (1.775% in HIO, 4.459% in HIO+ENS, a 2.5 Fold increase) (Figure 2E). Pericytes were virtually absent from HIO (0.056% in HIO, 2.197% in HIO+ENS) and endothelial cells formed a very small cluster in both groups (0.011% in HIO, 0.21% in HIO+ENS). Fibroblast-like cells are a group of mesenchymal cells (VIM+) with a different transcriptional signature and were increased in HIO+ENS (0.55 % in HIO, 13.72 % in HIO+ENS). Fibroblast-like cells were similar to fibroblasts but showed a diffuse expression of muscular (i.e. TAGLN) and vascular (i.e. EMCN) genes, as well as distinct ECM genes (MGP, TNC; Table S1). These data suggested that the developing ENS increased mesenchymal differentiation.



**Figure 2: Identification of mesenchymal cell populations in HIO and HIO+ENS.** **A.** UMAP of concatenated HIO and HIO+ENS data, with identified clusters. **B.** Expression of epithelial marker EPCAM, mesenchymal marker VIM, and neural markers STMN2 and SOX2. **C.** Schematic representation of hypothetical differentiation trajectories. **D.** Vascular, endothelial and fibroblast-like clusters, with percentage over total cells in HIO vs HIO+ENS for each cluster. Markers used to identify those clusters include MCAM (CD146), RGS5, TAGLN (sm22), EMCN (endomucin), ESAM, CDH5(CD144) and KDR. **E.** Smooth muscle cells, with percentage over total cells in HIO and HIO+ENS. Markers used to identify this cluster include TAGLN (sm22), ACTA2 (alpha smooth muscle actin), ACTG2 (gamma smooth muscle actin).

To confirm the cell identity, from our datasets, HIO and HIO+ENS data were integrated to a single-cell atlas from human fetal intestine (duo-jejunum and ileum, post-conceptual weeks 6 to 10; <https://www.gutcellatlas.org/>)<sup>23</sup>. Pericytes, smooth muscle cells and neural cells were found to integrate well with those data and to share identical markers (Figure 3;

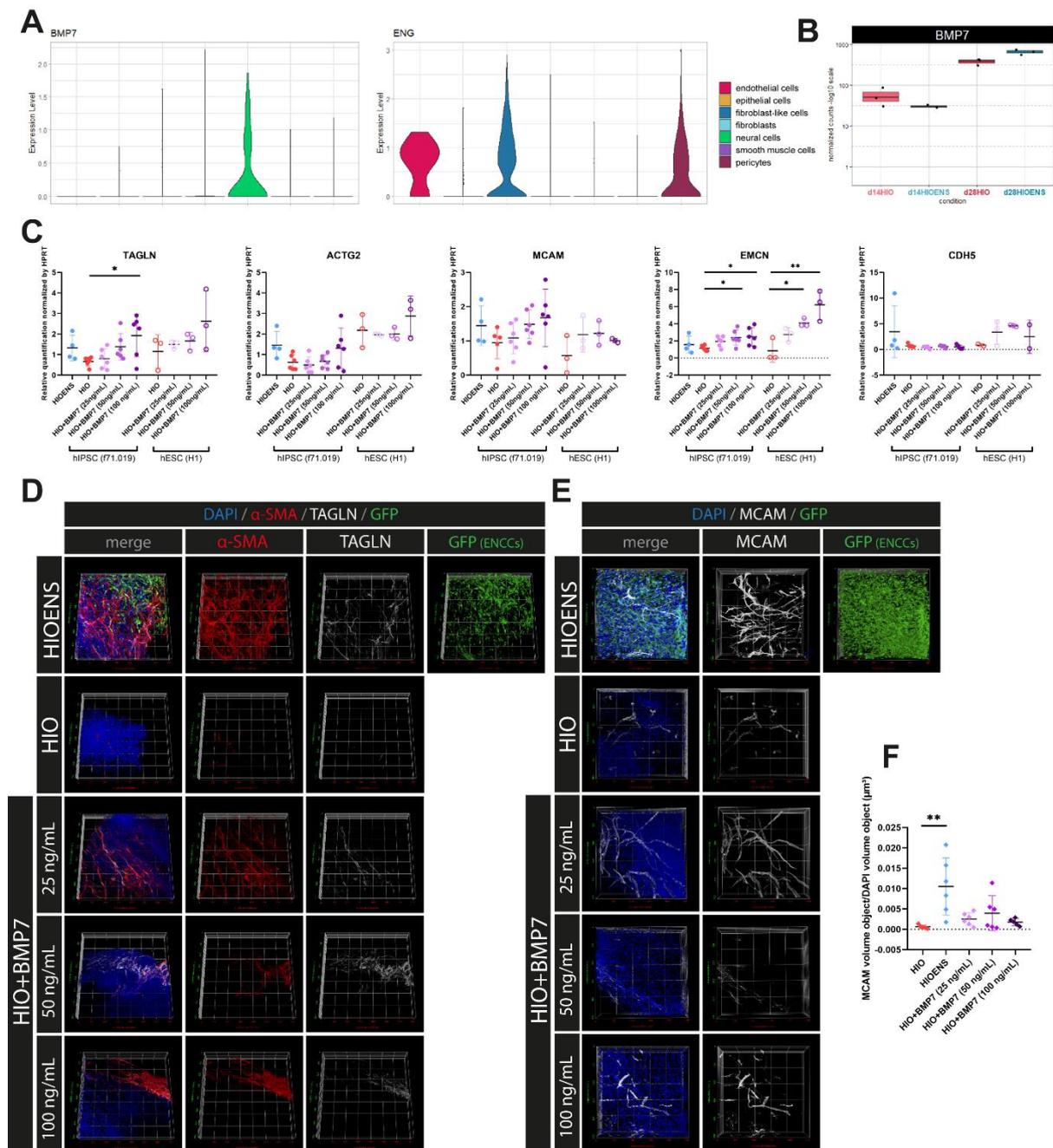
Supplemental Figure S1B). FACS immunostaining for CD36 (a receptor expressed by the pericytes), CD144 (endothelial cells), as well as colocalization analysis of whole-mount immunostaining for  $\alpha$ -SMA in HIO+ENS containing GFP-expressing vNCCs, indicated that vNCCs do not contribute to these populations (supplemental figure S2). Altogether, these results demonstrate that the presence of the ENS enhanced vascular and muscular populations in the mesenchyme of HIOs.



**Figure 3: Identification of mesenchymal cell populations in HIO and HIO+ENS.** UMAP of integrated dataset of HIO and HIO+ENS associated with the fetal gut dataset. (F6-7 : fetal intestine at post-conceptual week 6 to 7; F7-8 : week 7 to 8; F9-10 : week 9 to 10). **A.** Colored by condition **B.** Colored by identified cell type **C.** Colored by cell type with datasets (HIO, HIO+ENS, fetal data) separated.

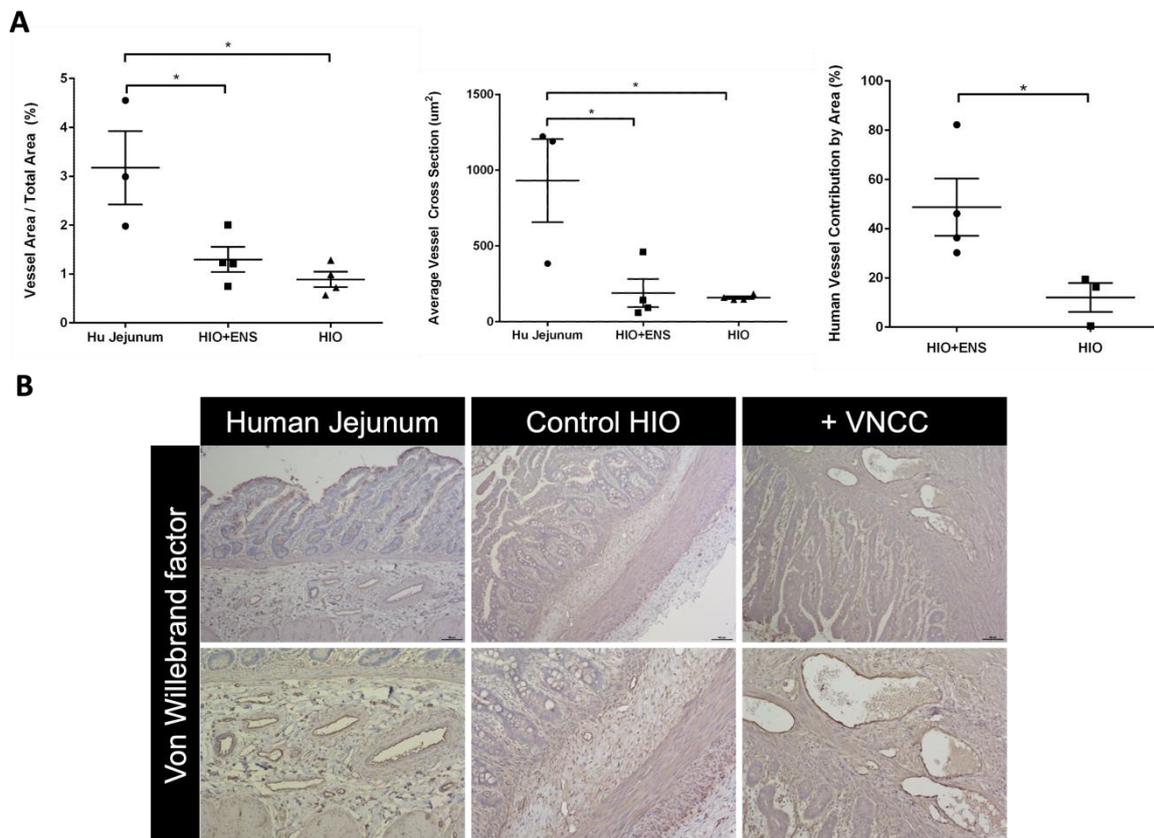
*BMP signaling participate to vascular and muscular development in the HIO mesenchyme.*

Next, we aimed to identify by which signaling pathway the developing ENS might influence the development of mesenchymal cell populations. We co-analyzed signaling molecules produced by the neural cluster and receptors that were expressed in the mesenchyme in the HIO+ENS single-cell RNAseq data (table S3). We detected the expression of BMP7 (average  $\log_2\text{FoldChange} = 0.599$ , adjusted p value =  $1,08 \cdot 10^{60}$ ), while one of its accessory receptors, endoglin (ENG) was expressed in the mesenchyme (Figure 4A). We therefore cultivated HIOs and exposed them to varying concentrations (25, 50 and 100 ng/mL) of recombinant BMP7 in the culture media between 14 and 28 days of culture. We chose this timeline as BMP7 expression appeared between 14 and 28 days as seen in the bulk RNAseq data (Figure 4B). We then ascertained expression of target genes of vascular and muscular cell populations previously detected. We found a significant increase of the expression of TAGLN and EMCN, as well as non-significant increase in MCAM (p-value for HIO vs HIO+BMP7.100ng/mL : 0.1459) and ACTG2 (p value for HIO vs HIO+BMP7.100ng/mL : 0.1747) (Figure 4C). Whole-mount immunostaining showed similar results with an increase in TAGLN and  $\alpha$ -SMA (z-stack 3D representation shown in Figure 4D, whole-organoid single Z images in Supp. Figure 3D); MCAM expression was heterogenous (Figure 4E) but increased in HIO+ENS as shown upon quantification (Figure 4F). TAGLN and  $\alpha$ -SMA were expressed in the outermost part of the organoids' mesenchyme, which is consistent with TAGLN staining in early human fetal intestine<sup>24</sup>. These results therefore reinforce the role of BMP signaling and, in particular BMP7, in patterning of the mesenchymal cell types.



**Figure 4 : BMP7 expression in sequencing data of HIO/HIO+ENS and muscular and vascular targets in HIOs cultivated with recombinant BMP7. A.** Violin plot of BMP7 and ENG in HIO+ENS single-cell RNAseq data. **B.** Box plot of BMP7 expression in bulk RNAseq of HIO and HIO+ENS at 28 days of culture; **C.** RT-qPCR of target genes that were found to be expressed in the scRNAseq data in smooth muscle (ACTG2, TAGLN, pericytes (TAGLN, MCAM), fibroblast-like (EMCN) or endothelial cells (CDH5) \* : p-value < 0.05; \*\* : p-value < 0.005 (one-way ANOVA. **D.** Whole-mount immunostaining of HIO, HIO+ENS, and HIO cultured with different concentrations of BMP7, for sm22 (Tagln) and  $\alpha$ -SMA (ACTA2). **E.** Whole-mount immunostaining of HIO, HIO+ENS, and HIO cultured with different concentrations of BMP7, for MCAM. **F.** Quantification of MCAM staining, normalized by DAPI quantification. \*\* : p-value < 0.005 (one-way ANOVA)

Transplanted HIO+ENS have a higher number of native human blood vessels compared to HIOs. While HIOs *in vitro* are fetal in nature, it is possible to further their maturation by transplanting them into immunosuppressed mice, as described in previous studies<sup>25</sup>. We examined whether HIO containing ENS would develop more mesenchymal derivatives such as vessels. We transplanted HIO+ENS under the kidney capsule of NSG mice. 8-10 weeks following surgery, HIO+ENS developed into an architecturally mature intestine. We looked at the expression of human vasculature within these transplants and found that human vascular contribution to the HIO was significantly increased (Figure 5 A-B) suggesting that the ENS promote vascular progenitor cells within HIO mesenchyme.



**Figure 5 : Vasculature in transplanted HIO and HIO+ENS. A.** Data plotted  $\pm$ SEM. Three biological samples each, >100 CD31+ vessels measured per sample (Student t-test with Welch's Correction,  $p=0.443$ ). **B.** Von Willebrand factor immunostaining in adult human jejunum, HIO and HIO+ENS

## Discussion:

In this study, we used HIOs without and with an ENS to ascertain how ENS progenitors affect development of the intestinal mesenchyme. Combining bulk and single-cell RNA sequencing, we found that human intestinal organoids with an ENS (HIO+ENS) developed vascular populations (pericytes) *in vitro* that were scantily present in HIOs, as well as a higher number of smooth muscle cells. We also found a higher degree of endogenous vascular cells in HIO+ENS when transplanted in immunocompromised mice. Taken together, these data suggest a patterning role for the developing ENS on the differentiation and maturation of the intestinal mesenchyme. These data are consistent with previous studies in the chick stomach<sup>10</sup>, although region-specific patterns in development of the digestive system are to be expected.

We proposed that this effect of ENS cells is at least, in part mediated through BMP signaling. We showed that ENS cells in the scRNAseq data produced BMP7, and culture of HIOs with BMP7 increased the expression of muscular and vascular genes. BMPs, in particular Bmp4, have previously been identified as repressors of smooth muscle development, and are expressed in intestinal mesenchyme in a spatial-dependent manner as a way to control smooth muscle layer positioning and therefore structural development of the gut tube tunics<sup>26</sup>. This study also suggested that BMPs produced by the outer mesenchyme might similarly repress muscle differentiation thereby influencing the positioning of longitudinal muscle. BMPs pathways in the developing intestines are in all likelihood and multifunctional, and pattern effects are probably dependent on stages of differentiation of target cell types, region of the gut tube, and/or species-specific mechanisms.

The interactions taking place between the enteric neural crest and the mesenchyme which they colonize ought to be dependent on multiple pathways. The Faure et al. study identified the Notch pathway as an effector of ENCCs patterning on stomach muscle<sup>10</sup>. ENCCs secrete numerous ligands whose receptors are expressed on mesenchymal cells, and also massively remodel the ECM during their migration<sup>27</sup>, which could impact differentiation of mesenchymal cell types. On a more global note, the neural crest has been previously characterized as an organizer of vertebrate development and evolution, particularly because of its role in shaping the vertebrate head<sup>28</sup>. Previous studies outside of the cranial neural crest, for example in the chick's somites<sup>14</sup>, and stomach<sup>10</sup>, have highlighted the role of neural crest cells for patterning of other cell types. These observations taken with our results can point to the neural crest as a global organizer of the vertebrate body plan. Ultimately, understanding the ways in which the neural crest interacts with its environment during migration and colonization is of interest in the context of development neurocristopathies (pathologies affecting the neural

crest); mainly Hirschsprung's disease in the case of the enteric neural crest. It would therefore be useful to assess muscle and vascular development in Hirschsprung patients.

Our study also points to the usefulness of using *in vitro* grown hPSC-derived tissues to study human development specifically, as previous studies have also mostly been conducted in animal models - leaving open questions about transferability to human physiology and pathology. Finally, this work highlights possible avenues to further differentiation of the musculature and vasculature in intestinal organoids. HIOs grown *in vitro* have a fetal-like phenotype <sup>29</sup>, and a common goal of the stem cell engineering field has been to further maturation of *in vitro* tissues, both to replicate *in vivo* development as best as possible, and to make way towards regenerative medicine. As the field moves forward in building mature tissues *in vitro*, there is a particularly strong need to build tissues with a vascular system, to render these tissues transplantable.

## Methods:

### Human Pluripotent Stem Cell and Organoid cultures

#### Cell lines :

Human embryonic stem cells (hESCs) of cell line H1 (H1, also known as WA-01; WiCell Research Institute, Inc.) were used for generating HIOs used in the RNAseq and single-cell RNAseq analysis, and HIO cultures with BMP7. Induced human pluripotent stem cells (hiPSCs) of cell line f71.019 <sup>30</sup> and f71.019.GFP (produced by the Nantes IPS core) were used for RT-qPCR, immunostainings, flow cytometry and HIO cultures with BMP7.

#### hiPSCs culture (feeder-free conditions) :

hiPSCs were grown in 6-wells plates previously coated with Matrigel® (hESC-Qualified, LDEV-free, Corning). Cells were maintained in mTESR1 culture medium (Stem Cell Technologies) for 5 to 7 days with daily media change and picking of differentiated colonies and passaged with XF passaging solution (Miltenyi Biotec) when they reached 70-80% confluence.

#### Vagal neural crest cells (vNCCs) differentiation:

Near-confluent hiPSCs were dissociated with Accutase (Stem Cell Technologies) for 5 min at 37°C and resuspended in a 24-well Agrewell® 800 plate at a density of  $1.2 \cdot 10^6$  cells (4000 cells per microwell), in Neurobasal differentiation medium (50:50 DMEM/F12-Milieu Neurobasal, Glutamax, B27 0.5X, N2 0.5X, insulin 5 µg/mL (Gibco), 20ng/mL FGF2, 20ng/mL EGF), supplemented with 10 µM ROCK inhibitor Y-27632 (ROCKi; Tocris Bioscience). Cells were further cultivated for 6 days with Neurobasal differentiation media (daily change). Media was supplemented with 2 µM Retinoic Acid (RA) on day 5 and 6. On day 7, neurospheres were

collected and seeded on fibronectin-coated (1.5µg/mL, RnD Systems) 6-well plates in Neurobasal Differentiation medium. After 4 days of culture with daily media change, cells migrating away from neural rosettes formed by neurospheres were detached with Accutase for 2 minutes at 37°C and seeded on fibronectin-coated 6-well plates to be cultivated and expanded in Neurobasal Differentiation medium for 4 additional days.

#### **Intestinal spheroid differentiation:**

Near-confluent hPSCs were dissociated with Accutase (Stem Cell Technologies) for 5 min at 37°C and resuspended in mTESR1 supplemented with 10 µM ROCK inhibitor, at a density of 100 000 cells per well in a 24-wells plate previously coated with Matrigel® (ES grade; Corning). HPSCs were cultured with mTESR1 for day 1 and 2, as to expand them to a confluent state, and subsequently differentiated into definitive endoderm, with endoderm Differentiation Media on days 3 to 5 (RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA and 100 ng/mL Activin A, and supplemented with dFBS on days 4 and 5 (0.2% on day 4 and 2% on day 5). Finally the cultures were differentiated into intestinal tissue with Midgut Differentiation Media (RPMI Media 1640 supplemented with 1X NEAA, 2% dFBS, 500 ng/mL FGF4 and 3µM Chiron), on days 6 to 9.

#### **Human Intestinal Organoids (HIOs) and innervated Human Intestinal Organoid (HIO+ENS) culture :**

For HIOs, intestinal spheroids were collected on day 10 of differentiation and embedded in a 40 µL drop of Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (GFR, LDEV-free, Corning), in a Nunclon Delta 24-well plate (ThermoFisher).

For HIO+ENS : vNCCs were dissociated at day 14 of differentiation with Accutase (2 minutes at 37°C), and intestinal spheroids were collected on day 10 of differentiation. Spheroids and vNCCs were resuspended together in a 40 µL drop of Matrigel GFR in a Nunclon Delta 24-well plate.

HIO and HIO+ENS were both subsequently cultivated in Minigut Media (Advanced DMEM/F-12 supplemented with 1X B27 and 1X N2 supplements, 10mM HEPES, 2mM GlutaMAX, 100 U/mL Penicillin-Streptomycin and 50 ng/mL EGF) for 28 days with bi-weekly media change. At 14 days of culture, organoids were dissected as to remove remaining Matrigel and as to separate closely growing organoids, and embedded in fresh Matrigel GFR drops.

#### **HIO culture with recombinant BMP7 :**

HIOs were produced from ips (n = 6) and H1 ES cells (n = 3), cultivated under normal conditions from day 0 to 13, and with varying concentration of BMP7 (Preprotech, 120-03P) from day 14 to 28, then fixed for immunofluorescent staining of lysed for RT-qPCR.

**HIO transplantation under renal capsule :**

Adult immune-deficient NSG mice with ages between day of life 56 and 84 were used in all experiments (Comprehensive Mouse and Cancer Core Facility, Cincinnati, Ohio). Mice were housed in CCHMC's pathogen-free animal vivarium and handled humanely in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NSG mice were fed antibiotic chow (275 p.p.m. Sulfamethoxazole and 1,365 p.p.m. Trimethoprim; Test Diet). Both food and water were provided ad libitum before and after surgeries. All experiments were performed with the prior approval of CCHMC's Institutional Animal Care and Use Committee (Signaling Pathways associated with Intestinal Stem Cell Expansion, Protocol No. 2016-0014). HIOs were prepared for transplantation as previously described<sup>31</sup>. Briefly, single Matrigel embedded HIOs were transplanted into the mesentery of the mice at the most distal arcade before the ileocecal junction. Mice were anesthetized with 2% inhaled isoflurane (Butler Schein), and the abdomen shaved and prepped in sterile fashion using isopropyl alcohol and povidine-iodine. A 2 cm midline incision was made and approximately 4 cm of the intestines pulled out. A small pocket was created in the mesentery and the HIO placed within. The abdominal cavity was irrigated with normal saline with Zosyn (2 mg/ml; Pfizer Inc.) and the intestine placed back within the abdominal cavity. The abdominal wall muscles and skin were then closed in a double layer fashion and the mice were given a subcutaneous injection of Buprenex (0.05 mg/kg; Midwest Veterinary Supply) for pain management.

**Bulk and Single-cell Sequencing****Extraction and bulk-RNAseq sequencing of spheroids, HIO and HIO+ENS :**

This dataset contains intestinal spheroids (n = 3), HIO (n = 3) and HIO+ENS (n = 2) at 14 days of culture, HIO (n = 3) and HIO+ENS (n = 3) at 28 days of culture. Total RNA contents were extracted from the samples using Qiagen's RNeasy Plus Micro Kit according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by the DNA Sequencing and Genotyping core for Next Generation Sequencing at Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH, USA. RNA quality was tested with an agilent bioanalyzer to select samples with a RIN > 8 (RNA integrity number). mRNA were enriched by PolyA positive selection and cDNA libraries were created for each sample (Truseq3, Illumina). Samples were sequenced with an Illumina HiSeq2000 sequencing system with a sequencing depth of 30 million reads per sample.

**Dissociation, FACS sorting and single-cell sequencing of HIO and HIO+ENS :**

HIO and HIO+ENS were dissociated using Miltenyi's Multi Tissue Dissociation kit 3 at room temperature for 10 minutes (Miltenyi Biotec, 130-110-204). Dissociated cells were filtered and incubated with Live/Dead dye (Life Technologies). Live cells were sorted out using a FACS Aria in sorting buffer before being loaded onto the 10X chromium platform. Single-cell droplets were

immediately prepared according to manufacturer instructions by Genomics Core at CCHMC, with a target of capturing 5,000-10,000 cells. Single-cell libraries were prepared using the 10x Chromium Single Cell 30 v2 and Next GEM Single Cell 30 v3.1 kits according to manufacturer instructions.

#### **Assessment of human blood vessels in transplanted HIOs :**

Segments of tHIO and tHIO+ENS grafts were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA), processed, and embedded in paraffin. Sections of 5µm thickness were deparaffinized and subjected to antigen retrieval and stained. For both primary and secondary antibodies, incubations took place at 4°C overnight in 1% bovine serum albumin in phosphate buffered saline (PBS). The Vectastain ABC system (Vector Laboratories) was used for amplification. The following kits were used for signal detection: diaminobenzidine substrate kit. Lillie-Mayer's Hematoxylin (Dako North America, Inc.) was used as a counterstain. Images were acquired using a Nikon Eclipse Ti microscope and analyzed using Nikon Elements Imaging Software (Nikon).

