

# MODÈLES EXPÉRIMENTAUX : NOUVEAUX HORIZONS POUR LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI  
5 DÉCEMBRE  
2023



# Des organoïdes dérivés d'hiPSC comme modèles de déficits hypophysaires congénitaux

*Teddy FAUQUIER, IR*

 *Equipe DipNet (T.Brue)*

COLLOQUE RECHERCHE  
FIRENDO - 7<sup>ème</sup> ÉDITION -

MODÈLES EXPÉRIMENTAUX :  
NOUVEAUX HORIZONS POUR  
LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI 5 DÉCEMBRE 2023



Marseille  
Medical  
Genetics



Le réseau



1200 échantillons d'ADN depuis 1999

Patients > 20 pays

Déficits hypophysaire isolés (25%) ou combinés (75% dont 25% panhypopituitarisme)

### Stratégie

1. Analyse de gènes connus

- *HESX1, LHX3, LHX4, PROP1, POU1F1, TBX19, OTX2, PITX2, PROK2* et *PROKR2*
- Lab. Biologie Moléculaire, Hôpital de la Conception

2. Identification de nouveaux gènes

Analyse phénotypique

Approche gènes candidats

Approche pangénomique

Analyse fonctionnelle

**A l'heure actuelle, parmi ces patients, seulement 10% des déficits hypophysaires ont une étiologie identifiée**

Absence de lignées cellulaire humaines non-tumorales, modèles murins pas toujours pertinents

➔ **Analyses fonctionnelles difficiles par manque de modèle adéquat**



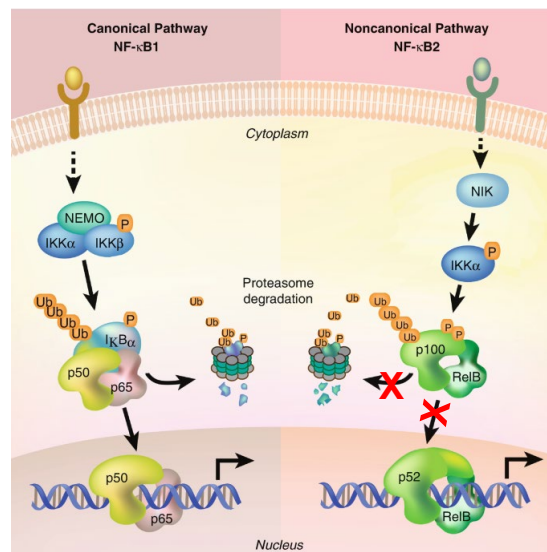
## Le syndrome DAVID

### Déficit in Anterior pituitary function and Variable ImmunoDeficiency

- 3 patients sans lien de parenté présentant un déficit en ACTH associé à un déficit immunitaire
- Pas de mutation de *TBX19*
- Le séquençage d'exome (3 familles) : mutations hétérozygotes de *NFKB2*
- Inhibe la phosphorylation et le clivage de p100 -> défaut de la voie NFκB



Quentien et al., *JCEM*, 2012  
Chen et al., *Am J Hum Genet* 2013  
Brue et al., *BMC Genetics*, 2014