#### **Immunostainings**

**Fixation :** HIOs were fixed by incubation with 2% PFA for 2 hours at 4°C, then washed 3 times with DPBS/0.75% Glycine and stored at 4% in DPBS/1%NaN<sub>3</sub>

#### **Staining (whole-mount organoids) :**

Organoids were permeabilized overnight in PBS/1%TritonX-100, then washed 3 times with IF wash solution (DPBS/0.1%BSA/0.2%TritonX-100/0.05%Tween20), and incubated for 2 hours in blocking solution (IF wash solution + 10% Horse serum) at RT under agitation. Organoids were then stained overnight at 4°C under agitation with primary antibodies. The next day, organoids were washed 3 times with IF wash solution, then incubated with secondary antibodies for 1 hour at RT. Organoids were washed again and then incubated with DAPI for 20 min at RT under agitation. Organoids were washed and finally transparented with RapiClear (SunjinLab, 2SUN0005) for 1 hour under agitation. Organoids were mounted using rapiclear and ispacers (SunjinLab, 2SUN1022). Whole mount stainings were imaged using Nikon's LFOV FLIM confocal microscope at the MicroPicell core facility with 25X silicone immersion lens. 3D z-stack were produced with Icy's 3D VTK visualization and whole organoids images were produced with Fiji. Colocalization analysis was done with Icy's correlation studio (correlation analysis adapted from Lagache 2015<sup>32</sup>).

For MCAM-cy5 quantifications, HIO, HIO+ENS, and HIOs cultivated with BMP7 were imaged (n = 3, 2 408 µm z-stack of 2765x2765µm per organoid), quantification of MCAM staining and DAPI were produced with Nikon's NIS-Element software. MCAM volume was normalized with DAPI

staining to verify cellular density. Visualization and statistical analysis (one-way ANOVA) were produced with GraphPad Prism 8.0.1.

### FACS immunostaining :

HIO and HIO+ENS were dissociated using Miltenyi's Multi Tissue Dissociation kit 3 (130-110-204), then dissociated cells were filtered and counted, washed, and incubated with antibodies for 30 minutes at 4°C. Flow cytometry data was measured with a BD Biosciences's Fortessa X20.

### RT-qPCR :

Total RNA was extracted from HIO samples using Nucleospin RNA II (Macherey Nagel) and the resulting RNAs were reverse transcribed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using a StepOne thermocycler with a FastSybr green master mix kit (Applied Biosystems) using probes listed in table X. The relative expression of the gene of interest was measured by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and normalized for the housekeeping gene HPRT. Visualization and statistical analysis (one-way ANOVA) was produced with GraphPad Prism 8.0.1.

Primers			
gene		Sequence (5'->3')	source
MCAM	Forward	CAGGAACTACTGGTGA ACTATGTGT	SigmaAldrich
	Reverse	ACCTGGCCTGTCTCTTCTCTC	SigmaAldrich
EMCN	Forward	CAACCAGCCGGTCTTATCCA	SigmaAldrich
	Reverse	TTCTGGTGTGCCCGGATCT	SigmaAldrich
ACTG2	Forward	TTGTGACCACAGCTGAGAGAGA	SigmaAldrich
	Reverse	CGGACTCCATGCCAATAAAGGA	SigmaAldrich
TAGLN	Forward	CTTTGAAGGCAAAGACATGGCA	SigmaAldrich
	Reverse	GCGCTTCTTCATAAACCCAGTTG	SigmaAldrich
CDH5	Forward	TGCCATCGATAATTCTGGACGTA	SigmaAldrich
	Reverse	CAAATGTGTACTTGGTCTGGGTG	SigmaAldrich

Antibodies		
Product	source	identifier
$\alpha$ -SMA	abcam	ab7817
Anti-TAGLN/Transgelin antibody	abcam	ab14106
Human MCAM/CD146 Antibody	abcam	AF932
CD144 (VE-cadherin) Monoclonal Antibody (16B1), PE-Cyanine7	Thermo Fisher Scientific	25-1449-42
CD36 Monoclonal Antibody (eBioNL07 (NL07)), PerCP-eFluor 710	Thermo Fisher Scientific	46-0369-42

**Bioinformatic analysis:****Bulk RNAseq :**

Quality control of sequenced data was performed using FastQC. Residual adapter sequences were cleaned using cutadapt (trim\_galore extension). Reads alignment to the human reference genome (hg37) was performed using hisat2. A read count matrix was obtained with FeatureCounts (of the Subread package). Following analysis were done using R. R code is available at the following address: [https://github.com/eLoffet/Loffet\\_2018](https://github.com/eLoffet/Loffet_2018). Differential expression analysis was produced with package DESeq2, Gene ontology analysis with ToppFun (<https://toppgene.cchmc.org/>) and R package GOplot. Lists of genes linked to Gene Ontologies were retrieved using <http://amigo.geneontology.org/amigo>

**Single-cell RNAseq :**

Reads alignment to human reference genome and generation of gene expression matrix were performed with 10x Genomics Cell Ranger software. Using R package Seurat (v3, (Butler et al 2018)), the data was filtered to exclude cells with fewer than 200 or higher than 5500 genes, or with a percentage of mitochondrial genes higher than 5%. Data was normalized and integrated with CCA (Canonical Correlation Analysis). The data was then scaled, with a regression of variation associated to cell cycle state. Principal Component Analysis (PCA) and Uniform manifold approximation and projection (UMAP) were then applied for dimension reduction. Louvain clustering was performed, and clusters were manually annotated depending on the top markers detected. Pseudotime analysis was performed on mesenchymal cells of HIO+ENS, using R package monocle3. Lists of ligands and receptors were obtained from the cell-cell interaction database (<https://baderlab.org/CellCellInteractions/>), and couples in which a ligand is a marker in the neural cluster, and receptor a marker in one of the mesodermal cluster were extracted.

The fetal intestinal data set was obtained from <https://www.gutcellatlas.org/> (Elmentaite 2020). Cells that had been identified by the authors as belonging to the "mesenchymal" and "vasculature" celltype, within cells identified as "duojejenum" and "ileum" were extracted, analysed with Seurat as per previously, and integrated with the HIO and HIOENS datasets with the rpca method. The data set contains cells from human embryos at post-conceptual week 6.1, 6.7, 6.9, 7.9, 8.4, 9.2, 9.9, 10 and 10.2: grouped into 6 to 7 (6.1, 6.7 and 6.9), 7 to 8 (7.9 and 8.4) and 9 to 10 (9.2, 9.9, 10 and 10.2) on graphics for convenience.

Detailed code can be found at the following address : <https://github.com/eLoffet/>

**Author Contributions**

E.L. and M.M.M. conceived and designed the study; E.L., L.B., H.M.P., N.B. and M.M.M. performed experiments and collected data; E.L. and L.B. generated HIOs; E.L., L.B. and M.M.M. analyzed data; E.L. and M.M.M. interpreted experimental findings; E.L. and M.M.M. prepared figures and drafted manuscript; J.M.W., M.A.H., M.N., and M.M.M. made critical revisions to the manuscript; all authors approved the manuscript's final version.

**Additional Information**

Correspondence and requests for materials should be addressed to Maxime M. Mahe: maxime.mahe@inserm.fr

**Competing Interests**

The authors do not have any competing or financial interests.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by ANR-17-CE14-0021 (SyNEDI to M.M.M.) and a "New Team" grant (BOGUS to M.M.M.) from the Bioregate Regenerative Medicine Cluster, University of Nantes and Région Pays de la Loire.

## Bibliography :

1. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–109 (2011).
2. McLin, V. A., Henning, S. J. & Jamrich, M. The Role of the Visceral Mesoderm in the Development of the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* **136**, 2074–2091 (2009).
3. Roberts, D. J., Goff, D. J., Tabin, C. J. & Smith, D. M. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* **125**, 2791–2801 (1998).
4. Walton, K. D., Freddo, A. M., Wang, S. & Gumucio, D. L. Generation of intestinal surface: An absorbing tale. *Dev.* **143**, 2261–2272 (2016).
5. Furness, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 286–294 (2012).
6. Hall, B. K. Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genesis* **56**, 1–9 (2018).
7. Goldstein, A., Hofstra, R. & Burns, A. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet* **6**, 247–253 (2013).
8. Szabó, A., Theveneau, E., Turan, M. & Mayor, R. Neural crest streaming as an emergent property of tissue interactions during morphogenesis. *PLoS Comput. Biol.* **15**, 1–21 (2019).
9. Uesaka, T., Nagashimada, M. & Enomoto, H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J. Neurosci.* **33**, 16372–16382 (2013).
10. Faure, S., McKey, J., Sagnol, S. & de Santa Barbara, P. Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation. *Development* **142**, 331–342 (2014).
11. Burns, a J. & Douarin, N. M. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* **125**, 4335–4347 (1998).
12. Bourret, A., Chauvet, N., de Santa Barbara, P. & Faure, S. Colonic mesenchyme differentiates into smooth muscle before its colonization by vagal enteric neural crest-derived cells in the chick embryo. *Cell Tissue Res.* **368**, 503–511 (2017).
13. Rinon, A. *et al.* Cranial neural crest cells regulate head muscle patterning and differentiation during vertebrate embryogenesis. *Development* **134**, 3065–3075 (2007).
14. Rios, A. C., Serralbo, O., Salgado, D. & Marcelle, C. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* **473**, 532–535 (2011).
15. Workman, M. J. *et al.* Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat. Med.* **23**, 49–59 (2017).
16. Loffet, E., Brossard, L. & Mahe, M. M. Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system. *Hum. Pluripotent Stem Cell Deriv. Organoid Model.* 1–25

- (2020) doi:10.1016/bs.mcb.2020.04.012.
17. Li, L., Miano, J. M., Cserjesi, P. & Olson, E. N. SM22a, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ. Res.* **78**, 188–195 (1996).
  18. Ludolph, D. C. & Konieczny, S. F. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J.* **9**, 1595–1604 (1995).
  19. Guo, L. *et al.* gga-mir-133a-3p Regulates Myoblasts Proliferation and Differentiation by Targeting PRRX1. *Front. Genet.* **9**, (2018).
  20. Ihida-Stansbury, K. *et al.* Paired-related homeobox gene Prx1 is required for pulmonary vascular development. *Circ. Res.* **94**, 1507–1514 (2004).
  21. Holloway, E. M. *et al.* Differentiation of human intestinal organoids with endogenous vascular endothelial cells. *Dev. Cell* **54**, (2020).
  22. Nguyen, P. D. *et al.* Muscle Stem Cells Undergo Extensive Clonal Drift during Tissue Growth via Meox1-Mediated Induction of G2 Cell-Cycle Arrest. *Cell Stem Cell* **21**, 107–119.e6 (2017).
  23. Elmentaite, R. *et al.* Single-Cell Sequencing of Developing Human Gut Reveals Transcriptional Links to Childhood Crohn's Disease. *Dev. Cell* **55**, 771–783.e5 (2020).
  24. Holloway, E. M. *et al.* Mapping Development of the Human Intestinal Niche at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell* **28**, 568–580.e4 (2021).
  25. Maxime, M. M., Brown, N. E., Poling, H. M. & Michael, H. A. In Vivo Model of Small Intestine. *Organ Regen. 3D Stem Cell Cult. Manip. Methods Mol. Biol.* **1597**, 229 (2017).
  26. Huycke, T. R. *et al.* Genetic and mechanical regulation of intestinal smooth muscle development. *Cell* **179**, 90–105.e21 (2019).
  27. Chevalier, N. R. *et al.* How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci. Rep.* **6**, 1–18 (2016).
  28. Gans, C. & Northcutt, R. G. Neural crest and the origin of vertebrates: A new head. *Science (80-. ).* **220**, 268–274 (1983).
  29. Finkbeiner, S. R. *et al.* Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports* **4**, 1140–1155 (2015).
  30. Gaignerie, A. *et al.* Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Sci. Rep.* **8**, 2–11 (2018).
  31. Watson, C. L. *et al.* An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1310–1314 (2014).
  32. Lagache, T., Sauvonnnet, N., Danglot, L. & Olivo-Marin, J. C. Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytom. Part A* **87**, 568–579 (2015).

## Supplemental figures and data :

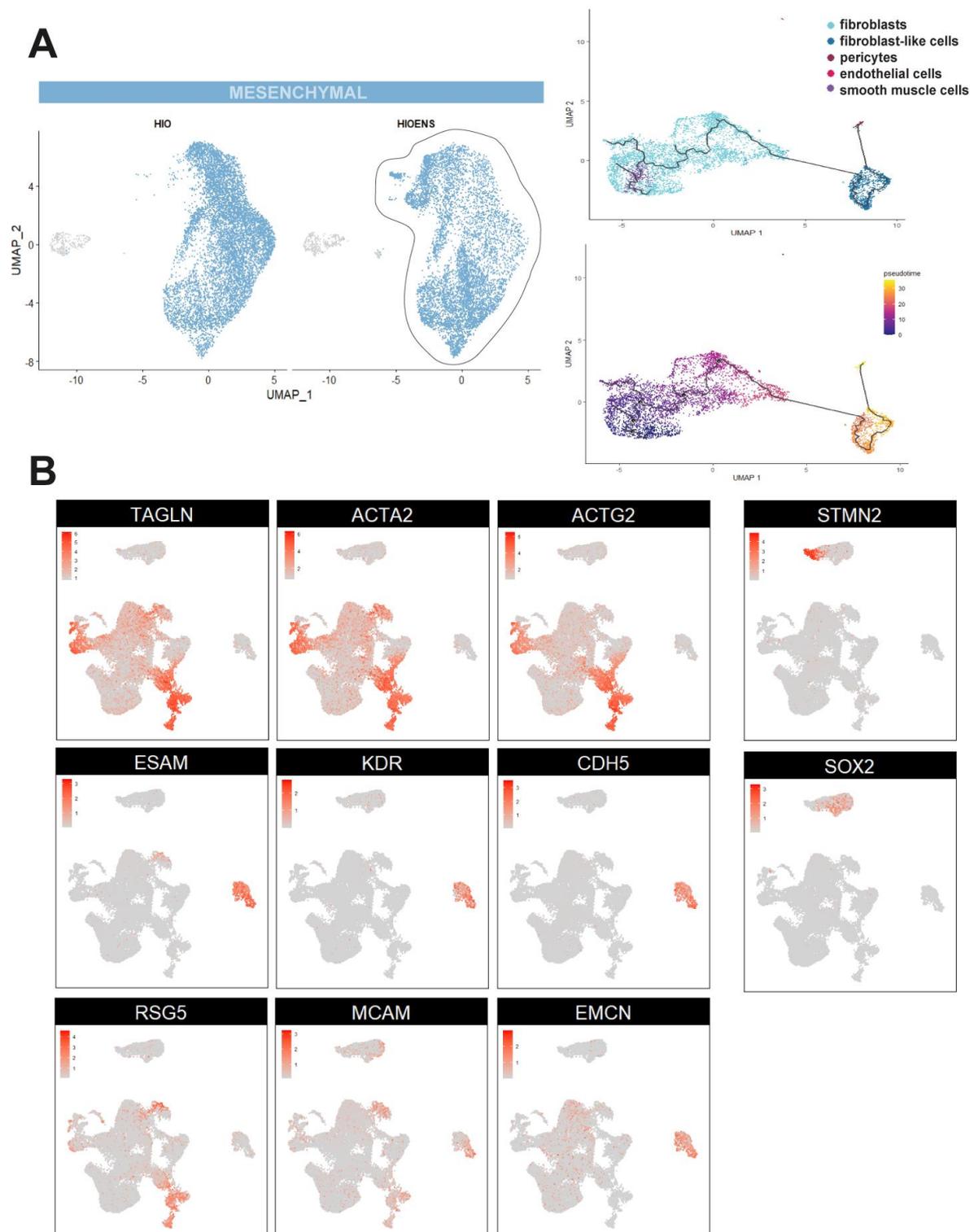


Figure S1 : Single-cell pseudotime trajectory and top 10 cluster markers

A. Isolation of mesenchymal cells in HIO+ENS and pseudotime analysis

B. Target genes in HIO+HIOENS single-cell data integrated with human fetal intestinal data set

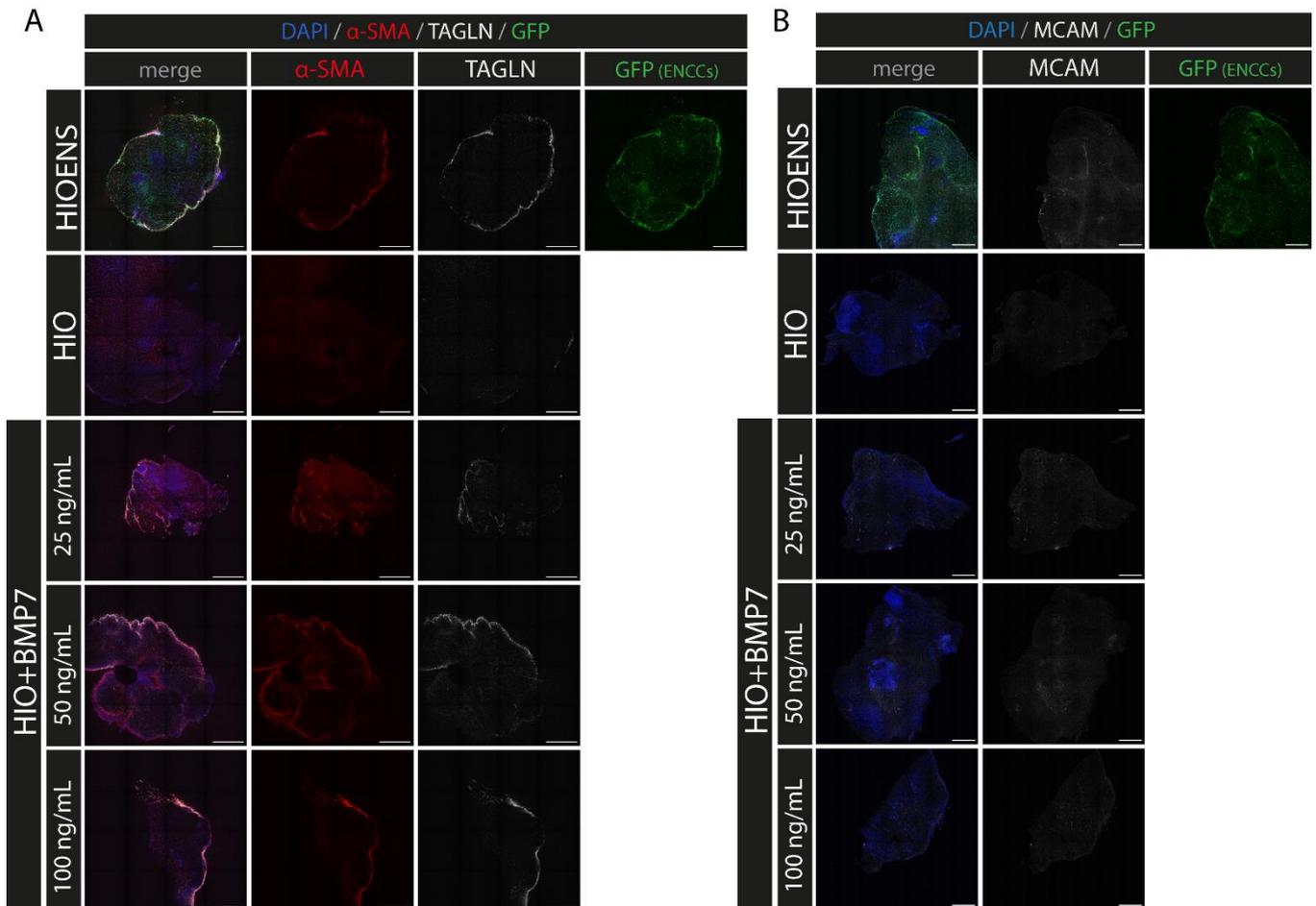


Figure S2 (whole-organoid whole mount stainings) :

A. Whole-mount immunostaining of HIO, HIO+ENS, and HIO cultured with different concentrations of BMP7, for sm22 (Tagln) and  $\alpha$ -SMA (ACTA2)

B. Whole-mount immunostaining of HIO, HIO+ENS, and HIO cultured with different concentrations of BMP7, for MCAM.

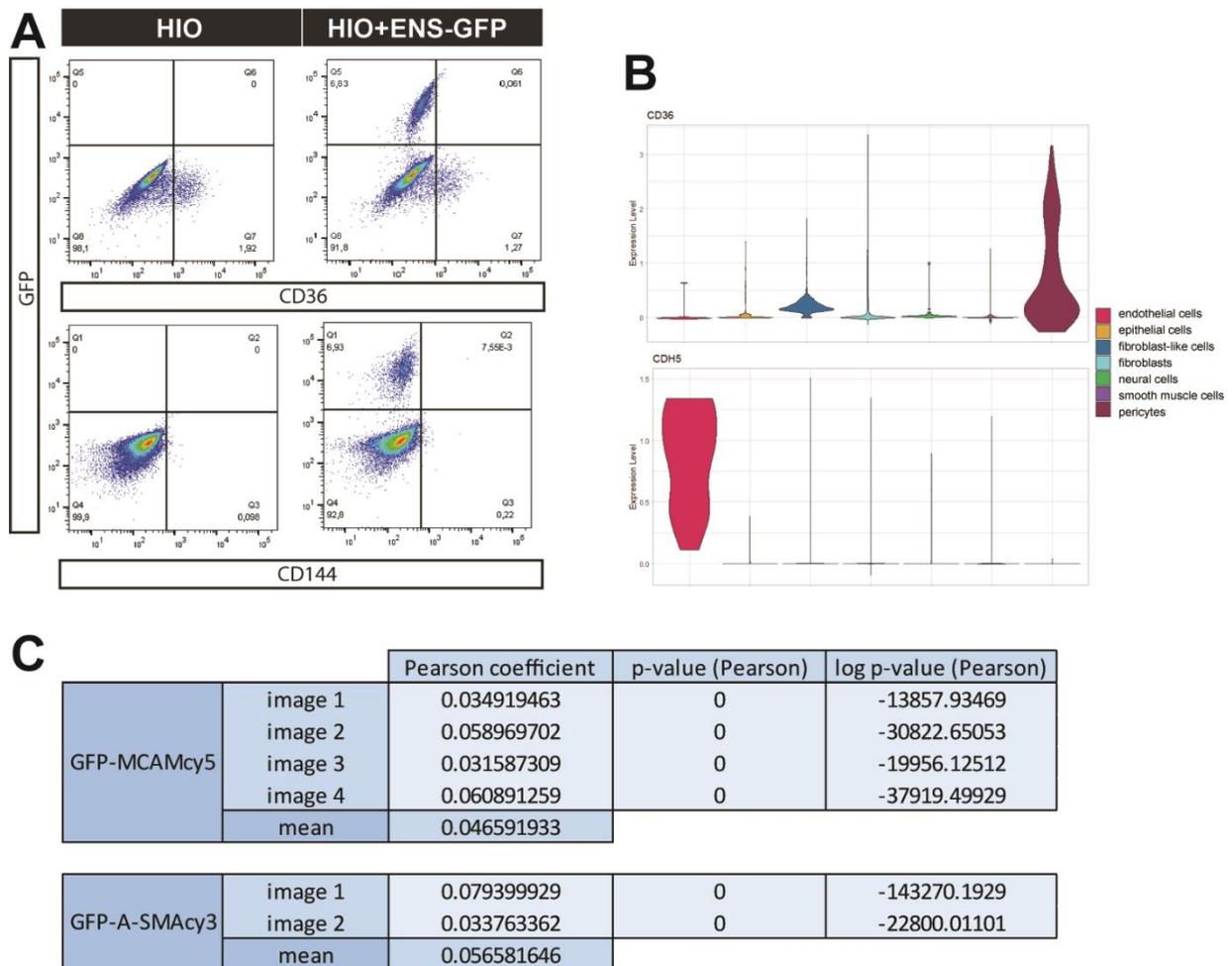


Figure S3 (FACS sorting and colocalization study) :

A. FACS sorting of HIO and HIOENS for endothelial (CD144 (CDH5 - ve-cadherin)) and vascular (CD36)

B. Expression of CD144 (CDH5 - ve-cadherin) and CD36 in single-cell data

C. Colocalization scores as established by Pearson correlation between GFP (vNCC derives cells) and MCAM-c5 or ASMA-cy3 stainings in whole-mount immunostaining of HIO+ENS(GFP)

Table S1 : (available upon request)

Genes differentially expressed in bulk RNA sequencing of HIO vs HIO+ENS at 28 days of *in vitro* culture.

cluster	gene	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
fibroblasts	<b>LUM</b>	0	1.33354975	0.975	0.959	0
fibroblasts	<b>PLAT</b>	0	1.22794758	0.98	0.944	0
fibroblasts	<b>DCN</b>	0	0.86285134	0.973	0.94	0
fibroblasts	<b>COL3A1</b>	5.34E-295	0.7290727	0.996	0.97	1.07E-291
fibroblasts	<b>IGFBP3</b>	1.76E-252	1.39322318	0.959	0.962	3.52E-249
fibroblasts	<b>PTN</b>	1.71E-248	0.88802201	0.989	0.982	3.41E-245
fibroblasts	<b>FHL2</b>	9.69E-183	0.96137867	0.801	0.738	1.94E-179
fibroblasts	<b>SPON2</b>	1.32E-115	0.84699271	0.537	0.482	2.64E-112
fibroblasts	<b>ASPN</b>	1.01E-94	0.86090712	0.701	0.785	2.02E-91
fibroblasts	<b>SOSTDC1</b>	1.73791E-56	0.80328288	0.757	0.818	3.47583E-53
fibroblast-like	<b>ANXA1</b>	2.28E-213	0.91638599	0.934	0.51	4.56E-210
fibroblast-like	<b>APOE</b>	2.06E-190	1.1228439	0.978	0.751	4.11E-187
fibroblast-like	<b>PCOLCE</b>	1.62E-177	0.87059767	0.976	0.838	3.24E-174
fibroblast-like	<b>BGN</b>	9.94E-162	0.91303365	0.889	0.467	1.99E-158
fibroblast-like	<b>SFRP2</b>	4.67E-159	1.04327001	0.866	0.477	9.35E-156
fibroblast-like	<b>IGFBP6</b>	1.99E-137	1.15794267	0.836	0.479	3.98E-134
fibroblast-like	<b>CLU</b>	7.72E-110	0.94174697	0.946	0.685	1.54E-106
fibroblast-like	<b>MGP</b>	2.12E-94	2.32223808	0.747	0.393	4.25E-91
fibroblast-like	<b>DKK1</b>	4.12E-82	0.92241048	0.263	0.032	8.25E-79
fibroblast-like	<b>APOD</b>	1.08265E-51	0.91398571	0.341	0.058	2.1653E-48
epithelial	<b>CKB</b>	0	5.25427207	0.996	0.445	0
epithelial	<b>SERPINA1</b>	0	5.22081708	1	0.306	0
epithelial	<b>APOA1</b>	0	5.15610271	0.981	0.447	0
epithelial	<b>AGR2</b>	0	4.16786868	0.996	0.392	0
epithelial	<b>KRT19</b>	0	4.13235178	0.996	0.294	0
epithelial	<b>FXYD3</b>	0	3.5663007	0.994	0.256	0
epithelial	<b>S100A10</b>	0	3.53793416	0.998	0.389	0
epithelial	<b>EPCAM</b>	0	3.1380821	0.994	0.22	0
epithelial	<b>AMBIP</b>	0	3.11318069	0.978	0.275	0
epithelial	<b>LCN15</b>	2.1574E-287	4.55706024	0.916	0.276	4.3148E-284
smooth muscle	<b>ACTG2</b>	0	3.56000136	0.998	0.306	0
smooth muscle	<b>MYLK</b>	4.35E-264	2.87592468	0.956	0.485	8.69E-261
smooth muscle	<b>PTPLA</b>	6.79E-223	1.61748694	0.837	0.209	1.36E-219
smooth muscle	<b>MYL9</b>	1.10E-194	1.7883216	0.986	0.732	2.20E-191
smooth muscle	<b>TPM1</b>	1.72E-182	1.55815061	0.994	0.855	3.45E-179
smooth muscle	<b>PRL</b>	8.90E-131	2.0108988	0.729	0.192	1.78E-127
smooth muscle	<b>HAND1</b>	1.15E-114	1.56428646	0.759	0.301	2.31E-111
smooth muscle	<b>ACTA2</b>	8.71E-105	2.42522981	0.884	0.742	1.74E-101
smooth muscle	<b>DES</b>	3.00E-99	1.46020362	0.733	0.279	6.01E-96
smooth muscle	<b>TERF1</b>	1.62511E-80	1.22777354	0.859	0.674	3.25022E-77
pericyte	<b>IGFBP7</b>	1.33E-63	1.80961662	0.971	0.676	2.65E-60
pericyte	<b>HES4</b>	7.90E-58	1.51831347	0.872	0.217	1.58E-54
pericyte	<b>TAGLN</b>	1.19E-49	1.66088195	0.895	0.37	2.38E-46
pericyte	<b>FABP5</b>	1.59E-39	1.51214576	0.872	0.42	3.17E-36
pericyte	<b>MEF2C</b>	1.83E-31	1.37831727	0.75	0.242	3.65E-28
pericyte	<b>CD36</b>	1.32E-30	1.33755188	0.866	0.51	2.63E-27

pericyte	<b>RGS5</b>	7.05E-29	1.5384033	0.733	0.183	1.41E-25
pericyte	<b>ACTA2</b>	2.09E-21	1.50116607	0.872	0.745	4.18E-18
pericyte	<b>FABP4</b>	1.00E-08	1.76390876	0.36	0.058	2.00E-05
pericyte	<b>MMP9</b>	0.009162873	1.81481319	0.43	0.12	1
neural	<b>RTN1</b>	1.72E-100	2.332652	0.972	0.056	3.45E-97
neural	<b>HES6</b>	6.37E-31	2.8696847	0.972	0.405	1.27E-27
neural	<b>TUBB2B</b>	3.76E-30	3.15122678	0.889	0.223	7.53E-27
neural	<b>TUBA1A</b>	6.60E-24	2.74532525	1	0.976	1.32E-20
neural	<b>STMN2</b>	1.87E-22	4.00072716	0.764	0.135	3.73E-19
neural	<b>MAP1B</b>	3.55E-22	2.47930116	0.889	0.484	7.11E-19
neural	<b>CHGA</b>	2.00E-18	1.96917299	0.778	0.375	4.00E-15
neural	<b>TUBB2A</b>	2.31E-06	1.91909607	0.708	0.349	0.004617521
neural	<b>S100B</b>	3.61E-06	2.10971728	0.361	0.026	0.007223102
neural	<b>NNAT</b>	0.000303527	1.84242019	0.708	0.46	0.607053191
endothelial	<b>ESM1</b>	1.06E-114	2.70565236	1	0	2.13E-111
endothelial	<b>RNASE1</b>	3.22E-35	2.56761649	1	0.063	6.45E-32
endothelial	<b>CLDN5</b>	4.60E-22	4.04272802	1	0.043	9.20E-19
endothelial	<b>IL32</b>	6.42E-18	3.20707068	1	0.164	1.28E-14
endothelial	<b>PLVAP</b>	4.43E-17	2.63170766	1	0.18	8.85E-14
endothelial	<b>TP53I11</b>	1.52E-13	2.55161948	1	0.317	3.05E-10
endothelial	<b>PGF</b>	4.49E-13	3.30202253	1	0.351	8.97E-10
endothelial	<b>GNG11</b>	1.29E-12	2.50628102	1	0.779	2.58E-09
endothelial	<b>HLA-B</b>	5.31E-10	2.71041189	0.941	0.301	1.06E-06
endothelial	<b>S100A6</b>	3.73E-07	2.48630002	0.882	0.385	0.000745122

Table S2 :

Top 10 cluster markers of identified clusters in concatenated HIO/HIO+ENS single-cell RNAseq data. Avg\_log2FC : average log2 fold change of gene expression between selected cluster and all other cells, pct.1 : percentage of cells where the feature is detected in selected clusters, pct.2 : percentage of cells where the feature is detected in all other cells.

ligand_neural cells	receptor_mesenchyme	cluster_meso
CST3	APOE	pericytes
CST3	APOE	fibroblast-like
CST3	SLC1A5	endothelial
PLTP	APOE	pericytes
PLTP	APOE	fibroblast-like
PLTP	ANXA2	pericytes
PLTP	ANXA2	fibroblast-like
PLTP	ANXA2	endothelial
PLTP	PLAUR	pericytes
ALDOA	ANXA2	pericytes
ALDOA	ANXA2	fibroblast-like
ALDOA	ANXA2	endothelial
CLU	ANXA2	pericytes

CLU	ANXA2	fibroblast-like
CLU	ANXA2	endothelial
CLU	PPARG	pericytes
CLU	CD36	pericytes
CLU	ATP1B3	pericytes
HTRA1	ANXA2	pericytes
HTRA1	ANXA2	fibroblast-like
HTRA1	ANXA2	endothelial
PTGDS	ANXA2	pericytes
PTGDS	ANXA2	fibroblast-like
PTGDS	ANXA2	endothelial
HTRA1	ANXA2	pericytes
HTRA1	ANXA2	fibroblast-like
HTRA1	ANXA2	endothelial
BMP7	AGTR1	fibroblast-like
BMP7	BAMBI	fibroblast-like
BMP7	ENG	fibroblast-like
BMP7	ENG	pericytes

Table S3:

Couples of ligands and receptors obtained from single-cell RNAseq data. Couples were selected from a list of protein-protein interactions from <https://baderlab.org/CellCellInteractions/>. Selected couples had a ligand which was a marker of the neural cluster, coupled with a receptor which was a marker of at least one of the mesenchymal clusters of interest.

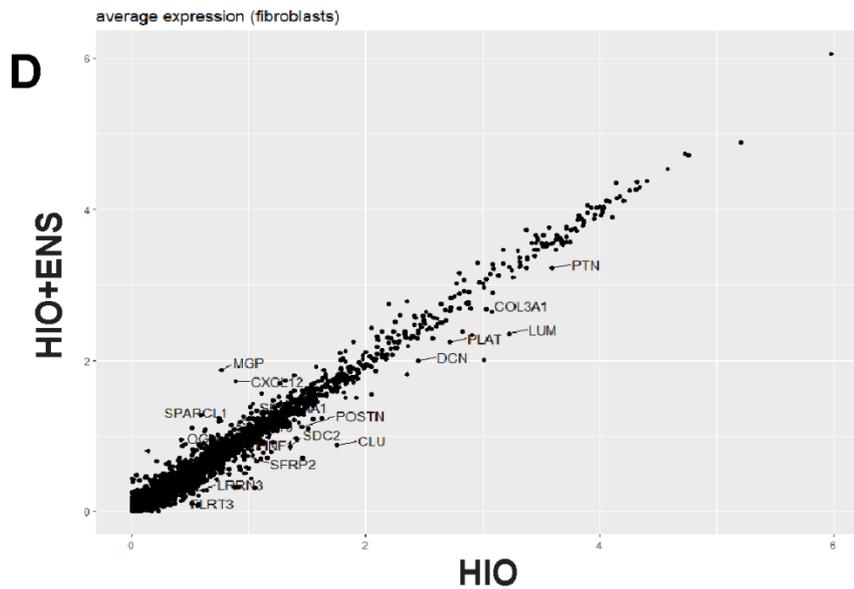
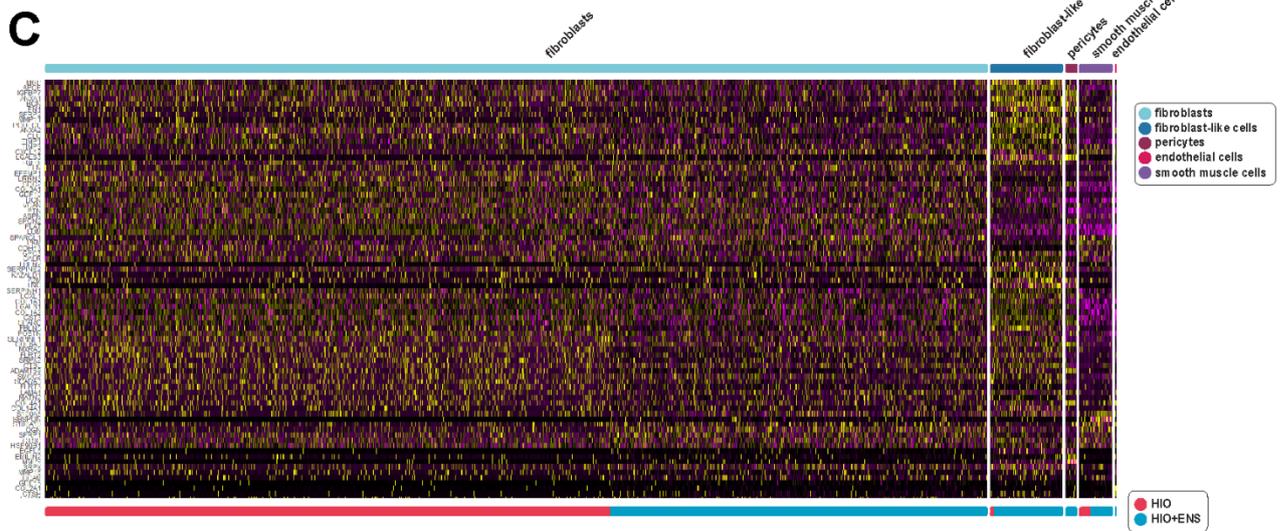
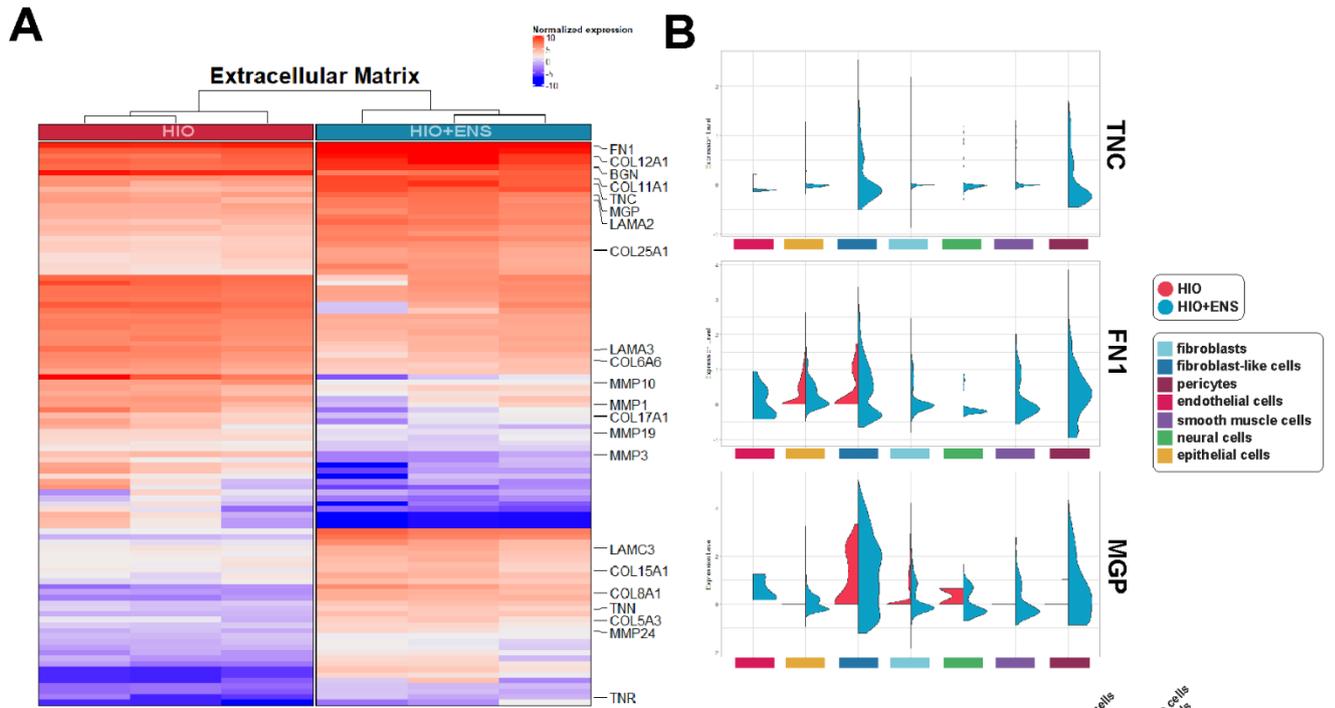
---

# RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Comme décrit dans l'introduction, les interactions entre les ENCC et la MEC sont fondamentales à leur migration et donc à la formation du SNE. Cependant, les ENCC sont également capables de modifier la MEC <sup>124-126</sup> - probablement dans le but de faciliter leur migration. Or, il n'est pas exclu que le remodelage de la MEC par les ENCC puisse en retour avoir un effet inductif sur les autres populations du mésenchyme intestinal. En effet la MEC est un acteur trop souvent oublié mais qui participe activement au développement des organes <sup>190,191</sup>. Dans le cadre de la différenciation *in vitro*, des études ont montré l'importance de la MEC par exemple dans la maturation des cardiomyocytes <sup>192</sup>, ou encore des cellules neurales <sup>193</sup>. La MEC peut également jouer un rôle indirect en modifiant les forces de tension dans le tissu <sup>194,195</sup> ou encore les dynamiques de diffusion des facteurs de croissance - notamment la voie BMP <sup>196</sup>. Dans les données de séquençage ARN obtenues sur les HIO et HIO+ENS, nous avons pu détecter des différences d'expression de gènes liés à la MEC ou sa modification dans le RNAseq et scRNAseq (figure 26.A.).

Nous avons notamment détecté une augmentation de l'expression de plusieurs collagènes et métalloprotéases (figure 26.A.), ainsi que TNC (Ténascine C), FN1 (Fibronectine) et MGP (Matrix Gla Protein) (Figure 26.A. et B.) dans les données de séquençage RNAseq et scRNAseq. Il a été montré que TNC (une glycoprotéine associée aux fibres élastiques) renforce l'expansion et la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte coronarienne <sup>197</sup>, et du muscle lisse dans le poumon <sup>198</sup>. Cette protéine est également produite par les ENCC chez le poulet - mais pas chez la souris et le rat - pour faciliter leur migration <sup>126</sup>. La fibronectine est capable de promouvoir la migration et différenciation des cellules endothéliales <sup>199</sup>. Le rôle de MGP dans le développement est encore peu clair, mais il a été identifié comme un morphogène inhibiteur de l'embranchement des vaisseaux dans les poumons <sup>200</sup>. D'après les données de scRNAseq, les différences dans ces trois gènes et de nombreux autres liés à la MEC semble provenir de la population de cellules « fibroblast-like » (et en moindre mesure, des péricytes), cependant une comparaison de l'expression moyenne dans le cluster de fibroblastes - autrement similaires entre les HIO et HIO+ENS - y souligne des différences dans la MEC également (figure 26.D.). Il est donc envisageable que les ENCC modifient la composition du mésenchyme par le biais de la MEC, en modifiant la MEC eux-mêmes, ou en induisant la modification de la MEC par les cellules mésenchymateuses.

Pour continuer ce projet, il serait donc intéressant d'évaluer plus précisément dans quelle mesure la MEC des HIO+ENS est modifiée, et si ces modifications ont un impact sur les populations musculaires et vasculaires du mésenchyme.



---

**Figure 26 : Modifications de la MEC entre les HIO et HIO+ENS**

**A.** Heatmap de l'expression normalisée des gènes liés à l'Ontologie "Extracellular Matrix" dans les données de séquençage des HIO et HIO+ENS. Les gènes représentés ont été détectés comme sur ou sous-exprimés dans les HIO+ENS dans l'analyse différentielle effectuée avec DESeq2 ( $\log_2FC > 1.5$  ou  $< -1.5$ ; p-value ajustée  $< 0.05$ ) **B.** Expression de TNC, FN1 et MGP dans le séquençage en cellules uniques des clusters mésenchymateux des HIO et HIO+ENS **C.** Heatmap de l'expression des gènes liés à l'Ontologie "Extracellular Matrix" dans les données de séquençage en cellules uniques des clusters mésenchymateux des HIO et HIO+ENS **D.** Comparaison de l'expression moyenne des gènes exprimés dans le cluster "fibroblast" entre les HIO et HIO+ENS. Les gènes identifiés par leur nom sont ceux qui sont à la fois des marqueurs d'expression différentiels entre les cellules des HIO et HIO+ENS ( $\log_2FC > 0.2$ ) et qui font partie de la liste de gènes liés à l'ontologie "Extracellular Matrix"

---

---

# DISCUSSION

Comme nous en avons discuté dans l'introduction, l'intestin grêle se développe à partir de plusieurs tissus d'origine endodermique, mésodermique et ectodermique. Si le développement de ces parties distinctes de la paroi intestinale a été bien étudié (en particulier l'endoderme intestinal), les interactions qui régissent leur développement et leur maturation respectives restent encore mécomprises. Les interactions entre l'endoderme et le mésoderme ont été l'objet principal des études qui s'intéressent au co-développement des tissus intestinaux, comme cela a été examiné dans plusieurs revues<sup>82,201</sup>. Ces interactions sont par exemple impliquées dans la postériorisation du tube digestif<sup>151,152</sup> (effet du mésoderme sur l'endoderme), la formation des couches musculaires<sup>74,156</sup> (effet de l'endoderme sur le mésoderme), et la formation de l'axe crypto-villositaire<sup>53,54</sup> (interactions réciproques permettant la mise en place structurale de la muqueuse digestive). En revanche, les études s'intéressant aux interactions entre le SNE en développement et les populations mésenchymateuses sont, elles, moins courantes et se concentrent généralement sur la migration ou la différenciation du SNE. Ce projet de thèse a donc eu pour but d'étudier dans quelle mesure le SNE et ses progéniteurs influencent le développement d'autres populations du tube digestif - notamment les populations mésenchymateuses.

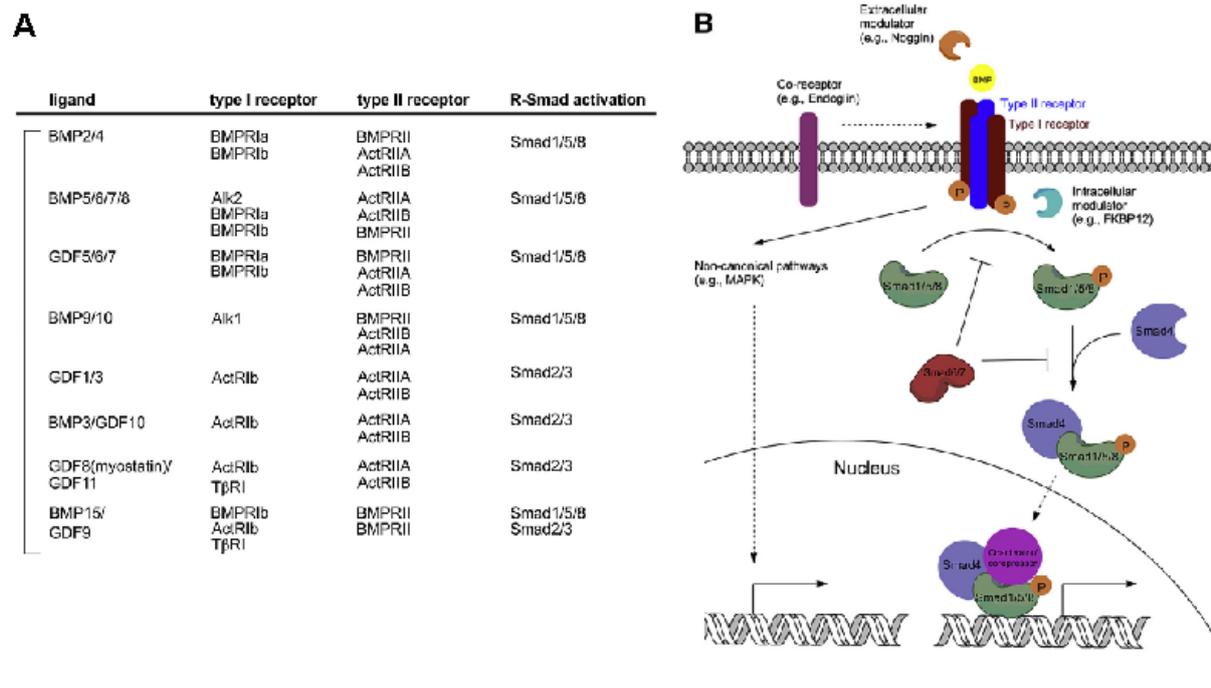
Ce projet a également eu pour vocation de se concentrer sur le développement du tube digestif humain. En effet, malgré l'apport indiscutable des modèles animaux pour la biologie du développement, les différences inter-espèces sont parfois un frein à la transférabilité des études réalisées à la médecine humaine. C'est pour cela que nous avons tiré profit de nouveaux modèles expérimentaux issus du domaine de l'ingénierie des cellules souches, avec le modèle HIO/HIO+ENS. Ce modèle nous a permis de produire *in vitro* du tissu humain récapitulant le développement embryonnaire de l'intestin en modulant ses compartiments cellulaires et ainsi de comparer le développement des organoïdes intestinaux avec et sans SNE.

## **Influence des ENCC sur le développement du mésenchyme intestinal et rôle de BMP7**

En comparant des organoïdes avec et sans SNE, nous avons pu montrer que les cellules progénitrices du SNE influencent le développement des populations mésenchymateuses intestinales. Plus précisément, nous avons montré une augmentation des populations de cellules musculaires lisses et des péricytes chez les HIO+ENS. La comparaison avec les données des atlas cellulaires fœtaux humains a de plus montré que ces types cellulaires s'intègrent bien avec des données humaines *in vivo*. Les analyses sur les organoïdes transplantés suggèrent que les HIO+ENS sont plus à même de former des réseaux vasculaires d'origine humaine. Les HIO transplantés étant plus avancés dans leur niveau de maturation, il serait intéressant d'explorer davantage la diversité de leur mésenchyme, notamment grâce au scRNAseq.

De plus, l'analyse des interactions ligands-récepteurs nous a permis d'identifier la voie BMP comme un des acteurs de la régulation de la différenciation du mésenchyme par les ENCC. En effet nous avons détecté l'expression de BMP7 dans le cluster de cellules neurales de nos données scRNAseq d'HIO+ENS. La culture d'HIO avec différentes concentrations de BMP7 a

montré une augmentation l'expression de TAGLN (SM22), un marqueur de différenciation du muscle lisse.



**Figure 27 : Mécanismes de la voie BMP**

**A.** ligands de la famille BMP et les récepteurs qui leur sont associés (D'après Yadin 2015) **B.** Représentation schématique du mode des mécanismes (canoniques et non-canoniques) de la voie BMP (D'après Wang 2014)

Les BMP sont un groupe de molécules appartenant à la superfamille des protéines TGF $\beta$ , qui sont d'importants morphogènes impliqués dans de nombreux tissus au cours du développement embryonnaire. Les BMP peuvent fonctionner par voie de signalisation canonique ou non canonique. Dans la voie canonique, le ligand BMP se fixe à un complexe composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II, ce qui déclenche la phosphorylation d'une protéine R-SMAD (1/5/8), qui va ensuite s'associer à une protéine co-SMAD (SMAD co-médiateur) pour se transloquer dans le noyau cellulaire et y réguler l'expression de gènes cibles (figure 27.B). Les différents ligands BMP interagissent avec des récepteurs différents (figure 27.A.), et ont des préférences pour les classes de récepteurs. Par exemple, BMP2/4 s'associe préférentiellement avec les récepteurs de type I, tandis que BMP6/7 s'associe préférentiellement avec les types II<sup>202</sup>. L'activation de la voie BMP est de plus régulée par des récepteurs co-activateurs, par exemple l'endogline (ENG), qui renforce la voie de signalisation BMP7/SMAD1/SMAD5<sup>203</sup>. Les voies non-canoniques sont indépendantes des protéines SMAD, et emploient d'autres médiateurs tels que la MAP kinase (MAPK) ou la Rho-GTPase<sup>202</sup>.

Dans le développement de l'intestin, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les protéines BMP jouent un rôle dans de nombreux processus dont la régionalisation du tube digestif<sup>204,205</sup>, mais également la formation des villosités<sup>56</sup> ou encore la formation des boucles de l'intestin<sup>206</sup>. La voie BMP a également un effet sur les ENCC : BMP2 et BMP4 diminuent leur migration et accroissent la différenciation neuronale et gliale<sup>113</sup>.

Dans le développement des compartiments du mésenchyme, les BMP, en particulier BMP4, ont été précédemment identifiés comme des répresseurs du développement des muscles lisses, et sont exprimés dans le mésenchyme intestinal (en réponse à HH produit par l'épithélium) d'une manière spatialement dépendante, comme moyen de contrôler le positionnement de la couche de muscle lisse et donc le développement structural des tuniques du tractus intestinal<sup>74</sup>. Cet article suggère également que les BMP produits dans le mésenchyme pourraient réprimer de la même manière la différenciation musculaire, influençant ainsi le positionnement du muscle longitudinal.

Dans d'autres populations musculaires, il a été cependant montré que BMP7 régule positivement la prolifération des cellules progénitrices musculaires (dans le muscle squelettique)<sup>207,208</sup> de manière dose-dépendante. Dans le contexte de nos résultats, l'expansion du pool de cellules musculaires lisses sans différences évidentes dans leur niveau de différenciation soutient l'existence d'un effet similaire dans le muscle lisses, les mécanismes d'actions précis restant cependant à explorer.

Les voies BMP dans l'intestin en développement sont donc selon toute vraisemblance multifonctionnelles et complexes, et les effets observés dépendent vraisemblablement du stade de différenciation des cellules cibles, et sont dose-dépendants. Si nos données ont montré l'implication de BMP7 dans le développement des populations de muscle lisse, il nous reste donc à déterminer la concentration et le temps d'exposition optimal pour tirer profit de ces effets.

Une perspective du projet est donc d'inhiber la production de BMP7 par les ENCC, dans le but de déterminer si BMP7 est le seul acteur en jeu dans les modifications dans l'effet du SNE sur les populations mésenchymateuses. Il serait également intéressant d'explorer l'existence de phénomènes de compensation possibles par d'autres ligands de la famille BMP. En effet, il est connu que les ENCC produisent d'autres BMP (BMP2 et BMP4)<sup>113</sup>. D'autres voies de signalisations ont par ailleurs précédemment été identifiées dans le cadre de l'influence des ENCC sur les populations musculaires, notamment la voie Notch dans l'estomac<sup>168</sup>, et il serait donc intéressant d'étudier également leur perturbation dans notre modèle.

### **Co-développement - une relation complexe et multifactorielle**

La comparaison avec les données foetales *in vivo* a certes confirmé l'identité des populations mésenchymateuses étudiées, mais montre également l'absence d'autres populations présentes en conditions physiologique : les CIC, les cellules du mésothélium (séreuse), ou encore les populations endothéliales (présentes en très faible quantité dans les HIO et HIO+ENS, d'après nos résultats de scrNaseq). L'absence de ces populations dans les HIO ne nous permet donc pas de comprendre comment les ENCC et les populations mésenchymateuses présentes dans les HIO/HIO+ENS interagissent avec ces dernières.

Certaines de ces populations sont cependant présentes dans les organoïdes transplantés (notamment les CIC et le réseau vasculaire<sup>183,185</sup>), la comparaison des HIO/HIO+ENS après transplantation nous permettrait donc d'étudier l'effet du SNE sur ces populations qui sont manquantes dans les HIO *in vitro*. Les HIO transplantés sont également plus matures d'un point de vue de l'architecture du tissu et de sa fonctionnalité : les HIO transplantés possèdent une architecture crypte-villosité avec des CSI fonctionnelles, les couches musculaires, ainsi que la présence d'une activité contractile dépendante des CIC, et du SNE chez les HIO+ENS<sup>185</sup>. Les

interactions entre compartiments cellulaires étant dépendant de leur niveau de maturation, l'étude des HIO/HIO+ENS transplantés nous permettrait donc potentiellement d'explorer d'autres interactions présentes à un stade de développement plus avancé, et d'évaluer les résultats structurels et fonctionnels de ces interactions.

Une autre dimension à étudier plus précisément dans ce projet est de ce fait la dimension temporelle : en effet les signaux qui induisent la différenciation cellulaire sont souvent limités dans le temps, et il n'est pas exclu que les ENCC aient un effet inductif en dehors des moments précis auxquels nous les avons étudiés. Il serait donc intéressant d'étudier l'évolution des HIO+ENS *in vitro* et *in vivo* au cours du temps. Cela nous permettrait de plus d'établir avec plus de certitudes les transitions cellulaires existantes entre nos populations mésenchymateuses, ainsi que d'identifier de potentielles sous-populations dans les ENCC.

### Implications dans les pathologies neuro-développementales

La maladie de Hirschsprung (HSCR) est une pathologie qui touche le développement du SNE, dans laquelle les ENCC ne migrent pas assez loin pour coloniser l'entièreté du tube digestif - laissant ainsi sa partie caudale non innervée et donc incapable de motricité. Si la physiologie de HSCR touche principalement le SNE, des anomalies de la musculature ont également été détectées chez des patients Hirschsprung <sup>209</sup>. En effet une hypertrophie musculaire est souvent observée chez les patients HSCR dans le côlon proximal de la zone aganglionnaire, une portion qui est distendue avec une paroi qui s'épaissit de façon marquée <sup>210</sup>. Les maladies neurodéveloppementales qui touchent le SNE peuvent donc avoir un effet perturbateur sur les autres compartiments cellulaires de l'intestin – notamment les couches musculaires. Les résultats obtenus au cours de ce projet de thèse pourraient apporter une explication aux défauts musculaires chez les patients HSCR, et il serait intéressant d'étudier les interactions entre mésenchyme intestinal et les ENCC dans un cadre pathologique pour mieux définir ces perturbations à des fins thérapeutiques.

En dehors de la maladie de Hirschsprung, les développements du SNE et des muscles viscéraux sont impliqués dans d'autres pathologies développementales. C'est notamment le cas de la Pseudo-Obstruction Intestinale Chronique (POIC). Il s'agit d'une pathologie de la motricité intestinale qui est caractérisée par des symptômes évoquant une occlusion intestinale en l'absence d'occlusion mécanique du tractus, qui apparaît généralement à la naissance ou dans les premières années de vie. Cette maladie peut-être subdivisée en trois catégories en fonction des éléments dysfonctionnels identifiés histologiquement : neuropathiques (neurones entériques, forme majoritaire), myopathiques (muscles lisses) ou mesenchymopathiques (cellules de Cajal) <sup>211</sup>. Dans les formes neuropathiques, des altérations du muscle ont cependant été identifiées, et vice-versa <sup>212</sup>. Ces formes de la pathologie peuvent parfois être décrites comme « mixtes ». Dans ce contexte, le co-développement des muscles et du SNE pourrait être impliqué dans le développement de cette pathologie.

De manière plus générale, l'origine développementale de nombreuses pathologies chroniques, particulièrement intestinales, est reconnue <sup>17</sup>. En effet des modifications dans le microenvironnement tissulaire peuvent altérer la mise en place du tissu et ainsi prédisposer au développement pathologique. La littérature sur le développement embryonnaire de l'intestin montre, comme nous avons pu le voir dans l'introduction, que celui-ci est dépendant de nombreuses interactions entre ses composants embryonnaires (l'endoderme, le mésoderme

viscéral, et la crête neurale entérique), que celles-ci soient moléculaires, structurales ou mécaniques. Ainsi, le développement pathologique de n'importe laquelle des composantes de l'intestin amène avec elle la possibilité de perturber l'homéostasie du tissu et donc d'affecter ses fonctions. L'unité neuro-gliale a par ailleurs été impliquée dans la pathologie de maladies inflammatoires comme l'IBS (syndrome de l'intestin irritable)<sup>213</sup>, et des pathologies neuro-développementales comme les TSA (troubles du spectre autistique) sont souvent associées à des dysfonctions de la BEI<sup>214</sup>. Ces données soulignent donc une possible origine neuro-développementale aux dysfonctions de l'appareil digestif, dont l'origine pourrait être tracée aux interactions entre les compartiments cellulaires du tube digestif en développement.

### Organoïdes – un modèle novateur mais perfectible

En comparaison aux modèles plus classiques, le modèle organoïde a pour avantage évident d'être un modèle humain qui peut être étudié *in vitro*. Par nature il permet donc l'observation de mécanismes d'organogénèse humains inobservables *in vivo*. Étant dérivés de cellules souches pluripotentes (embryonnaires ou induites), ce modèle possède de plus un matériel de base virtuellement inépuisable. Le modèle permet également l'incrémention contrôlée de différents types cellulaires, mis en évidence avec les HIO+ENS. En comparaison aux modèles *in vitro* plus anciens, la conformation tridimensionnelle des organoïdes est également un atout. En effet, celle-ci influence la nature des interactions entre les compartiments cellulaires, ainsi que d'autres facteurs tels que les dynamiques de diffusion de facteurs au sein du tissu étudié. L'hétérogénéité résultant de la production d'organoïdes est également un élément manquant aux modèles *in vitro* (qui utilisent des populations cellulaires « pures »), du fait des interactions entre les différents types cellulaires, qui affectent à la fois leurs différenciations respectives et leur conformation spatiale. C'est notamment le cas dans les HIO pour les interactions endoderme-mésoderme qui, comme discuté dans l'introduction, sont fondamentales à de nombreux événements de différenciation et de morphogénèse dans le développement de l'intestin.

Le modèle possède cependant des limites qui lui sont propres. Comme cela a été souligné dans une revue de Fowler et al. de 2019 traitant de ce sujet, les protocoles de différenciation des organoïdes et autres modèles issus de l'ingénierie des cellules souches ont été en grande partie établis sur la base de données issues de modèles animaux<sup>63</sup>, générant potentiellement des imprécisions dues aux différences évolutives chez l'Homme. La revue soulève aussi le fait que les protocoles établis ont pour but de produire les types cellulaires voulus *in vitro* le plus rapidement possible, sans forcément respecter la dynamique temporelle présente *in vivo* - notamment chez l'Homme, où cette dynamique est plus longue que chez les modèles animaux classiques.

Les organoïdes sont de plus de nos jours encore produits à l'aide de composés animaux : le protocole de production des HIO comporte une exposition au sérum de veau foetal au cours de l'exposition à l'Activine A, et ils sont également cultivés en Matrigel - une matrice produite par des cellules de sarcome de souris. Cette exposition aux produits animaux porte en premier lieu problème en vue de l'avancée vers l'utilisation du tissu produit *in vitro* vers la transplantation chez l'humain pour la médecine régénératrice. Cette exposition est de plus une source d'hétérogénéité, puisque ces produits sont soumis à des différences de composition d'un batch à l'autre<sup>215</sup>. Les organoïdes possèdent en effet une certaine

variabilité, au sein d'une différenciation, entre différenciations et entre lignées d'hPSC. Ceci peut poser un problème de reproductibilité des résultats, et soulève la nécessité d'optimisation et de standardisation des protocoles de différenciation des HIO, ce qui a déjà fait sujet d'études par exemple chez les organoïdes cérébraux <sup>216</sup>.

De plus comme décrit précédemment, les organoïdes obtenus *in vitro* sont de nature foétale <sup>184</sup>. En effet, certains facteurs présents *in vivo* sont manquants, comme par exemple certaines populations cellulaires (réseaux vasculaires, cellules immunitaires...) les interactions avec d'autres tissus de l'embryon en développement, l'application de forces mécaniques ou le flux sanguin alimentant les organes en cours de développement. D'autres modèles tentent d'inclure certains de ces facteurs dans leur design expérimental. Les « organ-on-chip » sont par exemple des dispositifs de culture cellulaire microfluidiques qui contiennent des compartiments parenchymateux et vasculaires qui permettent de modéliser les influences des tissus de soutien et de l'apport sanguin <sup>217</sup>. Il existe également des modèles d'organoïdes multi-organes qui étudient les influences réciproques de ces organes sur leurs développements respectifs, comme par exemple des organoïdes de cœur/intestin <sup>218</sup>, neuromusculaires <sup>219</sup>, ou encore intestin/pancréas/foie/vésicule biliaire <sup>220</sup>.

En restant dans le modèle HIO, des études ont étudié l'ajout de certains de ces facteurs dans les HIO, comme les lymphocytes T <sup>221</sup>, et les forces mécaniques <sup>222</sup>, ce qui permet, comme dans notre étude avec l'ajout de ENCC, de montrer l'importance de ces facteurs dans la maturation de l'intestin. La formation d'organoïdes avec des réseaux vasculaires endogènes intéresse particulièrement - en vue de la transplantation et donc de la médecine régénérative - et des protocoles qui permettent l'augmentation de cellules endothéliales ont vu le jour par ajout de facteurs de croissance (organoïdes intestinaux) <sup>81</sup> ou par modification génétique (organoïdes cérébraux) <sup>223</sup>.

Cette absence de vascularisation, quand couplée à la conformation tridimensionnelle, a d'ailleurs pour effet de créer un cœur nécrotique au centre des organoïdes. Ce cœur nécrotique a alors pour conséquence une restriction dans la diffusion d'oxygène et de nutriments au centre des organoïdes, ce qui cause de la mort cellulaire et limite la taille atteignable pour les organoïdes. Pour pallier à ce problème, des solutions ont été mises en place, soit de réduction de la taille des organoïdes dans le cadre de la culture d'organoïdes cérébraux <sup>224</sup>, l'utilisation de systèmes tel que les organ-on-chip ou des systèmes intermédiaires comme, dans l'intestin, ceux tridimensionnels mais lié à un système de flux <sup>225</sup>.

L'amélioration des conditions de culture des HIO permet donc de découvrir pas-à-pas tous les facteurs qui influencent son développement et sa maturation, tout en se dirigeant vers un modèle *in vitro* de l'intestin humain le plus complet possible.

### Implications dans l'évolution des espèces

L'aspect évolutif de la crête neurale intéresse la communauté scientifique depuis des années. La crête neurale participe au développement de virtuellement tous les organes, ce qui en fait une structure d'intérêt en biologie du développement, mais également en biologie évolutive. La crête neurale est en effet seulement présente chez les vertébrés, chez qui elle contribue de manière majeure à la formation du système nerveux central et du mésenchyme de la tête, dont le squelette crânial et les muscles et cartilages du niveau antérieur de la tête, notamment de la mâchoire. Ces observations ont été relevées pour la première fois par Carl

Gans et Glenn Northcutt, dans un papier publié dans Science en 1983 intitulé « Neural Crest and the Origin of Vertebrates : A New Head »<sup>226</sup>. Les auteurs y soulignent le fait que ces caractéristiques sont impliquées dans la prédation active, ainsi que des fonctions motrices et sensorielles importantes ; ce qui implique la crête neurale comme conducteur de l'évolution des vertébrés. Brian K Hall ira jusqu'à décrire la crête neurale comme un quatrième feuillet embryonnaire, soulignant son rôle dans l'organisation structurelle de l'embryon vertébré<sup>227</sup>.

Il est reconnu que la crête neurale crâniale a un rôle d'organisateur dans les tissus qu'elle colonise. En effet, comme décrit précédemment, elle influe sur la différenciation des muscles faciaux<sup>228</sup>. De plus, il a été montré chez le zebrafish que la crête neurale crâniale permet la morphogénèse du globe oculaire par modification de la MEC<sup>229</sup>. En dehors de la région crâniale, la crête neurale a également une influence sur le développement d'autres types cellulaires, par exemple, sur les muscles squelettiques dans les somites<sup>166</sup> et le muscle lisse de l'estomac<sup>168</sup>, ainsi que les travaux réalisés au cours de ce projet de thèse. De ce fait, la crête neurale pourrait donc être vue comme un organisateur global du développement chez les vertébrés, et il serait intéressant de continuer à explorer son influence sur les nombreuses autres structures embryonnaires qu'elle colonise.

Dans ce contexte, le modèle organoïde est également utilisable dans le cadre d'études sur l'évolution développementale. En effet, des études récentes se sont intéressées à la comparaison du développement d'organoïdes cérébraux produit à partir d'IPSC humaines et de chimpanzés<sup>230</sup>, dans le but d'identifier des processus développementaux spécifiques à l'Homme. En effet les mécanismes développementaux, bien que souvent similaires entre les vertébrés, conservent des spécificités d'une espèce à l'autre. Dans le cadre du développement de l'intestin, c'est par exemple le cas par exemple de la formation des villosités – différentes entre la souris et le poulet – deux modèles animaux fréquemment utilisés pour étudier le développement de l'intestin. La souris est souvent utilisée comme modèle d'étude physiologique ou pathologique ; or en comparaison au développement murin, le tube digestif humain est mature relativement tôt, et ressemble à sa morphologie adulte dès 22 semaines de gestation (le développement digestif chez la souris n'atteignant un stade similaire que bien après la naissance)<sup>179</sup>.

La formation du SNE peut également différer entre les espèces. Par exemple, la différenciation de la glie entérique commence juste après la migration chez le poulet mais bien plus tard chez la souris. On retrouve également des différences espèces-spécifiques dans les sous-types neuronaux ou dans la chronologie de l'innervation de la muqueuse (avant, au moment de ou après la naissance en fonction des espèces)<sup>231</sup>. Ces différences peuvent donc se retrouver dans l'étude des pathologies développementales, et les études ayant des portées thérapeutiques qui sont réalisées chez les modèles animaux courent le risque de ne pas être transposables à la médecine humaine.

## Conclusion

En conclusion, dans ce projet de thèse, nous avons pu mettre en évidence l'implication des cellules progénitrices du SNE dans la mise en place des compartiments mésenchymateux de l'intestin. En particulier nous avons montré que les ENCC influent par la voie BMP sur le développement de la musculature et la vascularisation dans l'intestin précoce. Ces résultats ouvrent la voie vers une meilleure compréhension du rôle joué par le Système nerveux

entérique dans la mise en place de l'intestin embryonnaire, et donc potentiellement sur son rôle dans l'homéostasie du microenvironnement digestif chez l'adulte, en conditions physiologiques et pathologiques.

---

# BIBLIOGRAPHIE

1. Van Speybroeck, L. & De Waele, Dani. Van de vijver, G. Theories in Early Embryology Close Connections between Epigenesis, Preformationism, and Self-Organization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **981**, 7–49 (2002).
2. Maienschein, J. Epigenesis and Preformationism. in *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (éd. Zalta, E. N.) (Metaphysics Research Lab, Stanford University, 2017).
3. Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H. On the Origin of the Term « Stem Cell ». *Cell Stem Cell* **1**, 35-38 (2007).
4. Aulie, R. P. Caspar friedrich wolff and his « theoria generationis », 1759. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **16**, 124-144 (1961).
5. Hill, M. A. The non-specificity of the germ-layers. [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Paper\\_-\\_The\\_non-specificity\\_of\\_the\\_germ-layers](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Paper_-_The_non-specificity_of_the_germ-layers) (2021).
6. Anderson, C. & Stern, C. D. Organizers in Development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **117**, 435-454 (2016).
7. Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J. & Derome, N. A brief history of bioinformatics. *Brief. Bioinform.* **20**, 1981-1996 (2019).
8. Zhang, H. The review of transcriptome sequencing: Principles, history and advances. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **332**, (2019).
9. Gilbert, S. F. Genes Classical and Genes Developmental: The Different Use of Genes in Evolutionary Syntheses. *Concept Gene Dev. Evol.* 178-192 (2010) doi:10.1017/cbo9780511527296.010.
10. Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A. & Terzic, A. Induced pluripotent stem cells: Developmental biology to regenerative medicine. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 700-710 (2010).
11. Thomson, J. A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-). **282**, 1145-1147 (1998).
12. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
13. Daley, G. Q. Cellular alchemy and the golden age of reprogramming. *Cell* **151**, 1151-1154 (2012).
14. Eiraku, M. *et al.* Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* **3**, 519-532 (2008).
15. Corrà, C., Novellasademunt, L. & Li, V. S. W. A brief history of organoids. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **319**, C151-C165 (2020).
16. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105-109 (2011).
17. Heindel, J. J. & Vandenberg, L. N. Developmental origins of health and disease: A paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr. Opin. Pediatr.* **27**, 248-253 (2015).
18. Marieb, E. N. & Lachaine, R. *Anatomie et physiologie humaines.* (2005).

19. Gehart, H. & Clevers, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 19-34 (2019).
20. Teitelbaum, E. N., Vaziri, K., Zettervall, S., Amdur, R. L. & Orkin, B. A. Intraoperative small bowel length measurements and analysis of demographic predictors of increased length. *Clin. Anat.* **26**, 827-832 (2013).
21. Wang, S., Walton, K. D. & Gumucio, D. L. Signals and forces shaping organogenesis of the small intestine. *Curr. Top. Dev. Biol.* (2019) doi:10.1016/bs.ctdb.2018.12.001.
22. Van Der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 241-260 (2009).
23. Beumer, J. & Clevers, H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Dev.* **143**, 3639-3649 (2016).
24. Crawley, S. W., Mooseker, M. S. & Tyska, M. J. Shaping the intestinal brush border. *J. Cell Biol.* **207**, 441-451 (2014).
25. Meran, L., Baulies, A. & Li, V. S. W. Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells Int.* (2017) doi:10.1155/2017/7970385.
26. Lei, N. Y., Jabaji, Z., Wang, J., Joshi, V. S. & Brinkley, G. J. Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support the Growth of Intestinal Epithelial Stem Cells. *PLoS One* **9**, 84651 (2014).
27. Roulis, M. & Flavell, R. A. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation* **92**, 116-131 (2016).
28. McCarthy, N. *et al.* Distinct Mesenchymal Cell Populations Generate the Essential Intestinal BMP Signaling Gradient. *Cell Stem Cell* **26**, 391-402.e5 (2020).
29. Kaestner, K. H. The Intestinal Stem Cell Niche: A Central Role for Foxl1-Expressing Subepithelial Telocytes. *Cmgh* **8**, 111-117 (2019).
30. Avvari, R. K. Biomechanics of the Small Intestinal Contractions. *Dig. Syst. - Recent Adv.* (2019) doi:10.5772/INTECHOPEN.86539.
31. Furness, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 286-294 (2012).
32. Tortora, G. J. & Derrickson, B. . *Principes d'anatomie et de physiologie.* (2013).
33. Hao, M. M. *et al.* Enteric nervous system assembly: Functional integration within the developing gut. *Dev. Biol.* **417**, 168-181 (2016).
34. Wallace, A. S. & Burns, A. J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* **319**, 367-382 (2005).
35. Bayliss, W. M. & Starling, E. H. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* **24**, 99 (1899).
36. Vergnolle, N. & Cirillo, C. Neurons and glia in the enteric nervous system and epithelial barrier function. *Physiology* **33**, 269-280 (2018).
37. Gross, E. R., Gershon, M. D., Margolis, K. G., Gertsberg, Z. V. & Cowles, R. A. Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology* **143**, 408-417.e2 (2012).

38. Bohórquez, D. V. *et al.* An enteroendocrine cell - Enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* **9**, (2014).
39. Furness, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 87-96 (2000).
40. Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K. & Clerc, N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* **72**, 143-164 (2004).
41. Sharkey, K. A., Gulbransen, B. D., Sharkey, K. A. & Nat, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Publ. Gr.* **9**, 625-632 (2012).
42. Neunlist, M. *et al.* Enteric glial cells: Recent developments and future directions. *Gastroenterology* **147**, 1230-1237 (2014).
43. Drokhyansky, E. *et al.* The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution Resource The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell* 1-17 (2020) doi:10.1016/j.cell.2020.08.003.
44. Browning, K. N. & Travagli, R. A. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr. Physiol.* **4**, 1339-1368 (2014).
45. Snoek, S., Verstege, M., Boeckstaens, G., van den Wijngaard, R. & de Jonge, W. The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier function in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 637-651 (2010).
46. Yoo, B. B. & Mazmanian, S. K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* **46**, 910-926 (2017).
47. Rolig, A. S. *et al.* The enteric nervous system promotes intestinal health by constraining microbiota composition. *PLoS Biol.* **15**, 1-22 (2017).
48. Costa, M., Brookes, S. J. H. & Hennig, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. in *Gut* vol. 47 (2000).
49. Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R. & Francis-West, P. H. *Larsen's Human Embryology*. *Larsen's Human Embryology* (Elsevier Inc, 2015).
50. Zorn, A. M. & Wells, J. M. Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 221-251 (2009).
51. Offield, M. F. *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **995**, 105-116 (1996).
52. Jason R. Spence, Ryan Lauf, and N. F. S. Vertebrate Intestinal Endoderm Development. *Dev Dyn* **83**, 1-29 (2011).
53. Walton, K. D., Freddo, A. M., Wang, S. & Gumucio, D. L. Generation of intestinal surface: An absorbing tale. *Dev.* **143**, 2261-2272 (2016).
54. Shyer, A. E. *et al.* Villification: How the Gut Gets Its Villi. *Science (80-. )*. **342**, 212-218 (2013).
55. Walton, K. D., Mishkind, D., Riddle, M. R., Tabin, C. J. & Gumucio, D. L. Blueprint for an intestinal villus: Species-specific assembly required. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* vol. 7 (2018).
56. Walton, K. D. *et al.* Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Dev.* **143**, 427-436 (2016).

57. Walton, K. D. *et al.* Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. *PNAS* (2012) doi:10.1073/pnas.1205669109.
58. N, B. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).
59. Kim, T. H., Escudero, S. & Shivdasani, R. A. Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3932-3937 (2012).
60. Shyer, A. E., Huycke, T. R., Lee, C., Mahadevan, L. & Tabin, C. J. Bending Gradients: How the intestinal stem cell gets its home. *Cell* **161**, 569-580 (2015).
61. Fawkner-Corbett, D. *et al.* Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell* **184**, 810-826.e23 (2021).
62. Guiu, J. *et al.* Tracing the origin of adult intestinal stem cells. *Nature* **570**, 107-111 (2019).
63. Fowler, J. L., Ang, L. T. & Loh, K. M. A critical look: Challenges in differentiating human pluripotent stem cells into desired cell types and organoids. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* vol. 9 1-23 (2020).
64. Prummel, K. D., Nieuwenhuize, S. & Mosimann, C. The lateral plate mesoderm. *Dev.* **147**, 1-10 (2020).
65. Mutsaers, S. E., Prêle, C. M. A., Pengelly, S. & Herrick, S. E. Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil. Steril.* **106**, 1018-1024 (2016).
66. Wilm, B. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* **132**, 5317-5328 (2005).
67. Nelson, C. M. & Jaslove, J. M. Smooth muscle: a stiff sculptor of epithelial shapes. (2018) doi:10.1098/rstb.2017.0318.
68. Martire, D. *et al.* Phenotypic switch of smooth muscle cells in paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction syndrome. *J. Cell. Mol. Med.* **25**, 4028-4039 (2021).
69. McKey, J., Martire, D., de Santa Barbara, P. & Faure, S. LIX1 regulates YAP1 activity and controls the proliferation and differentiation of stomach mesenchymal progenitors. *BMC Biol.* **14**, 1-16 (2016).
70. Mchugh, K. M. *Molecular Analysis of Smooth Muscle Development in the Mouse.* *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* vol. 204 (1995).
71. Scirocco, A. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Phenotypic Switch in Gastrointestinal Smooth Muscle. *J. Cell. Physiol.* **231**, 295-302 (2016).
72. Fu, M., Tam, P. K. H., Sham, M. H. & Lui, V. C. H. Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: A topographical study. *Anat. Embryol. (Berl).* **208**, 33-41 (2004).
73. Zacharias, W. J. *et al.* Hedgehog signaling controls homeostasis of adult intestinal smooth muscle. *Dev. Biol.* **355**, 152-162 (2011).
74. Huycke, T. R. *et al.* Genetic and mechanical regulation of intestinal smooth muscle development. *Cell* **179**, 90-105.e21 (2019).
75. Eastwood, M., Mudera, V. C., Mcgrouter, D. A. & Brown, R. A. Effect of Precise Mechanical Loading on Fibroblast Populated Collagen Lattices: Morphological

- Changes. **40**, 13-21 (1998).
76. Kanda, K., Matsuda, T. & Oka, T. Two-dimensional Orientational Response of Smooth Muscle Cells to Cyclic Stretching. *ASAIO* (1992).
  77. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767-801 (2004).
  78. Majesky, M. W., Dong, X. R., Regan, J. N. & Hoglund, V. J. Vascular smooth muscle progenitor cells: Building and repairing blood vessels. *Circ. Res.* **108**, 365-377 (2011).
  79. Hatch, J. & Mukoyama, Y.-S. Spatiotemporal Mapping of Vascularization and Innervation in the Fetal Murine Intestine. *Dev. Dyn.* **244**, 56-68 (2015).
  80. Thomason, R. T., Bader, D. M. & Winters, N. I. Comprehensive timeline of mesodermal development in the quail small intestine. *Dev. Dyn.* **241**, 1678-1694 (2012).
  81. Holloway, E. M. *et al.* Differentiation of human intestinal organoids with endogenous vascular endothelial cells. *Dev. Cell* **54**, (2020).
  82. McLin, V. A., Henning, S. J. & Jamrich, M. The Role of the Visceral Mesoderm in the Development of the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* **136**, 2074-2091 (2009).
  83. Roberts, R. R. *et al.* The first intestinal motility patterns in fetal mice are not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal. *J Physiol* **588**, 1153-1169 (2010).
  84. Le Douarin, N. M. & Dupin, E. The "beginnings" of the neural crest. *Dev. Biol.* **444**, S3-S13 (2018).
  85. Sato, T. S. *et al.* Neurocristopathies: Enigmatic appearances of neural crest cell-derived abnormalities. *Radiographics* **39**, 2085-2102 (2019).
  86. Hutchins, E. J. *et al.* Migration and diversification of the vagal neural crest. *Dev. Biol.* (2018) doi:10.1016/j.ydbio.2018.07.004.
  87. Mayor, R. & Theveneau, E. The neural crest. *Dev.* **140**, 2247-2251 (2012).
  88. Kuo, B. R. & Erickson, C. A. Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adhes. Migr.* **4**, 567-585 (2010).
  89. Zuhdi, N. *et al.* Slit Molecules Prevent Entrance of Trunk Neural Crest Cells in Developing Gut HHS Public Access. *Int J Dev Neurosci* **41**, 8-16 (2015).
  90. Yntema, C. L. & Hammond, W. S. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* **101**, 515-541 (1954).
  91. Peters-Van Der Sanden, M. J. H. *et al.* Ablation of Various Regions Within the Avian Vagal Neural Crest Has Differential Effects on Ganglion Formation in the Fore-, Mid-and Hindgut. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* vol. 196 (1993).
  92. Epstein, M. L., Mikawa, T., Brown, A. M. C. & Mcfarlin, D. R. Mapping the Origin of the Avian Enteric Nervous System With a Retroviral Marker. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* vol. 201 (1994).
  93. Simkin, J. E., Zhang, D., Stamp, L. A. & Newgreen, D. F. Fine scale differences within the vagal neural crest for enteric nervous system formation. *Dev. Biol.* 1-12 (2018) doi:10.1016/j.ydbio.2018.11.007.
  94. Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. & Pachnis, V.

- Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* **122**, 349-358 (1996).
95. Young, H. M. *et al.* A Single Rostrocaudal Colonization of the Rodent Intestine by Enteric Neuron Precursors Is Revealed by the Expression of Phox2b, Ret, and p75 and by Explants Grown under the Kidney Capsule or in Organ Culture. *Dev. Biol.* (1998).
  96. AM, G. & N, N. A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr. Res.* **64**, 326-333 (2008).
  97. Goldstein, A., Hofstra, R. & Burns, A. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet* **6**, 247-253 (2013).
  98. Burns, a J. & Douarin, N. M. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* **125**, 4335-4347 (1998).
  99. Burns, A. J. & Le Douarin, N. M. Enteric Nervous System Development: Analysis of the Selective Developmental Potentialities of Vagal and Sacral Neural Crest Cells Using Quail-Chick Chimeras. *Anat. Rec.* (2001).
  100. Young, H. M. & Newgreen, D. Enteric neural crest-derived cells: Origin, identification, migration, and differentiation. *Anat. Rec.* **262**, 1-15 (2001).
  101. Brokhman, I., Razavi, R., Babona-pilipos, R. & Kooy, D. Van Der. Dual embryonic origin of the mammalian enteric nervous system. *Dev. Biol.* (2018) doi:10.1016/J.YDBIO.2018.11.014.
  102. Nishiyama, C. *et al.* Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat. Neurosci.* **15**, 1211-1218 (2012).
  103. Newgreen, D. F., Osborne, J. M. & Zhang, D. Skip segment Hirschsprung disease: Modelling the trans-mesenteric origin of the enteric nervous system in the human colon. *bioRxiv* (2019) doi:10.1101/2019.12.22.886606.
  104. Yu, Q. *et al.* Mesenteric Neural Crest Cells Are the Embryological Basis of Skip Segment Hirschsprung's Disease. *Cmgh* **12**, 1-24 (2021).
  105. Uesaka, T., Nagashimada, M. & Enomoto, H. Neuronal differentiation in schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* **35**, 9879-9888 (2015).
  106. Uesaka, T. *et al.* Enhanced enteric neurogenesis by Schwann cell precursors in mouse models of Hirschsprung disease. *Glia* **69**, 2575-2590 (2021).
  107. Manié, S., Santoro, M., Fusco, A. & Billaud, M. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *TRENDS Genet.* **17**, 580-589 (2001).
  108. Natarajan, D., Marcos-gutierrez, C., Pachnis, V. & Graaff, E. De. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* **5160**, 5151-5160 (2002).
  109. Niesler, B., Kuerten, S., Demir, I. E. & Schäfer, K.-H. Disorders of the enteric nervous system — a holistic view. *Gut* **47**, (2000).
  110. Heuckeroth, R. O. *et al.* Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* **22**, 253-263 (1999).

111. G. B. & MD, G. Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons. *Dev. Biol.* **132**, 189-211 (1989).
112. Fu, M., Lui, V. C. H., Sham, M. H., Pachnis, V. & Tam, P. K. H. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J. Cell Biol.* **166**, 673-684 (2004).
113. Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N. & Roberts, D. J. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech. Dev.* **122**, 821-833 (2005).
114. Breau, M. A. *et al.* Lack of  $\beta 1$  integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development* **133**, 1725-1734 (2006).
115. Anderson, R. B. *et al.* The Cell Adhesion Molecule L1 Is Required for Chain Migration of Neural Crest Cells in the Developing Mouse Gut. *Gastroenterology* **130**, 1221-1232 (2006).
116. Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. & Dufour, S. N-cadherin and  $\beta 1$ -integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* **364**, 178-191 (2012).
117. Chalazonitis, A., Tennyson, V. M., Kibbey, M. C., Rothman, T. P. & Gershon, M. D. The  $\alpha 1$  subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut. *J. Neurobiol.* **33**, 118-138 (1997).
118. Rothman, T. P. *et al.* Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of *1s/1s*, but not *c-ret<sup>-/-</sup>* mice. *Dev. Biol.* **178**, 498-513 (1996).
119. Druckenbrod, N. R. & Epstein, M. L. Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development* **136**, 3195-3203 (2009).
120. Greenberg, J. H., Seppä, S., Seppä, H. & Hewitt, A. T. Role of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration. *Dev. Biol.* **87**, 259-266 (1981).
121. Soret, R. *et al.* A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. **125**, 4483-4496 (2015).
122. Parikh, D. H., Tam, P. K. H., Van Velzen, D. & Edgar, D. Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **102**, 1236-1241 (1992).
123. Parikh, D. H., Tam, P. K. H., Van Velzen, D. & Edgar, D. The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: An immunohistochemical study. *J. Pediatr. Surg.* **29**, 1302-1306 (1994).
124. Chevalier, N. R. *et al.* How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci. Rep.* **6**, 1-18 (2016).
125. Nagy, N. *et al.* Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. *Development* **145**, dev160317 (2018).
126. Akbareian, S. E. *et al.* Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev. Biol.* **382**, 446-456 (2013).

127. Barlow, A. J., Wallace, A. S., Thapar, N. & Burns, A. J. Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. *Development* **135**, 1681-1691 (2008).
128. Newgreen, D. F., Dufour, S., Howard, M. J. & Landman, K. A. Simple rules for a « simple » nervous system? Molecular and biomathematical approaches to enteric nervous system formation and malformation. *Dev. Biol.* **382**, 305-319 (2013).
129. Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H. & Heuckeroth, R. O. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation Scott. *Development* (2003) doi:10.1242/dev.00433.
130. Young, H. M. *et al.* Colonizing while migrating: How do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biol.* **12**, 1-18 (2014).
131. Le Douarin, N. M. & Teillet, M. A. M. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev. Biol.* **41**, 162-184 (1974).
132. Ling, I. T. C. & Sauka-Spengler, T. Early chromatin shaping predetermines multipotent vagal neural crest into neural, neuronal and mesenchymal lineages. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1504-1517 (2019).
133. Uesaka, T., Nagashimada, M. & Enomoto, H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J. Neurosci.* **33**, 16372-16382 (2013).
134. Jiang, Y., Liu, M. Tsai & Gershon, M. D. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* **258**, 364-384 (2003).
135. Erickson, C. S. *et al.* Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines *Neurogastroenterology & Motility. Neurogastroenterol Motil* **26**, 874-884 (2014).
136. Holmberg, A., Olsson, C. & Hennig, G. W. TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J. Exp. Biol.* **210**, 1084-1091 (2007).
137. Chevalier, N. R., Fleury, V., Dufour, S., Proux-Gillardeaux, V. & Asnacios, A. Emergence and development of gut motility in the chicken embryo. *PLoS One* **12**, 1-19 (2017).
138. Hao, M. M. *et al.* Early emergence of neural activity in the developing mouse enteric nervous system. *J. Neurosci.* **31**, 15352-15361 (2011).
139. Foong, J. P. P. *et al.* Changes in nicotinic neurotransmission during enteric nervous system development. *J. Neurosci.* **35**, 7106-7115 (2015).
140. Roberts, R., Murphy, J., Young, H. & Bornstein, J. Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, (2007).
141. Hao, M. M., Bornstein, J. C. & Young, H. M. Development of myenteric cholinergic neurons in ChAT-Cre;R26R-YFP mice. *J. Comp. Neurol.* **521**, 3358-3370 (2013).
142. Mckeown, S. J., Stamp, L., Hao, M. M. & Young, H. M. Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system. *WIREs Dev Biol* **2**, 113-129 (2013).

143. Amiel, J. *et al.* Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. *J. Med. Genet.* **45**, 1-14 (2008).
144. Fu, M. *et al.* Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development* **137**, 631-640 (2010).
145. Uribe, R. A., Honga, S. S. & Bronnera, M. E. Retinoic acid temporally orchestrates colonization of the gut by vagal neural crest cells. *Dev Biol.* (2018) doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
146. Douarin, N. Le. Isolement experimental du mesenchyme propre du foie et role morphogene de la composante mesodermique dans l'organogenese hepatique. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **12**, 141-160 (1964).
147. Ishii, Y., Rex, M., Scotting, P. J. & Yasugi, S. Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: Regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Dyn.* **213**, 464-475 (1998).
148. Y, I., K, F., H, S., S, M. & S, Y. Early specification of intestinal epithelium in the chicken embryo: a study on the localization and regulation of CdxA expression. *Dev. Growth Differ.* **39**, 643-653 (1997).
149. Kim, B. M., Buchner, G., Miletich, I., Sharpe, P. T. & Shivdasani, R. A. The stomach mesenchymal transcription factor barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev. Cell* **8**, 611-622 (2005).
150. Moniot, B. *et al.* SOX9 specifies the pyloric sphincter epithelium through mesenchymal-epithelial signals. *Development* **131**, 3795-3804 (2004).
151. Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J. J., Grapin-Botton, A. & Wells, J. M. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech. Dev.* **123**, 42-55 (2006).
152. Wells, J. M. & Spence, J. R. How to make an intestine. *Development* **141**, 752-760 (2014).
153. Mao, J., Kim, B. M., Rajurkar, M., Shivdasani, R. A. & McMahon, A. P. Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development* **137**, 1721-1729 (2010).
154. Geske, M. J., Zhang, X., Patel, K. K., Ornitz, D. M. & Stappenbeck, T. S. Fgf9 signaling regulates small intestinal elongation and mesenchymal development. *Development* **135**, 2959-2968 (2008).
155. Cervantes, S., Yamaguchi, T. P. & Hebrok, M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. *Dev. Biol.* **326**, 285-294 (2009).
156. Sukegawa, A. *et al.* The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* **1980**, 1971-1980 (2000).
157. De Santa Barbara, P. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Dev. Dyn.* **234**, 312-322 (2005).
158. Turing, A. M. The chemical basis of morphogenesis. *Bull. Math. Biol.* **52**, 153-197 (1952).
159. Khalipina, D., Kaga, Y., Dacher, N. & Chevalier, N. R. Smooth muscle contractility causes the gut to grow anisotropically. *J. R. Soc. Interface* (2019) doi:10.1098/rsif.2019.0484.
160. Savin, T. *et al.* On the growth and form of the gut. *Nature* **476**, 57-63 (2011).

161. Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. M. & Zaret, K. S. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum, transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* **15**, 1998-2009 (2001).
162. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M. & Zaret, K. S. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science (80-. )*. **284**, 1998-2003 (1999).
163. Kim, S. K., Hebrok, M. & Melton, D. A. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* **124**, 4243-4252 (1997).
164. M, H., SK, K. & DA, M. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* **12**, 1705-1713 (1998).
165. Rinon, A. *et al.* Cranial neural crest cells regulate head muscle patterning and differentiation during vertebrate embryogenesis. *Development* **134**, 3065-3075 (2007).
166. Rios, A. C., Serralbo, O., Salgado, D. & Marcelle, C. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* **473**, 532-535 (2011).
167. Bourret, A., Chauvet, N., de Santa Barbara, P. & Faure, S. Colonic mesenchyme differentiates into smooth muscle before its colonization by vagal enteric neural crest-derived cells in the chick embryo. *Cell Tissue Res.* **368**, 503-511 (2017).
168. Faure, S., McKey, J., Sagnol, S. & de Santa Barbara, P. Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation. *Development* **142**, 331-342 (2014).
169. Graham, H. K., Maina, I., Goldstein, A. M. & Nagy, N. Intestinal smooth muscle is required for patterning the enteric nervous system. *J Anat* (2017) doi:10.1016/j.cogdev.2010.08.003.Personal.
170. Tennyson, V. M., Pham, T. D., Rothman, T. P. & Gershon, M. D. *Abnormalities of Smooth Muscle, Basal Laminae, and Nerves in the Aganglionic Segments of the Bowel of Lethal Spotted Mutant Mice.* THE ANATOMICAL RECORD vol. 215 (1986).
171. Chevalier, N. R., Agbesi, R. J. A., Ammouche, Y. & Dufour, S. How Smooth Muscle Contractions Shape the Developing Enteric Nervous System. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
172. Chevalier, N. R. *et al.* Shifting into high gear: how interstitial cells of Cajal change the motility pattern of the developing intestine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **319**, G519-G528 (2020).
173. Ward, S. M. *et al.* Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* **117**, 584-594 (1999).
174. Cleaver, O. & Melton, D. A. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 2003 **9**, 661-668 (2003).
175. JM, R., JM, K. & C, R. VEGF in the nervous system. *Organogenesis* **6**, 107-114 (2010).
176. Nagy, N. *et al.* Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via  $\beta 1$  integrin signaling. *Dev. Biol.* **330**, 263-272 (2009).
177. Schrenk, S. *et al.* Vascular and neural stem cells in the gut: do they need each other? *Histochem. Cell Biol.* **143**, 397-410 (2015).
178. Delalande, J. M. *et al.* Vascularisation is not necessary for gut colonisation by enteric neural crest cells. *Dev. Biol.* **385**, 220-229 (2014).

179. Montgomery, R. K., Mulberg, A. E. & Grand, R. J. Development of the human gastrointestinal tract: Twenty years of progress. *Gastroenterology* **116**, 702-731 (1999).
180. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
181. D'Amour, K. A. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1534-1541 (2005).
182. Flatres, C., Loffet, É., Neunlist, M. & Mahé, M. M. Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines. *Médecine/Sciences* **35**, 549-555 (2019).
183. Watson, C. L. *et al.* An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1310-1314 (2014).
184. Finkbeiner, S. R. *et al.* Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports* **4**, 1140-1155 (2015).
185. Workman, M. J. *et al.* Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat. Med.* **23**, 49-59 (2017).
186. Yu, Q. *et al.* Charting human development using a multi-endodermal organ atlas and organoid models. *Cell* 1-18 (2021) doi:10.1016/j.cell.2021.04.028.
187. Loffet, E., Brossard, L. & Mahe, M. M. Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system. *Hum. Pluripotent Stem Cell Deriv. Organoid Model.* 1-25 (2020) doi:10.1016/bs.mcb.2020.04.012.
188. Bajpai, R. *et al.* CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* **463**, 958-962 (2010).
189. Barber, K., Studer, L. & Fattahi, F. Derivation of enteric neuron lineages from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **14**, 1261-1279 (2019).
190. Adams, J. C. & Watt, F. M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**, 1183-1198 (1993).
191. Dzamba, B. J. & DeSimone, D. W. *Extracellular Matrix (ECM) and the Sculpting of Embryonic Tissues. Current Topics in Developmental Biology* vol. 130 (Elsevier Inc., 2018).
192. Herron, T. J. *et al.* Extracellular matrix-mediated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **9**, (2016).
193. Li, Y. Neural differentiation from pluripotent stem cells: The role of natural and synthetic extracellular matrix. *World J. Stem Cells* **6**, 11 (2014).
194. Assoian, R. K. & Klein, E. A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol.* **18**, 347-352 (2008).
195. Urbanczyk, M., Layland, S. L. & Schenke-layland, K. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biol.* (2019) doi:10.1016/j.matbio.2019.11.005.
196. Sedlmeier, G. & Sleeman, J. P. Extracellular regulation of BMP signaling: Welcome to the matrix. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 173-181 (2017).
197. Ando, K. *et al.* Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. *Differentiation* **81**, 299-306 (2011).

198. Cohen, E. D. *et al.* Wnt signaling regulates smooth muscle precursor development in the mouse lung via a tenascin C/PDGFR pathway. *J. Clin. Invest.* **119**, (2009).
199. Wijelath, E. S. *et al.* Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* **39**, 655-660 (2004).
200. Yao, Y., Nowak, S., Yochelis, A., Garfinkel, A. & Boström, K. I. Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development. *J. Biol. Chem.* **282**, 30131-30142 (2007).
201. Le Guen, L., Marchal, S., Faure, S. & De Santa Barbara, P. Mesenchymal-epithelial interactions during digestive tract development and epithelial stem cell regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3883-3896 (2015).
202. Wang, R. N. *et al.* Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **1**, 87-105 (2014).
203. O, S., SK, M., L, T., AM, G. & R, W. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 13934-13943 (2007).
204. Roberts, D. J. *et al.* Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* **3174**, 3163-3174 (1995).
205. Thompson, C. A., DeLaForest, A. & Battle, M. A. Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Dev. Biol.* **435**, 97-108 (2018).
206. Nerurkar, N. L., Mahadevan, L. & Tabin, C. J. BMP signaling controls buckling forces to modulate looping morphogenesis of the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2277-2282 (2017).
207. Amthor, H., Christ, B., Weil, M. & Patel, K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr. Biol.* **8**, 642-652 (1998).
208. Winbanks, C. E. *et al.* The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J. Cell Biol.* **203**, 345-357 (2013).
209. Wedel, T. *et al.* Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders. *Neurogastroenterol. Motil.* **18**, 526-538 (2006).
210. De Santa Barbara, P., Van Den Brink, G. R. & Roberts, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1322-1332 (2003).
211. Antonucci, A. *et al.* Chronic intestinal pseudo-obstruction. *World J. Gastroenterol.* **14**, 2953-61 (2008).
212. De Giorgio, R., Sarnelli, G., Corinaldesi, R. & Stanghellini, V. Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* **53**, 1549-1552 (2004).
213. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A. & Savidge, T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* **263**, 577-583 (2008).
214. Julio-Pieper, M., Bravo, J. A., Aliaga, E. & Gotteland, M. Intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders - A controversial association. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **40**, 1187-1201 (2014).

215. Czerwinski, M. & Spence, J. R. Hacking the Matrix. *Cell Stem Cell* **20**, 9-10 (2017).
216. Velasco, S. *et al.* Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* **570**, 523-527 (2019).
217. Ingber, D. E. Developmentally inspired human « organs on chips ». *Development* 10-13 (2018) doi:10.1242/dev.156125.
218. Silva, A. C. *et al.* Co-emergence of cardiac and gut tissues promotes cardiomyocyte maturation within human iPSC-derived organoids. *Cell Stem Cell* **28**, 2137-2152.e6 (2021).
219. Faustino Martins, J. M. *et al.* Self-Organizing 3D Human Trunk Neuromuscular Organoids. *Cell Stem Cell* **26**, 172-186.e6 (2020).
220. Koike, H. *et al.* Engineering human hepato-biliary-pancreatic organoids from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* (2021) doi:10.1038/s41596-020-00441-w.
221. Jung, K. B. *et al.* Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
222. Poling, H. M. *et al.* Mechanically induced development and maturation of human intestinal organoids in vivo ., *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 429-442 (2018).
223. Cakir, B. *et al.* Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat. Methods* **16**, 1169-1175 (2019).
224. Choe, M. S. *et al.* A simple method to improve the quality and yield of human pluripotent stem cell-derived cerebral organoids. *Heliyon* **7**, e07350 (2021).
225. Brandenburg, N. *et al.* High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays. *Nat. Biomed. Eng.* (2020) doi:10.1038/s41551-020-0565-2.
226. Gans, C. & Northcutt, R. G. Neural crest and the origin of vertebrates: A new head. *Science (80-. )*. **220**, 268-274 (1983).
227. Hall, B. K. Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genesis* **56**, 1-9 (2018).
228. Rinon, A. *et al.* Cranial neural crest cells regulate head muscle patterning and differentiation during vertebrate embryogenesis. *Development* **134**, 3065-3075 (2007).
229. Bryan, C. D., Casey, M. A., Pfeiffer, R. L., Jones, B. W. & Kwan, K. M. Optic cup morphogenesis requires neural crest-mediated basement membrane assembly. *Development* dev.181420 (2020) doi:10.1242/dev.181420.
230. Kanton, S. *et al.* Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. *Nature* **574**, 418-422 (2019).
231. Hao, M. M. & Young, H. M. Development of enteric neuron diversity. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 1193-1210 (2009).

## **REVUE DANS FRONTIERS IMMUNOLOGY : « INTESTINAL STEM CELL-ON-CHIP TO STUDY HUMAN HOST-MICROBIOTA INTERACTION »**

Cette revue a pour but de faire un état de l'art des modèles « organ-on-chip » utilisés pour l'étude de l'intestin. Ces modèles novateurs sont formés à partir de culture cellulaire dans un appareil dispositif, et présentent de nombreux avantages en comparaison à la culture classique. La revue s'intéresse notamment à l'utilisation de cellules souches dans les organ-on-chip.

**INTESTINAL STEM CELL-ON-CHIP TO STUDY HUMAN HOST-MICROBIOTA INTERACTION****Authors**

Fatima Siwczak <sup>1,#</sup>, Elise Loffet <sup>2,#</sup>, Mathilda Kaminska <sup>1</sup>, Hristina Koceva <sup>1</sup>, Maxime M. Mahe <sup>3,\*</sup>, Alexander S. Mosig <sup>1,\*</sup>

1 Center for Sepsis Control and Care & Institute of Biochemistry II, University Hospital Jena, Germany

2 Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France.

3 Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France; Department of Pediatric General and Thoracic Surgery, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, United States; Department of Pediatrics, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, United States

# Contributed equally

\* Corresponding authors:

Maxime M. Mahe, Email: maxime.mahe@inserm.fr

Alexander S. Mosig, Email: alexander.mosig@med.uni-jena.de

**Abstract**

The gut is a tubular organ responsible for digestion and harbors our intestinal microbiome. This organ is composed of a multitude of specialized cell types arranged in complex barrier-forming crypts and villi covered by a mucosal layer controlling nutrient passage and protecting from invading pathogens. The development and self-renewal of the intestinal epithelium is guided by niche signals controlling the differentiation of specific cell types along the crypt-villus axis in the epithelium. The emergence of microphysiological systems, or organ-on-chips, has paved the way to study the intestinal epithelium within a dynamic and controlled environment. In this review, we describe the use of organ-on-chip technology to control and guide these differentiation processes *in vitro*. We further discuss current applications and forthcoming strategies to investigate the mechanistic processes of intestinal stem cell differentiation, tissue formation, and the interaction of the intestine with the microbiota in the context of gastrointestinal diseases.

**Keywords**

Pluripotent stem cells, intestinal stem cells, organ-on-chip, microbiota, gastrointestinal disease

## Introduction

The gastrointestinal tract is a central organ system that enables the ingestion, digestion, absorption, and the utilization of processed nutrients to fuel the overall body. Within this system, several organs are responsible for digestion and the uptake of nutrients, including the stomach, the small intestine, and the large intestine. The gut forms a tubular structure whose central lumen is lined with a protective mucosa composed of a monostratified epithelium forming invaginations (or crypts) and finger-like protrusions (or villi). This epithelium extends to the apical side of the gut, allowing nutrient uptake and acting as a first line of protection against invading pathogens (Otani & Coopersmith, 2019). A crypt-villus structure is seen in the small intestine, while only crypts are present within the colon. Both the initial development and continuous self-renewal of the intestinal epithelium are guided by niche signals in addition to cell-autonomous processes that initiate the outgrowth and differentiation of intestinal stem cells (ISCs), driving proliferation and differentiation following a crypt-to-villus axis in the small intestine. This process gives rise to progenitor cell lineages showing absorptive or secretory characteristics that subsequently terminally differentiate into specific cell types within the epithelium, including enterocytes, enteroendocrine cells, Paneth cells, goblet cells, Tuft cells, Microfold cells (M cells), and cup cells (H. Clevers, 2013). A rich tissular environment surrounds the epithelium and includes smooth muscle cell layers, the enteric nervous system, and connective tissue that contains arteries and lymphatics and is abundant in fibroblasts and mast cells (Mowat, 2003).

The last few decades in biomedical research have led to a number of robust experimental strategies and techniques to study intestinal physiology. Yet, *in vitro* studies aiming to model the gut mucosa have mostly been limited to static monocultures and co-cultures. In contrast to these older models, recent developments that use microphysiological systems allow scientists to probe both the intestinal epithelium and its environment in a dynamic and physiologically relevant manner (Mosig, 2017).

In this review, we will emphasize the transitions from immortalized cell lines to stem cells and describe their use in combination with gut-on-chip models. These “on-chip” models are defined as three-dimensional (3D) cell cultures arranged as multiple cell layers actively perfused by microfluidics for medium exchange to enable an improved tissue formation with increased lifespan. We will highlight few applications of these gut-on-chip models to understand gastrointestinal diseases and forthcoming strategies to investigate human gut physiology.

### Cell sources for gut-on-chip models: from immortalized cell lines to stem cells

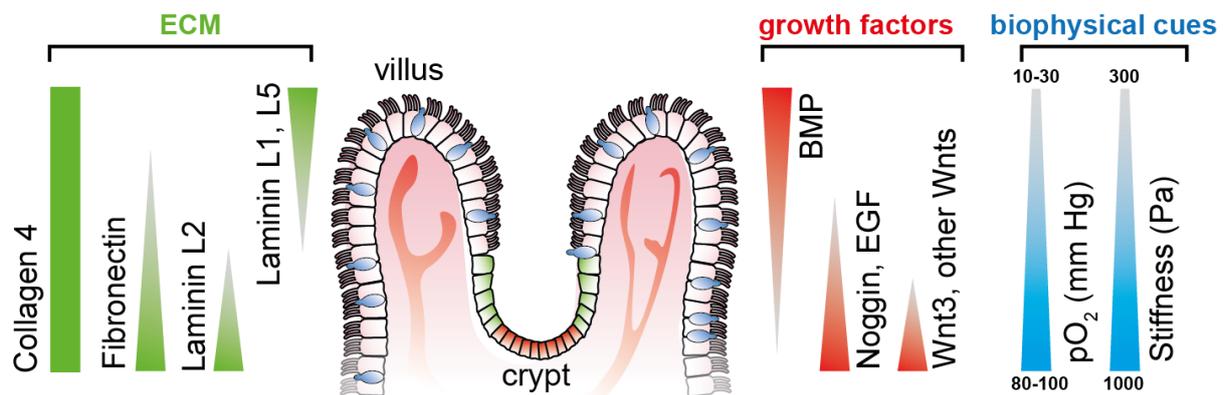
Immortalized cell lines have been used extensively to study the intestine. For example, the colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 had been originally used to study the intestinal epithelial barrier as these cells differentiate spontaneously into a monolayer of enterocytes when reaching confluence (Sun, Chow, Liu, Du, & Pang, 2008). However, the use of cell lines with a cancerogenous background is associated with important limitations, including their spontaneous dedifferentiation and the lack of cellular diversity. Further, immortalized cell lines such as Caco-2 are not able to reflect a patient-specific genetic background to enable a personalized approach to study individual mechanisms of disease-related conditions. To overcome these limitations, the use of human pluripotent stem cells (hiPSCs) or adult stem cells has been explored as a promising alternative to established cell lines. Human adult ISCs maintain an organ-specific imprint and epithelial maturity and possess a patient-specific

background, thus enabling personalized studies (Kasendra et al., 2018; Sontheimer-Phelps et al., 2020). Biopsy-derived cells and intestinal organoid models have emerged as powerful tools to recreate tissue complexity and high cellular diversity *in vitro* (Beumer & Clevers, 2021; H. Clevers, 2016). ISCs are a valuable cell source to grow organoids with organotypic self-patterning, thereby recreating essential microanatomical features of the gut (H. C. Clevers, 2019). However, the availability of primary tissue for the isolation of ISCs is limited and requires a rapid processing of *ex vivo* samples. Hence, human embryonic stem cells (hESCs) and hiPSCs are interesting alternatives as they can be used to generate intestinal cells through directed differentiation (Spence et al., 2011). The use of hiPSCs allows for the generation of multiple differentiated cell types from a patient-specific background with an unlimited supply of human stem cells stored in biobanks (Huang et al., 2019). Furthermore, hiPSCs from patients with a genetic background of interest can be obtained by reprogramming from a multitude of easily accessible primary cell sources, including urine, blood, and skin (Takahashi & Yamanaka, 2016). Nevertheless, a significant drawback to the use of pluripotent stem cells can be found in the difficulty to produce tissues that reach full maturity. The recapitulation of whole embryonic development can be challenging due to a lack of knowledge of all the required biochemical cues driving the differentiation and morphogenic processes. One of the most novel *in vitro* approaches in intestinal mucosa modeling is the use of microfluidically perfused organ-on-chip seeded with cell lines, primary cells, or stem cells (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019; Kasendra et al., 2018; Maurer et al., 2019; Sontheimer-Phelps et al., 2020; Tan et al., 2018; Tovaglieri et al., 2019). A clear benefit of these types of models is that they allow for better control of the microenvironment. One example includes the addition of flow on Caco-2 cells to differentiate them and express the typical cell markers of essential cell types of the small intestine (Goblet- and Paneth-, enterochromaffin-, and brush border-like cells) (H. J. Kim & Ingber, 2013). Further, flow conditions stimulated an increased expression of mucin-2 with the development of a thickened mucus layer covering the epithelial tissue, indicating the functional relevance of goblet-like cells (Kasendra et al., 2018; Shin & Kim, 2018). Perfused organ-on-chip further facilitates a physiological cellular crosstalk by aiding in the outgrowth of organotypic microstructures such as villi and crypts (Kasendra et al., 2018; Maurer et al., 2019). In addition, these epithelial cell layers have been combined in a number of studies with endothelial cells and immune cells using various tissue engineering approaches (Huh et al., 2013; Kasendra et al., 2018; Maurer et al., 2019). These studies highlight the potential of organ-on-chip as a tool to manipulate the microenvironment by facilitating the long-term growth and co-differentiation of different cell types to recreate some typical microanatomical features of the human intestine. However, given the cancerous background of the Caco-2 cell line data generated with these models, the data should be interpreted with caution as this cell line has several limitations in its differentiation potential to individual intestinal cell types compared to adult stem cells or induced pluripotent stem cells (Richmond & Breault, 2018).

### **Control and guidance of stem cell development on-chip**

ISC-derived organoids have been used in recent years to experimentally address and dissect the individual spatiotemporal effects of different biochemical gradients on the growth and differentiation of ISCs. However, given the spherical nature of organoids, the stable recreation of physiological conditions over a longer period of culture has remained challenging (Wang, Kim, Hinman, et al., 2018). Microfluidically perfused organ-on-chip provides a platform to mimic

*in vivo*-like biochemical cues to guide stem cell differentiation with typical microanatomical features such as villi and crypts (Figure 1).



**Figure 1.** Defined gradients of biochemical and biophysical cues span along the crypt-villus axis in the small intestine, thereby determining cellular stemness and differentiation toward the tips of the villi. Triangles indicate only the gradient direction as the quantitative amounts of growth factors and ECM protein are still to be elucidated. Illustration adapted from (Wang, Kim, Hinman, et al., 2018).

It has been long known that many aspects of cell fate are dependent on the geometry and mechanics of their microenvironment, including the induction of apoptosis (C. S. Chen, Mrksich, Huang, Whitesides, & Ingber, 1997), cellular differentiation (Dupont et al., 2011; Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006), and proliferation rate (Murphy, McDevitt, & Engler, 2014). The presence of a flow through media stream has been demonstrated to be a requirement for the formation of 3D intestinal structures in cell line and primary cell-based intestinal models by modulating the biochemical availability of growth factors. The flow-dependent basolateral removal of the Wnt antagonist Dickkopf-1 and the elevated expression of the Frizzled-9 receptor were found to be required in the formation of epithelium villi-like protrusions (Shin, Hinojosa, Ingber, & Kim, 2019). Our existing knowledge on the individual growth factors driving ISC differentiation provides an excellent basis from which to engineer more realistic organ models with better accessibility. In this review, we are focusing on the use of the following two principal types of stem cells to differentiate and form intestinal tissue: adult stem cells and induced pluripotent stem cells. Both cell sources possess unique advantages and disadvantages in recapitulating the intestinal tissue (Table 1).

**Table 1. Pros and cons of the use of adult stem cells and induced pluripotent stem cells for the generation of intestinal tissue models**

Cell Source	Advantages	Disadvantages
Adult Stem Cells (ASCs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- semi-autonomous multipotent differentiation capacity (J. Kim, Koo, &amp; Knoblich, 2020)</li> <li>- preservation of tissue- and region-specific characteristics</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- could not be differentiated from non-epithelial tissue (endothelial cells, immune cells, etc.)</li> <li>- limited cellular diversity of ASC-derived organoids</li> <li>- limitations for expansion to large scale</li> <li>- limited by accessibility of tissue, difficult to isolate and purify from tissue</li> </ul>
Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- differentiation guided by external factors</li> <li>- somatic cells for reprogramming are easily accessible</li> <li>- pluripotent and useable for generation of isogenic models with high cellular diversity</li> <li>- lower frequency of DNA mutations during <i>in vitro</i> culture compared to ASCs (Kuijk et al., 2020), preservation of genetic identity <i>in vitro</i> over a longer period of time</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- variations in differentiation efficacy with limitations in cellular maturity</li> <li>- heterogeneity in generation of tissue-specific cell types</li> </ul>

A striking example of the potential of defined growth factor gradients to guide stem cell growth to intestinal tissues has been given by Wang et al. in the Transwell system (Wang et al., 2017; Wang, Kim, Gunasekara, et al., 2018). Arrays of artificial collagen-based crypts and villi structures were created by microfabrication and molding to recreate the topography of the intestine and the colon (Wang et al., 2017; Wang, Kim, Gunasekara, et al., 2018). The scaffold has been used to generate gradients of Wnt-3A, R-spondin, noggin, and gamma secretase inhibitor. These gradients enabled the establishment and maintenance of a crypt-villus axis composed of adult human ISCs that formed an epithelium containing proliferating progenitor cell compartments. Kasendra et al. recently presented a more complex model of the human duodenum that combines the advantages of organoids and organ-on-chip technologies (Kasendra et al., 2020; Kasendra et al., 2018). In this model, the tissue forms a polarized cell architecture under flow conditions and shows improved intestinal barrier function and differentiation of specialized cell subpopulations. This duodenum-on-chip system could exert mechanical stimulation to organoid-derived epithelial cells, resulting in improved tissue architecture. The perfusion of the tissue significantly improved cell-cell junctions and microvilli

density, further improving intestinal barrier function. Remarkably, it was demonstrated that organoid-derived cells in the duodenum chip have an increased similarity in their global gene expression profile to human adult duodenal tissue compared to conventional static organoid culture. Further, in the duodenum-on-chip system, organoid-derived cells show an improved metabolic capacity compared to Caco-2 cells due to an increased induction capability and expression of CYP3A4 (Kasendra et al., 2020). The ability to integrate and analyze patient-specific stem cells from different donors within the chip represents a decisive advantage over the use of immortalized cell lines such as Caco-2 or HT-29. Stem cells not only allow for the reflection of the host's genetic background but also possess the ability to self-organize into an *in vivo*-like tissue structure with improved functionality. Both aspects are major assets for studies on drug uptake and drug-drug interaction and its metabolization to predict drug efficacy and safety. Recently, Nikolaev et al. used synthetic hydrogels to guide the growth of adult human ISCs with intrinsic self-organization properties to tubular structures forming crypt- and villus-like domains (Nikolaev et al., 2020). Furthermore, in contrast to conventional organoids, the stem cell-derived tissue cultured in the hydrogel possesses a high regenerative potential, as demonstrated after stimulation with cytotoxic dextran sodium sulfate (DSS) to model colitis. The perfusion of the system was used to provide a continuous supply of nutrition as well as the removal of waste products and dead cells, allowing for a significantly extended lifespan of the organoid model with tenfold higher cell mass and the emerge of rare cell types such as M cells previously not observed in conventional organoid cultures (Nikolaev et al., 2020).

Similar approaches have also been demonstrated using hiPSCs. Workman et al. used epithelial cells isolated from hiPSC-derived human intestinal organoids and seeded them in a microfluidic perfused gut-on-chip. Flow conditions enabled the outgrowth of a 3D tissue model with spontaneous differentiation into epithelial-specific types, such as Paneth cells, goblet cells, enterocytes, enteroendocrine cells, transit amplifying cells, and Lgr5+ cells similar to *in vivo* cell populations (Workman et al., 2018). The immune responsiveness of the intestinal tissue after INF $\gamma$  stimulation was validated by the measurement of STAT1 phosphorylation after one hour and the upregulation of INF $\gamma$ -related genes three days after stimulation. Further, combined treatment with INF $\gamma$  and TNF resulted in an increased permeability of the epithelial cell layer. In another study, the same chip platform was used for the culture of stem cell-derived epithelial cells isolated from human colon organoids (Sontheimer-Phelps et al., 2020). Likewise, the OrganoPlate system, a plate-based cell culture system that allows pumpless media movement via a rocking platform, was used for cultivating hiPSC on a gel matrix to form a monolayered epithelial tube (Naumovska et al., 2020). The cells expressed the Paneth cell marker Lysozyme, the enterocyte cell marker Villin-1, and the neuroendocrine cell marker Chromogranin A. However, the expression of these cell marker proteins was diffuse and distributed over the entire tissue. Another shortcoming of the model consists in the absence of organized 3D epithelial structures.

These gut-on-chip systems strikingly demonstrate the huge potential of organ-on-chip platforms to precisely control environmental growth conditions, to guide the differentiation of stem cells, and to form improved intrinsically self-organized tissue with superior properties compared to traditional organoid cultures. Hence, the applications of ISCs include the possibility to investigate intestinal developmental biology and barrier function but also studies related to bacterial colonization, drug discovery, regenerative medicine, and responses to infections in a personalized approach (Crespo et al., 2017; Leslie et al., 2015; Negoro et al., 2018; Reiner, Sapir,

& Parichha, 2020). The generation and integration of hiPSC-derived immune cells will probably aid in the development of isogenic immune competent intestinal models derived from a single hiPSC line to avoid potential allogenic reactions.

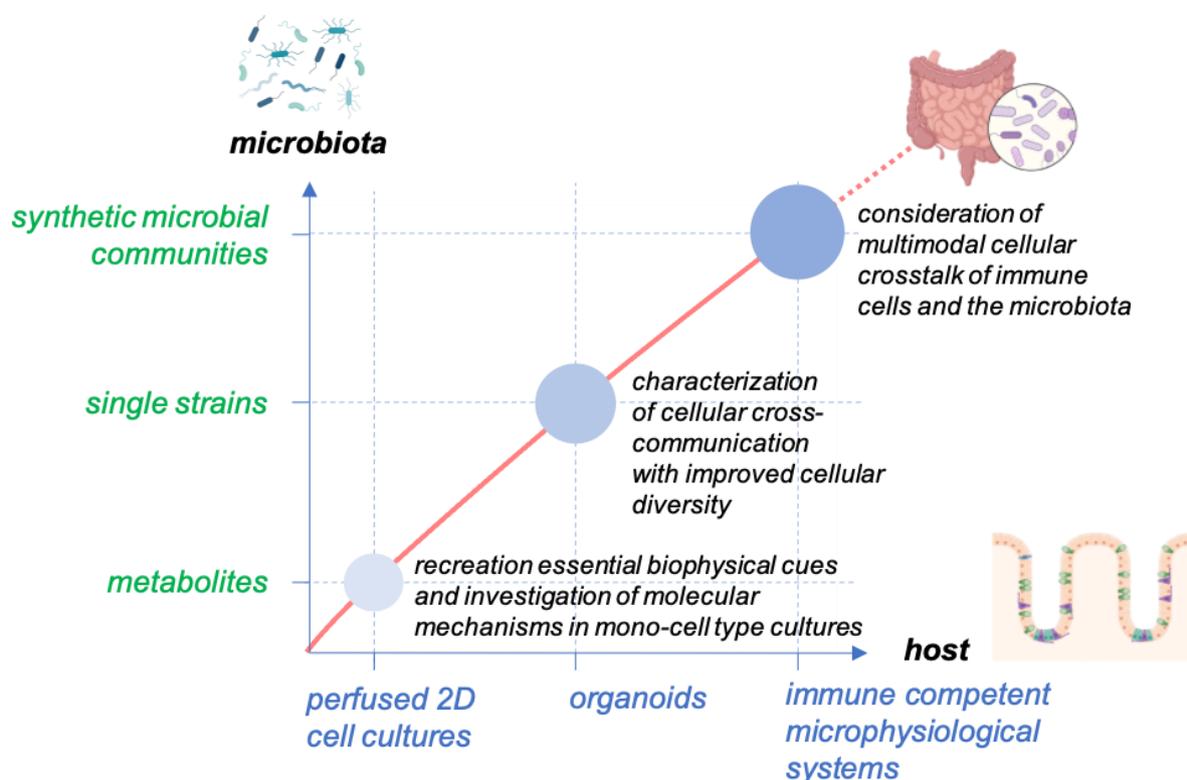
### **Gut-on-chip models to study microbiome-host interaction**

As a result of coevolution, niches of the human body are inhabited by a variety of commensal, mutualistic, and pathogenic microorganisms, including archae, bacteria, fungi, phages, protists, and viruses (Campion et al., 1988; Kapitan, Niemiec, Steimle, Frick, & Jacobsen, 2019; Ley et al., 2008; Lim et al., 2015; Lloyd-Price et al., 2017; Parfrey, Walters, & Knight, 2011; Qin et al., 2010). The gut provides a variety of niches serving as habitats for different ecological communities. On a macroscopic scale, biophysiological gradients determine the growth niche of microorganisms along the gut from the small intestine toward the rectum with an increase in the pH and the abundance of bile acids, whereas the availability of oxygen decreases. A change in the environmental conditions thereby determines microbial colonization with  $10^4$  CFU/ml bacteria in the small intestine up to  $10^8$  CFU/ml microorganisms in the terminal ileum, where elongated passage times and associated enrichment in nutrients provide ideal bacterial growth conditions (Donaldson, Lee, & Mazmanian, 2016; Kastl, Terry, Wu, & Albenberg, 2020). With that, the number of facultative anaerobic and obligate anaerobic species increases from the small intestine to the colon (Hayashi, Takahashi, Nishi, Sakamoto, & Benno, 2005; Thadepalli, Lou, Bach, Matsui, & Mandal, 1979).

The reliable monitoring of the microenvironment and its change upon tissue formation or bacterial colonization is key to control and understand the stem development and differentiation as well as the interaction of the intestinal tissue with the microbiota. Luminescent-based sensors integrated in organ-on-chip systems have been used to quantify medium dissolved oxygen levels (Rennert et al., 2015; Shah et al., 2016), cellular glucose consumption (Lin, Cherng-Wen, Roy, & Trau, 2009), and the changes of the pH by the release of lactate by metabolic active tissues or microorganisms (Kieninger, Weltin, Flamm, & Urban, 2018; Mousavi Shaegh et al., 2016; Weltin et al., 2017). To enable the growth of anaerobic bacteria in gut-on-chip, several platforms have been tailored to allow the stable formation of neighboring cell layers perfused with normoxic and hypoxic media streams. The characterization and quantification of microbiota-associated changes in the metabolic profile requires a reliable and continuous measurement of key metabolites and mediators of microbial colonization. Electrochemical enzyme-based biosensors and microbead-based microfluidic assays expand the ability of organ-on-chip systems to perform a detailed monitoring of metabolic parameters including the formation of glutamine and glutamate (Backer et al., 2013; Tolosa, Wassum, Maidment, & Monbouquette, 2013), the release of reactive oxygen species (Enomoto, Matharu, & Revzin, 2013), and the secretion of various cytokines (Cui et al., 2018; Usuba et al., 2016). The determination of transepithelial electrical resistance (TEER) is another widely used method to assess barrier function and has been adapted in recent years for organ-on-chip platforms. In particular, the combination of impedance spectroscopy and electrical simulation has been used to quantify cell layer capacitance as a measure of villi differentiation in gut-on-

chip models, which could be applied across different gut-on-chip platforms (van der Helm et al., 2019).

Gut-on-chip models have been used in recent years to better understand the complex interactions between the microbiota and their host. These systems allow to balance between robust and predictable approaches and the recreation of physiological-relevant culture conditions. The incremental nature of these models makes it relatively simple for them to be designed as “simple as possible and complex as required,” and they therefore offer additional flexibility in identifying contributing factors of host-microbiota interaction. The controlled escalation of biological complexity on the host side as well as in the composition of microbiota-derived factors and live microorganism communities will enable the elaboration and the proof of a complex interaction mechanism in a well-controlled and standardized environment provided by organ-on-chip platforms (Figure 2).



**Figure 2.** Concept for studying host-microbiome interaction in gut-on-chip. The models enable the balancing of the cellular complexity of host tissue and provide the technical basis to facilitate the outgrowth of host cells to self-organized organoid structures with high cellular diversity. The systems allow the scaling of the biological complexity of the host and the microbiota to study the interaction of the host tissue with the microbiota from microbial metabolites to single microbial strains and diverse microbial communities.

Examples of a successful application of this approach have already been provided. Sontheimer-Phelps et al. recently reported a system lined with primary patient-derived colonic epithelial cells (Sontheimer-Phelps et al., 2020). A mucus bilayer is built up in the chip by perfused epithelial cells and provides a suitable substrate for colonization with living microbiota to study host-microbiome interactions in the colon in more detail. Similarly, Shin et al. generated an anoxic-oxic interface on a chip inhabited with CaCo 2-cells and implemented *Bifidobacterium adolescentis* (Shin, Wu, et al., 2019). The system is able to co-cultivate bacteria for up to one week without the impairment of epithelial performance. This represents an interesting platform to assess mechanistic questions regarding Bifidobacteria-host interactions in the neonate period in more detail. Similarly, Zhang et al. reported the co-culture of the obligate anaerobic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* with colon organoid-derived epithelial cells in their physiomimetic platform for up to four days. In the study, the authors were able to uncover the mechanisms of an anti-inflammatory host response related to butyrate release with the downregulation of the gene expression of histone deacetylase complexes, Toll-like receptors, and nuclear factor kB (NF-kB) (Zhang et al., 2021). Different approaches have also been used to reconstitute the microbiome and its function *in vitro* in a more complex and detailed manner. A top-down approach consists of using the full microbiome derived from human stool samples, which would in principle mimic the *in vivo* situation ideally. However, it remains challenging to characterize its full composition in a short period of time before transfer into an *in vitro* model even under hypoxic conditions. Jalili-Firoozinezhad and co-workers managed to implement complex microbiomes in their *in vivo*-like system but pointed out that overgrowth and species shift due to artificial culture conditions might be problematic. Thus, a sophisticated pre-culture step (i.e., in large SHIME bioreactors) is still required to expand a defined microbiota prior to colonization experiments (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). However, these studies illustrate nicely the importance of advanced *in vitro* models offering the ability to precisely dissect individual microbiota in humans.

Although conventional organoid cultures already provide invaluable insight into detailed ISC dynamics, their application for long-term studies or the dissection of host-microbiota interaction has some limitations. The long-term exposure of microbial metabolites or co-culturing living microorganisms in an enclosed lumen of organoids under static conditions favors the rapid overgrowth of bacteria, eventually resulting in the rupture and cell death of the organoids (Dutta & Clevers, 2017; J. Kim et al., 2020). The microfluidic perfusion of gut-on-chip offers the ability of the long-term exposure of the tissue to microbiota-associated metabolites under well-defined conditions. Perfusion media can be supplemented with defined single molecules of microbial metabolites up to filtrates of stool samples, single strain microorganisms, or defined microbial communities. To better recapitulate the *in vivo* situation, gut-on-chip platforms could be leveraged to mimic the conditions of different sides of the gut by use of adult stem cells derived from specific sections (i.e., intestine, colon, etc.) to generate side-specific tissue (Table 2). Colonization with oxygen-scavenging bacteria in combination with the continuous sensing and regulation of oxygen levels would allow the maintenance of physiological-relevant oxygenation levels and a co-culture with defined anaerobic and facultative-anaerobic bacteria under homeostatic conditions.

**Table 2. Key references of selected gut-on-chip systems with important characteristics to recreate the intestinal environment**

Reference	Model characteristics
Naumovska et al., 2020	plate-based pumpless monolayer cell culture system for hiPSC-derived epithelial cells
Wang et al., 2017; Wang, Kim, Gunasekara, et al., 2018	recapitulation of the crypt region and the stem cell niche of the intestine and colon within a hydrogel matrix
Kasendra et al., 2018; Kasendra et al., 2020; Sontheimer-Phelps et al., 2020	cultivation of organoid-derived polarized epithelial cells of the small intestine, duodenum, and colon-on-chip
Nikolaev et al., 2020	Hydrogel-confined crypt structures enable prolonged lifespan and improved cellular diversity of murine ISC-derived organoids
Workman et al., 2018	hiPSC-derived human intestinal epithelial cells form 3D crypt- and villus-like structures with self-patterned Paneth cells, goblet cells, enterocytes, enteroendocrine cells, transit amplifying cells, and Lgr5+ cells
Maurer et al., 2019	recapitulation of bacteria-fungal interaction in immunocompetent intestinal model
Shah et al., 2016	homeostatic colonization of epithelial cell layer with anaerobic bacteria under hypoxic conditions
Shin, Wu, et al., 2019	establishment of a hypoxic interface at an epithelial cell layer for co-culture with anaerobic bacteria
Jalili-Firoozinezhad et al., 2019	tunable oxygen gradients allow culture of obligate anaerobic bacteria and bacterial communities
Zhang et al., 2021	oxygen gradient allows stable co-culture of <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> and identification of short chain fatty acid-related anti-inflammatory effects

## Modeling human intestinal disease on-chip

### Inflammatory diseases

Gut-on-chip models are offering a new avenue through which to study the pathophysiological mechanisms of gastrointestinal diseases. For example, patients suffering from Celiac disease (CeD), an autoimmune disease that affects about 1% of the human population, develop a strong inflammatory response causing serious damage to the small intestine upon the uptake of a gluten-containing diet (Caio et al., 2019). Still, the mechanistic details of the disease await further investigation before effective drugs can be developed. Moerkens et al. recently proposed an immunocompetent organ-on-chip model using both hiPSC and primary epithelial

cells to better mimic the genetic background and environmental factors. Using this system, it is now possible to determine the disease onset in CeD patients (Moerkens, Mooiweer, Withoff, & Wijmenga, 2019). Similarly, gut-on-chip models have been used to study the disease mechanism of inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), characterized by chronically relapsing intestinal inflammation and representing a worldwide healthcare problem with continually increasing incidence (Xavier & Podolsky, 2007). A 3D gut model based on primary patient-derived colonic epithelial cells forming a mucus layer was used to recapitulate prostaglandin E2-dependent mucus volume expansion via the activation of the Na-K-Cl cotransporter 1 ion channel (Sontheimer-Phelps et al., 2020). In a similar study, the pathophysiology of DSS-induced inflammation was also recapitulated in the presence of *E. coli* (Shin & Kim, 2018). DSS cessation quickly induced the recovery of barrier integrity, villus formation, and mucus production, indicating that this model might also be suitable to study processes of mucosal regeneration in IBD. The effects of microbial colonization were also investigated with a mixture of commensal *Streptococcus thermophilus*, Bifidobacteria, and Lactobacilli (VSL#3) as well as pathogenic enteroinvasive *E. coli* (EIEC). In this study, the authors were able to replicate inflammation-associated tissue damage and the invasion of EIEC. Furthermore, they proved the growth-limiting effect of VSL#3 on EIEC colonization *in vitro* (H. J. Kim, Li, Collins, & Ingber, 2016). Recently, our group has been able to further replicate the protective characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* against the tissue infiltration of the opportunistic yeast *Candida albicans* in an immunocompetent gut-on-chip model. In addition to peripheral immune cells, this model also contained functional mucosal macrophages and dendritic cells integrated into the epithelial tissue layer (Maurer et al., 2019). In contrast to conventional organoid cultures, chip-based ISC cultures enable long-term studies and perfusion with peripheral immune cells with superior accessibility and the continuous monitoring of key environmental factors to maintain and manipulate disease-related growth conditions. In combination with a homeostatic bacterial co-culture, these systems might serve in future studies as patient-specific tools to develop new therapeutics or probiotics that modulate the mucus barrier.

### **Infectious diseases**

Gut-on-chip has further been used to study infectious diseases, including *Clostridioides difficile* infection (CDI), Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC), and viral infections. Infection with *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium difficile*) is the most common cause of hospital-acquired gastrointestinal infections (Abbas & Zackular, 2020; Czepiel et al., 2019). While several animal models have been used to study CDI *in vivo*, the manipulation of infection processes and the direct assessment of host-bacterial interaction is challenging (X. Chen et al., 2008; Darkoh, Odo, & DuPont, 2016; Kuehne et al., 2010). Advanced gut-on-chip models have been described to investigate CDI. This model allows for the co-culture of primary epithelial and endothelial cells, with the addition of a complex microbiome under anaerobic culture conditions for several days (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019). This is a promising translational tool to study the CDI infection process and associated damage in humans. As with CDI, infections with EHEC are frequent, with up 100,000 cases per year in the U.S. and is associated with several symptoms such as severe bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome (HUS). Interestingly, the microbiota seem to be a critical determinant of susceptibility to EHEC infection. Studies in mice revealed that not only is a 100,000-fold higher dose of the bacterium required ( $10^7$  microbes) but that the whole murine microbiome also needs to be

depleted to induce symptoms. This pathology is quite different in humans, where as little as  $10^2$  microbes are sufficient to cause severe symptoms (Ikeda, Ito, & Honda, 2004; Keepers, Psojka, Gross, & Obrig, 2006; Mohawk & O'Brien, 2011). Tovagliari et al. were able to recapitulate this phenomenon *in vitro* in a gut-on-chip model by co-culturing EHEC in the context of a murine or a human microbiome. The species-specific tissue damage induced by the human microbiome could be verified. This model was also used to identify several metabolites related to or even causative of the high susceptibility of humans to EHEC (Tovagliari et al., 2019). Finally, human enteroviruses are responsible for an estimated 10–15 million infections and at least 30,000–50,000 hospitalizations per year (Villenave et al., 2017). Viruses can replicate in the epithelial cells of the gastrointestinal tract and subsequently disseminate to secondary sites of infection, such as the respiratory tract (Racaniello, 2006). So far, no approved drugs for the treatment of enterovirus infections in humans besides polio exist (Racaniello, 2006). Villenave et al. used coxsackievirus B1 (CVB1) as a prototype enterovirus strain and established a human infection model based on a human gut-on-a-chip microfluidic device to study replication and infectious virus production *in vitro* (Villenave et al., 2017). With this model, they were able to follow the infection of epithelial cells, the release of inflammatory cytokines and the secretion of infectious virions. The model also permitted to reproduce the different susceptibility of epithelial and endothelial cell layers for viral infection by using separate microchannels, thus independently perfusing the vascular and epithelial sides of the polarized gut tissue. Gut-on-chip models have further just recently been used to study infection with human parasites. "Mini-intestines" fully accessible from the luminal side enabled colonization with *Cryptosporidium parvum*, an obligate parasite causing life-threatening diarrhea in immunocompromised adult hosts and in infants. The tissue model supported the full life cycle of the parasite, thereby allowing for the first time long-term studies in a primary cell-derived *in vitro* culture system (Nikolaev et al., 2020).

With the emergence of the SARS-CoV2 virus and the COVID-19 pandemic, the need for sophisticated models to study viral infection in human tissue has become even more urgent. Human small intestinal organoids have proven to be valuable tissue models to study virus docking to ACE-2 and its replication within enterocytes. Combining ISC-derived organoids with the advantages of organ-on-chip would offer additional options to manipulate the viral infection route and provide different parameters to faithfully recreate the intestinal microenvironment, prolong the culture of organoids with the improvement of cellular differentiation, and offer a variety of additional monitoring and readout techniques available for gut-on-chip systems (Lamers et al., 2020).

### **Colorectal cancer**

The effects of SCFA released by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) bacteria on the growth of colorectal cancer cells was recently investigated in a version of the HuMiX model, a modular, microfluidics-based gut-on-chip model, which allows the co-culture of human and microbial cells and facilitates anaerobic culture conditions (Greenhalgh et al., 2019). Symbiotic treatment with a high-fiber diet was simulated in this model, and the generation of organics and SCFAs was assessed. Strikingly, it was demonstrated that SCFAs and lactate production were altered by a simulated high-fiber diet compared to a reference diet medium containing only simple sugars. The simulated high-fiber diet caused an increased expression of oncogenes

and proinflammatory signaling in the absence of LGG bacteria, whereas in the presence of LGG, both gene clusters were found to be significantly downregulated and associated with a reduced cell proliferation rate of primary colon rectal cancer cells. This study illustrates the capability of gut-on-chip systems to precisely dissect the individual aspects of the microbiota-host crosstalk at the metabolic level. Similar studies will hopefully further expand our insight into this complex relationship by identifying individual metabolic targets with potential as tailored pre- and probiotic-based therapeutic options. Uncovering individual beneficial metabolic profiles such as by the application of hiPSC-based organ models and individualized microbiota surrogates in personalized *in vitro* models would represent a major step forward in the treatment of IBD and IBD sequelae such as colorectal cancer.

### Conclusions and outlook

The recent advances in the development of organ-on-chip technologies show not only the current advantages of these models but also highlight future possibilities in combination with stem-cell engineering and microfluidics. Such models have already proven to produce data similar to *in vivo* contexts in studies ranging from infectious disease modeling to drug metabolism. The benefits and wide range of applications of the gut-on-chip models can be attributed to their versatility and their capability to increment parameters of various types, from multiple cell types to medium gradients, flow mechanics, or global topography. Despite these numerous advances in the complexification of microfluidics systems, many requirements still need to be met in order to obtain models with an *in vitro* microenvironment that closely mimics its *in vivo* counterpart.

Gut-on-chip technology offers unique options by providing the technical basis for a reliable and guided differentiation of stem cells to human intestinal tissue offering combining the strengths of self-patterned stem cell-based organoids with the ability of precisely regulated biochemical and biophysical cues in a spatiotemporal manner. The manipulation of the microenvironment by tissue engineering and the guided growth of stem cells derived from patients will create a new angle for the dissection of host-microbiota interaction with scalable levels of complexity for the host and the microbiota. The ability to monitor and perturb the milieu in real time will help in understanding the dynamics and effects of changes in the microenvironment through the manipulation of isolated biochemical and biophysical cues. Further, these systems will help in identifying the molecular and cellular targets of disease-related mechanisms for individual patients that cannot be resolved in similar detail in animal models. In the case of an organ-on-chip modeling of the gastro-intestinal tract, a more "complete" model would need to be composed of adjacent channels with human microvascular endothelium, tissue-resident immune cells, commensal or pathogenic bacteria, and the application of cyclic mechanical forces that mimic peristalsis-like deformations. The additional presence of muscle or nervous system cells could also contribute to creating a faithful model. Future efforts need to be undertaken in the development of more complex models that could be used for modeling human diseases, for drug development, and for further use in personalized medicine.

Clearly, organ-on-chip and in particular complex gut-on-chip models have several limitations. In contrast to conventional organoid cultures, their usability in high-throughput testing is limited. Further, ISC-based gut-on-chip as well as ISC-derived organoids represent reductionistic models, which do not reflect the full physiology offered by animal models. However, we are convinced that the combination of stem cell-based organoid culture and organ-on-chip will help pave the way to significantly expand our knowledge in the development and maintenance of the stem cell niche and its role in the onset of related diseases. It has already been demonstrated that this approach allows an increased organoid lifespan with higher cellular diversity and at the same time offers a multitude of options by which to manipulate and monitor essential biochemical and biophysical cues in tissue development and its interaction with the microbiota. Several challenges such as the uniformization of the systems and its standardization as “fit for purpose” and “ready to use” need to be overcome to allow researchers and non-organ-on-chip specialists easy access to this technology to allow its routine use in biomedical research.

### Acknowledgments

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through the Cluster of Excellence “Balance of the Microverse” under Germany’s Excellence Strategy - EXC 2051 - Project-ID 690 390713860 and the European Commission through the Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) Innovative Training Network EUROoC (Grant no. 812954) to A.S.M. This work was also supported by the Agence Nationale de la Recherche ANR-17-CE14-0021 (SyNEDI to M.M.M.) and a “New Team” grant (BOGUS to M.M.M.) from the Bioregative Regenerative Medicine Cluster, University of Nantes and Région Pays de la Loire.

### References

- Abbas, A., & Zackular, J. P. (2020). Microbe-microbe interactions during *Clostridioides difficile* infection. *Curr Opin Microbiol*, 53, 19-25. doi:10.1016/j.mib.2020.01.016
- Backer, M., Rakowski, D., Poghosian, A., Biselli, M., Wagner, P., & Schoning, M. J. (2013). Chip-based amperometric enzyme sensor system for monitoring of bioprocesses by flow-injection analysis. *J Biotechnol*, 163(4), 371-376. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.014
- Beumer, J., & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(1), 39-53. doi:10.1038/s41580-020-0278-0
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C., & Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*, 17(1), 142. doi:10.1186/s12916-019-1380-z
- Campion, G. V., McCrae, F., Alwan, W., Watt, I., Bradfield, J., & Dieppe, P. A. (1988). Idiopathic destructive arthritis of the shoulder. *Semin Arthritis Rheum*, 17(4), 232-245. doi:10.1016/0049-0172(88)90009-1
- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., & Ingber, D. E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, 276(5317), 1425-1428. doi:10.1126/science.276.5317.1425

- Chen, X., Katchar, K., Goldsmith, J. D., Nanthakumar, N., Cheknis, A., Gerding, D. N., & Kelly, C. P. (2008). A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, *135*(6), 1984-1992. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.002
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, *154*(2), 274-284. doi:10.1016/j.cell.2013.07.004
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, *165*(7), 1586-1597. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082
- Clevers, H. C. (2019). Organoids: Avatars for Personalized Medicine. *Keio J Med*, *68*(4), 95. doi:10.2302/kjm.68-006-ABST
- Crespo, M., Vilar, E., Tsai, S. Y., Chang, K., Amin, S., Srinivasan, T., . . . Chen, S. (2017). Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med*, *23*(7), 878-884. doi:10.1038/nm.4355
- Cui, X., Liu, Y., Hu, D., Qian, W., Tin, C., Sun, D., . . . Lam, R. H. W. (2018). A fluorescent microbead-based microfluidic immunoassay chip for immune cell cytokine secretion quantification. *Lab Chip*, *18*(3), 522-531. doi:10.1039/c7lc01183k
- Czepiel, J., Drozd, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., . . . Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *38*(7), 1211-1221. doi:10.1007/s10096-019-03539-6
- Darkoh, C., Odo, C., & DuPont, H. L. (2016). Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of *Clostridium difficile*. *mBio*, *7*(4). doi:10.1128/mBio.01237-16
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, *14*(1), 20-32. doi:10.1038/nrmicro3552
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179-183. doi:10.1038/nature10137
- Dutta, D., & Clevers, H. (2017). Organoid culture systems to study host-pathogen interactions. *Curr Opin Immunol*, *48*, 15-22. doi:10.1016/j.coi.2017.07.012
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, *126*(4), 677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- Enomoto, J., Matharu, Z., & Revzin, A. (2013). Electrochemical biosensors for on-chip detection of oxidative stress from cells. *Methods Enzymol*, *526*, 107-121. doi:10.1016/B978-0-12-405883-5.00006-5
- Greenhalgh, K., Ramiro-Garcia, J., Heinken, A., Ullmann, P., Bintener, T., Pacheco, M. P., . . . Wilmes, P. (2019). Integrated In Vitro and In Silico Modeling Delineates the Molecular Effects of a Synbiotic Regimen on Colorectal-Cancer-Derived Cells. *Cell Rep*, *27*(5), 1621-1632 e1629. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.001
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*, *54*(Pt 11), 1093-1101. doi:10.1099/jmm.0.45935-0

- Huang, C. Y., Liu, C. L., Ting, C. Y., Chiu, Y. T., Cheng, Y. C., Nicholson, M. W., & Hsieh, P. C. H. (2019). Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J Biomed Sci*, 26(1), 87. doi:10.1186/s12929-019-0578-x
- Huh, D., Kim, H. J., Fraser, J. P., Shea, D. E., Khan, M., Bahinski, A., . . . Ingber, D. E. (2013). Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc*, 8(11), 2135-2157. doi:10.1038/nprot.2013.137
- Ikeda, M., Ito, S., & Honda, M. (2004). Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. *Pediatr Nephrol*, 19(5), 485-489. doi:10.1007/s00467-003-1395-7
- Jalili-Firoozinezhad, S., Gazzaniga, F. S., Calamari, E. L., Camacho, D. M., Fadel, C. W., Bein, A., . . . Ingber, D. E. (2019). A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng*, 3(7), 520-531. doi:10.1038/s41551-019-0397-0
- Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., & Jacobsen, I. D. (2019). Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 422, 265-301. doi:10.1007/82\_2018\_117
- Kasendra, M., Luc, R., Yin, J., Manatakis, D. V., Kulkarni, G., Lucchesi, C., . . . Karalis, K. (2020). Duodenum Intestine-Chip for preclinical drug assessment in a human relevant model. *Elife*, 9. doi:10.7554/eLife.50135
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., . . . Ingber, D. E. (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep*, 8(1), 2871. doi:10.1038/s41598-018-21201-7
- Kastl, A. J., Jr., Terry, N. A., Wu, G. D., & Albenberg, L. G. (2020). The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 9(1), 33-45. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.07.006
- Keepers, T. R., Psofka, M. A., Gross, L. K., & Obrig, T. G. (2006). A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. *J Am Soc Nephrol*, 17(12), 3404-3414. doi:10.1681/ASN.2006050419
- Kieninger, J., Weltin, A., Flamm, H., & Urban, G. A. (2018). Microsensor systems for cell metabolism - from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip*, 18(9), 1274-1291. doi:10.1039/c7lc00942a
- Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2013). Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol (Camb)*, 5(9), 1130-1140. doi:10.1039/c3ib40126j
- Kim, H. J., Li, H., Collins, J. J., & Ingber, D. E. (2016). Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(1), E7-15. doi:10.1073/pnas.1522193112
- Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(10), 571-584. doi:10.1038/s41580-020-0259-3

- Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A., & Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467(7316), 711-713. doi:10.1038/nature09397
- Kuijk, E., Jager, M., van der Roest, B., Locati, M. D., Van Hoeck, A., Korzelius, J., . . . Cuppen, E. (2020). The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells. *Nat Commun*, 11(1), 2493. doi:10.1038/s41467-020-16323-4
- Lamers, M. M., Beumer, J., van der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T. I., . . . Clevers, H. (2020). SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*, 369(6499), 50-54. doi:10.1126/science.abc1669
- Leslie, J. L., Huang, S., Opp, J. S., Nagy, M. S., Kobayashi, M., Young, V. B., & Spence, J. R. (2015). Persistence and toxin production by *Clostridium difficile* within human intestinal organoids result in disruption of epithelial paracellular barrier function. *Infect Immun*, 83(1), 138-145. doi:10.1128/IAI.02561-14
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., . . . Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651. doi:10.1126/science.1155725
- Lim, E. S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I. K., Droit, L., Ndao, I. M., . . . Holtz, L. R. (2015). Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med*, 21(10), 1228-1234. doi:10.1038/nm.3950
- Lin, Z., Cheng-Wen, T., Roy, P., & Trau, D. (2009). In-situ measurement of cellular microenvironments in a microfluidic device. *Lab Chip*, 9(2), 257-262. doi:10.1039/b806907g
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., . . . Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61-66. doi:10.1038/nature23889
- Maurer, M., Gresnigt, M. S., Last, A., Wollny, T., Berlinghof, F., Pospich, R., . . . Mosig, A. S. (2019). A three-dimensional immunocompetent intestine-on-chip model as in vitro platform for functional and microbial interaction studies. *Biomaterials*, 220, 119396. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119396
- Moerkens, R., Mooiweer, J., Withoff, S., & Wijmenga, C. (2019). Celiac disease-on-chip: Modeling a multifactorial disease in vitro. *United European Gastroenterol J*, 7(4), 467-476. doi:10.1177/2050640619836057
- Mohawk, K. L., & O'Brien, A. D. (2011). Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 258185. doi:10.1155/2011/258185
- Mosig, A. S. (2017). Organ-on-chip models: new opportunities for biomedical research. *Future Sci OA*, 3(2), FSO130. doi:10.4155/fsoa-2016-0038
- Mousavi Shaegh, S. A., De Ferrari, F., Zhang, Y. S., Nabavinia, M., Bintah Mohammad, N., Ryan, J., . . . Dokmeci, M. R. (2016). A microfluidic optical platform for real-time monitoring of pH and oxygen in microfluidic bioreactors and organ-on-chip devices. *Biomicrofluidics*, 10(4), 044111. doi:10.1063/1.4955155

- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 331-341. doi:10.1038/nri1057
- Murphy, W. L., McDevitt, T. C., & Engler, A. J. (2014). Materials as stem cell regulators. *Nat Mater*, 13(6), 547-557. doi:10.1038/nmat3937
- Naumovska, E., Alderink, G., Wong Valencia, C., Kosim, K., Nicolas, A., Brown, S., . . . Kurek, D. (2020). Direct On-Chip Differentiation of Intestinal Tubules from Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 21(14). doi:10.3390/ijms21144964
- Negoro, R., Takayama, K., Kawai, K., Harada, K., Sakurai, F., Hirata, K., & Mizuguchi, H. (2018). Efficient Generation of Small Intestinal Epithelial-like Cells from Human iPSCs for Drug Absorption and Metabolism Studies. *Stem Cell Reports*, 11(6), 1539-1550. doi:10.1016/j.stemcr.2018.10.019
- Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., . . . Lutolf, M. P. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, 585(7826), 574-578. doi:10.1038/s41586-020-2724-8
- Otani, S., & Coopersmith, C. M. (2019). Gut integrity in critical illness. *J Intensive Care*, 7, 17. doi:10.1186/s40560-019-0372-6
- Parfrey, L. W., Walters, W. A., & Knight, R. (2011). Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Front Microbiol*, 2, 153. doi:10.3389/fmicb.2011.00153
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. doi:10.1038/nature08821
- Racaniello, V. R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344(1), 9-16. doi:10.1016/j.virol.2005.09.015
- Reiner, O., Sapir, T., & Parichha, A. (2020). Using multi-organ culture systems to study Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-020-00936-8
- Rennert, K., Steinborn, S., Groger, M., Ungerbock, B., Jank, A. M., Ehgartner, J., . . . Mosig, A. S. (2015). A microfluidically perfused three dimensional human liver model. *Biomaterials*, 71, 119-131. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.043
- Richmond, C. A., & Breault, D. T. (2018). Move Over Caco-2 Cells: Human-Induced Organoids Meet Gut-on-a-Chip. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(4), 634-635. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.01.016
- Shah, P., Fritz, J. V., Glaab, E., Desai, M. S., Greenhalgh, K., Frachet, A., . . . Wilmes, P. (2016). A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat Commun*, 7, 11535. doi:10.1038/ncomms11535
- Shin, W., Hinojosa, C. D., Ingber, D. E., & Kim, H. J. (2019). Human Intestinal Morphogenesis Controlled by Transepithelial Morphogen Gradient and Flow-Dependent Physical Cues in a Microengineered Gut-on-a-Chip. *iScience*, 15, 391-406. doi:10.1016/j.isci.2019.04.037
- Shin, W., & Kim, H. J. (2018). Intestinal barrier dysfunction orchestrates the onset of inflammatory host-microbiome cross-talk in a human gut inflammation-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(45), E10539-E10547. doi:10.1073/pnas.1810819115

- Shin, W., Wu, A., Massidda, M. W., Foster, C., Thomas, N., Lee, D. W., . . . Kim, H. J. (2019). A Robust Longitudinal Co-culture of Obligate Anaerobic Gut Microbiome With Human Intestinal Epithelium in an Anoxic-Oxic Interface-on-a-Chip. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 13. doi:10.3389/fbioe.2019.00013
- Sontheimer-Phelps, A., Chou, D. B., Tovaglieri, A., Ferrante, T. C., Duckworth, T., Fadel, C., . . . Ingber, D. E. (2020). Human Colon-on-a-Chip Enables Continuous In Vitro Analysis of Colon Mucus Layer Accumulation and Physiology. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 9(3), 507-526. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.11.008
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., . . . Wells, J. M. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332), 105-109. doi:10.1038/nature09691
- Sun, H., Chow, E. C., Liu, S., Du, Y., & Pang, K. S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(4), 395-411. doi:10.1517/17425255.4.4.395
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(3), 183-193. doi:10.1038/nrm.2016.8
- Tan, H. Y., Trier, S., Rahbek, U. L., Dufva, M., Kutter, J. P., & Andresen, T. L. (2018). A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies. *PLoS One*, 13(5), e0197101. doi:10.1371/journal.pone.0197101
- Thadepalli, H., Lou, M. A., Bach, V. T., Matsui, T. K., & Mandal, A. K. (1979). Microflora of the human small intestine. *Am J Surg*, 138(6), 845-850. doi:10.1016/0002-9610(79)90309-x
- Tolosa, V. M., Wassum, K. M., Maidment, N. T., & Monbouquette, H. G. (2013). Electrochemically deposited iridium oxide reference electrode integrated with an electroenzymatic glutamate sensor on a multi-electrode array microprobe. *Biosens Bioelectron*, 42, 256-260. doi:10.1016/j.bios.2012.10.061
- Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Geirnaert, A., Prantil-Baun, R., Camacho, D. M., Chou, D. B., . . . Ingber, D. E. (2019). Species-specific enhancement of enterohemorrhagic E. coli pathogenesis mediated by microbiome metabolites. *Microbiome*, 7(1), 43. doi:10.1186/s40168-019-0650-5
- Usuba, R., Yokokawa, M., Ackermann, T. N., Llobera, A., Fukunaga, K., Murata, S., . . . Suzuki, H. (2016). Photonic Lab-on-a-Chip for Rapid Cytokine Detection. *ACS Sensors*, 1(8), 979-986. doi:10.1021/acssensors.6b00193
- van der Helm, M. W., Henry, O. Y. F., Bein, A., Hamkins-Indik, T., Cronce, M. J., Leineweber, W. D., . . . Segerink, L. I. (2019). Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organs-on-chips using impedance spectroscopy. *Lab Chip*, 19(3), 452-463. doi:10.1039/c8lc00129d
- Villenave, R., Wales, S. Q., Hamkins-Indik, T., Papafragkou, E., Weaver, J. C., Ferrante, T. C., . . . Ingber, D. E. (2017). Human Gut-On-A-Chip Supports Polarized Infection of Coxsackie B1 Virus In Vitro. *PLoS One*, 12(2), e0169412. doi:10.1371/journal.pone.0169412
- Wang, Y., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Bultman, S. J., Sims, C. E., . . . Allbritton, N. L. (2017). A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus

architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials*, 128, 44-55. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.005

Wang, Y., Kim, R., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Nguyen, D. L., . . . Allbritton, N. L. (2018). Formation of Human Colonic Crypt Array by Application of Chemical Gradients Across a Shaped Epithelial Monolayer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(2), 113-130. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.10.007

Wang, Y., Kim, R., Hinman, S. S., Zwarycz, B., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2018). Bioengineered Systems and Designer Matrices That Recapitulate the Intestinal Stem Cell Niche. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(3), 440-453 e441. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.01.008

Weltin, A., Hammer, S., Noor, F., Kaminski, Y., Kieninger, J., & Urban, G. A. (2017). Accessing 3D microtissue metabolism: Lactate and oxygen monitoring in hepatocyte spheroids. *Biosens Bioelectron*, 87, 941-948. doi:10.1016/j.bios.2016.07.094

Workman, M. J., Gleeson, J. P., Troisi, E. J., Estrada, H. Q., Kerns, S. J., Hinojosa, C. D., . . . Barrett, R. J. (2018). Enhanced Utilization of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids Using Microengineered Chips. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(4), 669-677 e662. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.12.008

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. doi:10.1038/nature06005

Zhang, J., Huang, Y. J., Yoon, J. Y., Kemmitt, J., Wright, C., Schneider, K., . . . Griffith, L. G. (2021). Primary human colonic mucosal barrier crosstalk with super oxygen-sensitive *Faecalibacterium prausnitzii* in continuous culture. *Med (N Y)*, 2(1), 74-98 e79. doi:10.1016/j.medj.2020.07.001

**REVUE DANS MÉDECINE ET SCIENCES (2019) : « FAÇONNER  
L'INTESTIN À PARTIR DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES »**

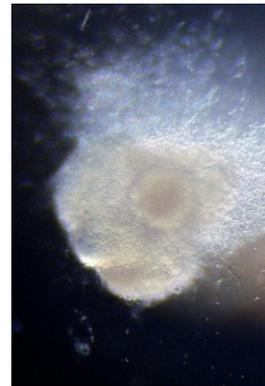
Cette revue, au spectre plus large que les articles présentés dans cette thèse, fait l'état de l'art de l'utilisation du modèle organoïde pour étudier le tube digestif.

> 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<sup>1,2\*</sup>, Élise Loffet<sup>1\*</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>,  
Maxime M. Mahé<sup>1,3</sup>



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.

<sup>1</sup>UMR 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.

<sup>2</sup>Service de pédiatrie générale et génétique médicale, CHRU de Brest, Brest, France.

<sup>3</sup>Division 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](mailto: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 musculuse 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-renouveau 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 TGF $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ). 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.

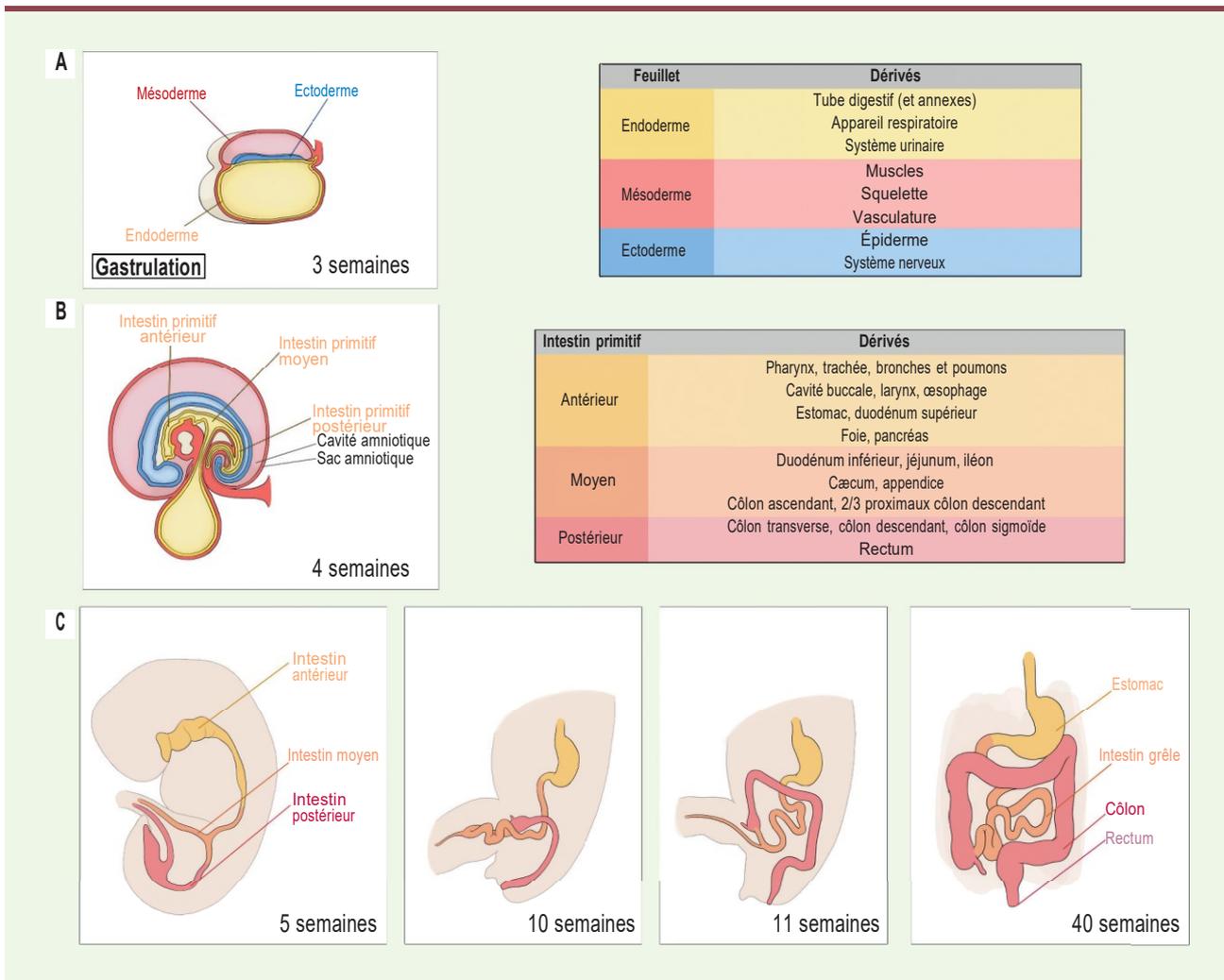
#### L'œsophage

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*<sup>1</sup>, 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 HNF1 $\beta$  (*hepatocyte nuclear factor-1b*). 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-)

<sup>1</sup> Correspondent aux parties haute et basse de l'estomac.



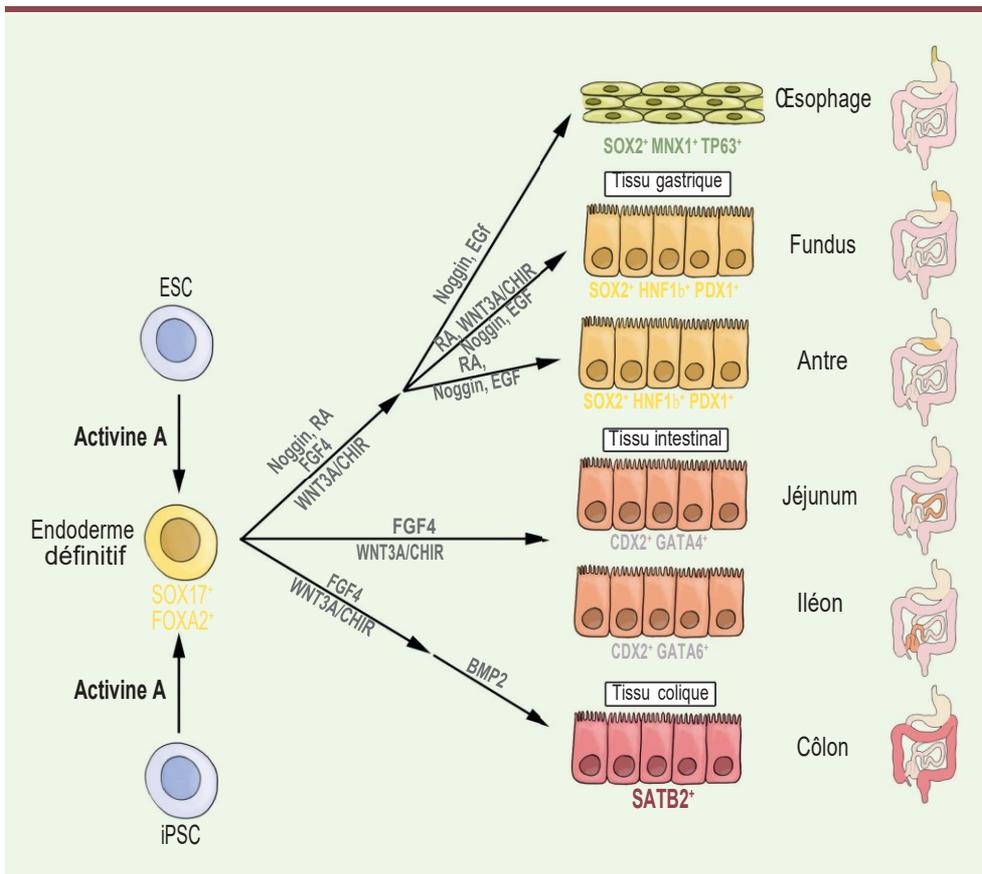
**Figure 1. Développement embryonnaire de l'intestin.** **A.** À 3 semaines de gestation, la gastrulation commence et donne naissance aux trois feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Les tissus dérivant de chaque feuillet sont présentés dans le tableau. **B.** L'intestin 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'antré 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-gliale 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. 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

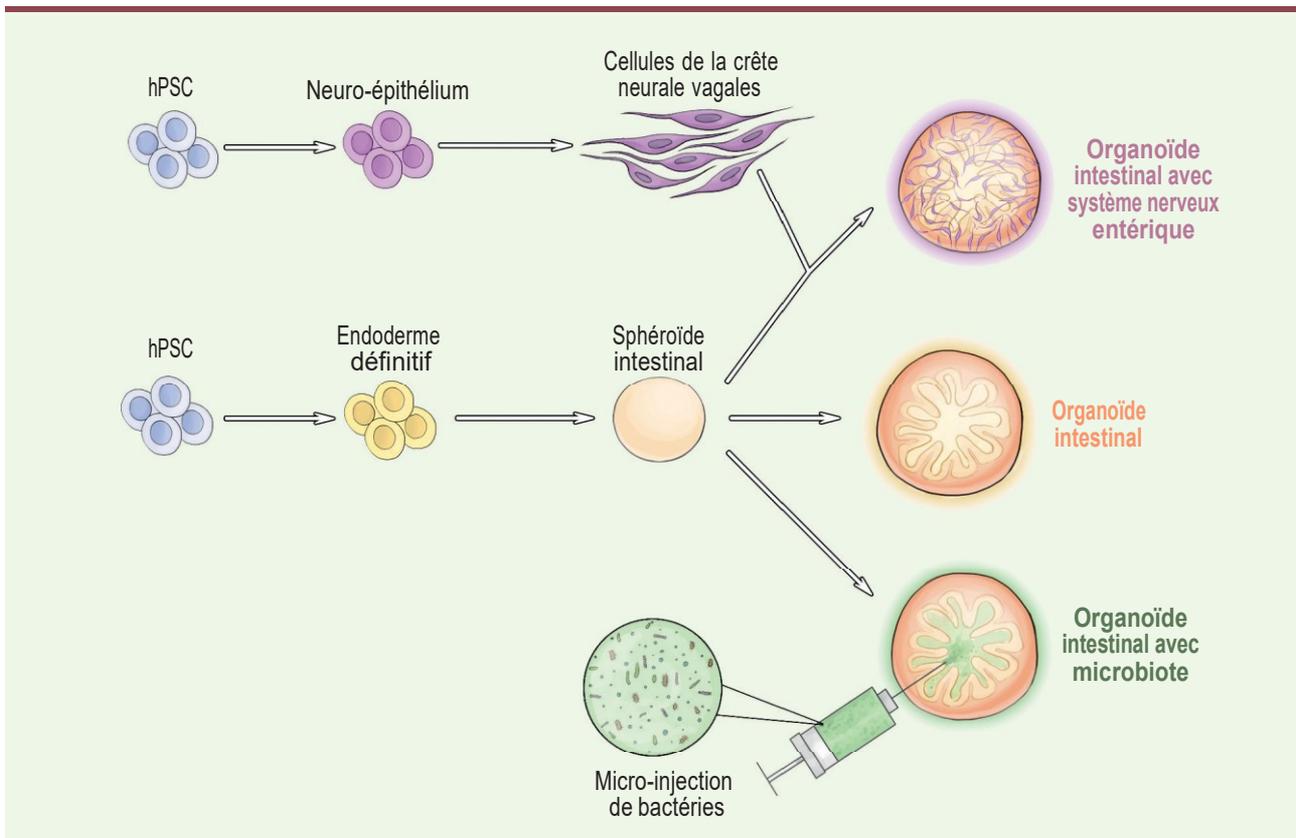
#### Le système nerveux entérique

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

l'intestin humain. 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



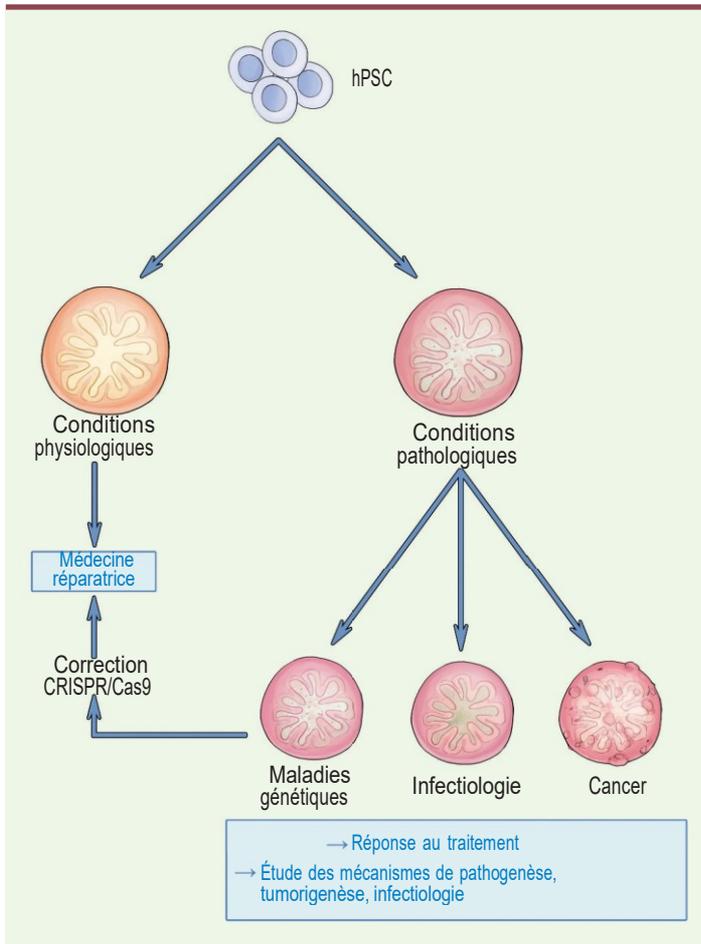
**Figure 3. Complexification du modèle organoïde.** À partir des cellules souches pluripotentes humaines (hPSC), les organoïdes gastro-intestinaux peuvent être complexifiés par l'ajout de cellules du microenvironnement comme le système nerveux entérique. L'étude des interactions hôte-pathogènes est également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

## RÉFÉRENCES

3. Thompson CA, DeLaForest A, Battle MA. Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Dev Biol* 2018 ; 435 : 97-108.
4. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* 2011 ; 317 : 2702-10.
5. Zorn AM, Wells JM. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev. Cell Dev Biol* 2009 ; 25 : 221-51.
6. Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
7. McCauley HA, Wells JM. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development* 2017 ; 144 : 958-62.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7.
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
10. D'Amour KA, Agulnick AD, Elizzer S, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1534-41.
11. Trisno SL, Philo KED, McCracken KW, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate Sox2 functions during esophageal specification. *Cell Stem Cell* 2018 ; 23 : 501-515.e7.
12. Zhang Y, Yang Y, Jiang M, et al. 3D Modeling of esophageal development using human PSC-derived basal progenitors reveals a critical role for Notch signaling. *Cell Stem Cell* 2018 ; 23 : 516-529.e5.
13. Broda TR, McCracken KW, Wells JM. Generation of human antral and fundic gastric organoids from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2019 ; 14 : 28-50.
14. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 2014 ; 516 : 400-4.
15. McCracken KW, Aihara E, Martin B, et al. Wnt1 -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. *Nature* 2017 ; 541 : 182-7.
16. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011 ; 470 : 105-9.
17. Finkbeiner SR, Hill DR, Altheim CH, et al. Transcriptome-wide analysis reveals hallmarks of human intestine development and maturation in vitro and in vivo. *Stem Cell Reports* 2015 ; 4 : 1140-55.
18. Watson CL, Mahe MM, Munera J, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* 2014 ; 20 : 1310-4.
19. Múnera JO, Sundaram N, Rankin SA, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells into colonic organoids via transient activation of BMP signaling. *Cell Stem Cell* 2017 ; 21 : 51-64.e6.
20. Workman MJ, Mahe MM, Trisno S, et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med* 2017 ; 23 : 49-59.
21. Schlieve CR, Fowler KL, Thornton M, et al. Neural crest cell implantation restores enteric nervous system function and alters the gastrointestinal transcriptome in human tissue-engineered small intestine. *Stem Cell Reports* 2017 ; 9 : 883-96.
22. Mahe MM. Engineering a second brain in a dish. *Brain Res* 2018 ; 1693 : 165-8.
23. Jung KB, Lee H, Son YS, et al. Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 3039.
24. Hill DR, Spence JR. Gastrointestinal organoids: understanding the molecular basis of the host-microbe interface. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017 ; 3 : 138-49.
25. Karve SS, Pradhan S, Ward DV, et al. Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0178966.
26. Holokai L, Chakrabarti J, Broda T, et al. Increased programmed death-ligand 1 is an early epithelial cell response to *Helicobacter pylori* infection. *PLoS Pathog*. 2019 ; 15 : e1007468.
27. Hill DR, Huang S, Nagy MS, et al. Bacterial colonization stimulates a complex physiological response in the immature human intestinal epithelium. *eLife* 2017 ; 6.
28. Leslie JL, Huang S, Opp JS, et al. Persistence and toxin production by *Clostridium difficile* within human intestinal organoids result in disruption of epithelial paracellular barrier function. *Infect Immun* 2015 ; 83 : 138-45.
29. Finkbeiner SR, Spence JR. A gutsy task: generating intestinal tissue from human pluripotent stem cells. *Dig Dis Sci* 2013 ; 58 : 1176-84.
30. Crespo M, Vilar E, Tsai SY, et al. Colonic organoids derived from human pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med* 2017 ; 23 : 878-84.
31. Sommer CA, Capilla A, Molina-Estevéz FJ, et al. Modeling APC mutagenesis and familial adenomatous polyposis using human iPS cells. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0200657.
32. Bertaux-Skeirik N, Feng R, Schumacher MA, et al. CD44 plays a functional role in *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell proliferation. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1004663.
33. Nakamura T, Sato T. Advancing intestinal organoid technology toward regenerative medicine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018 ; 5 : 51-60.
34. Ingber DE. Developmentally inspired human organs on chips. *Development* 2018 ; 145. pii: dev156125.

**Titre :** Rôle du Système Nerveux Entérique dans le développement et la maturation de l'intestin

**Mots clés :** Cellules souches pluripotente ; organoïde intestinal ; système nerveux entérique

**Résumé :** Le tractus digestif est dérivé de l'association de tissus issus de différentes origines embryonnaires. L'un de ces tissus est le système nerveux entérique (SNE), une composante du système nerveux périphérique qui coordonne plusieurs comportements de l'intestin adulte, dont la motricité intestinale, les échanges d'eau et d'électrolytes à travers la barrière épithéliale et l'afflux sanguin. La formation de l'intestin requiert donc un co-développement du SNE avec les autres structures de l'intestin. Cependant, les effets directs du SNE sur ces autres tissus intestinaux au cours du développement, et les molécules qui coordonnent ces effets, sont à ce jour encore mal définis.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'intéresse au co-développement embryonnaire du SNE avec les autres populations cellulaires - notamment mésenchymateuses- du petit intestin.

Nous avons pour cela utilisé un modèle humain de l'organogénèse intestinale issu de l'ingénierie des cellules souches - les organoïdes intestinaux humains (HIO). Nous utilisons notamment des HIOs co-cultivés avec des progéniteurs du SNE, pour produire des organoïdes intestinaux avec un SNE (HIOENS). La comparaison d'organoïdes intestinaux avec et sans SNE nous a permis de mettre en évidence une modification des populations mésenchymateuses dans le développement précoce de l'intestin en présence de SNE, notamment une augmentation des populations musculaires et vasculaires.

Ce travail permet donc de mettre en avant le rôle du SNE dans le développement du mésenchyme intestinal en conditions physiologiques, et souligne des mécanismes potentiellement impliqués dans les pathologies de développement du SNE, tel que la maladie de Hirschsprung.

**Title :** Role of the Enteric Nervous System in intestinal development and maturation

**Keywords :** Pluripotent stem cell ; intestinal organoid ; enteric nervous system

**Abstract :** The digestive tract is derived from the combination of tissues of different embryonic origins. One of these tissues is the enteric nervous system (ENS), a component of the peripheral nervous system that coordinates several behaviors of the adult gut, including intestinal motor functions, water and electrolyte exchanges across the epithelial barrier, and blood flow. Thus, the formation of the gut requires co-development of the ENS with other embryological structures of the gut. However, the direct effects of the ENS on these other intestinal tissues during development, and the molecules that coordinate these effects, are to date poorly defined.

In this context, this thesis work focuses on the co-development of the ENS with other cell populations -particularly mesenchymal tissues- of the developing small intestine.

To study intestinal development, we used a model of human intestinal organogenesis derived from stem cell engineering - human intestinal organoids (HIOs). We notably use HIOs co-cultured with ENS progenitors to produce intestinal organoids with an ENS (HIOENS). Comparing intestinal organoids with and without an ENS allowed us to demonstrate a modification of the mesenchymal populations in the early development of the intestine in the presence of the ENS, in particular an increase in muscular and vascular populations.

This work therefore highlights the role of the ENS in the development of intestinal mesenchyme under physiological conditions, and points to mechanisms potentially involved in ENS developmental pathologies, such as Hirschsprung's disease.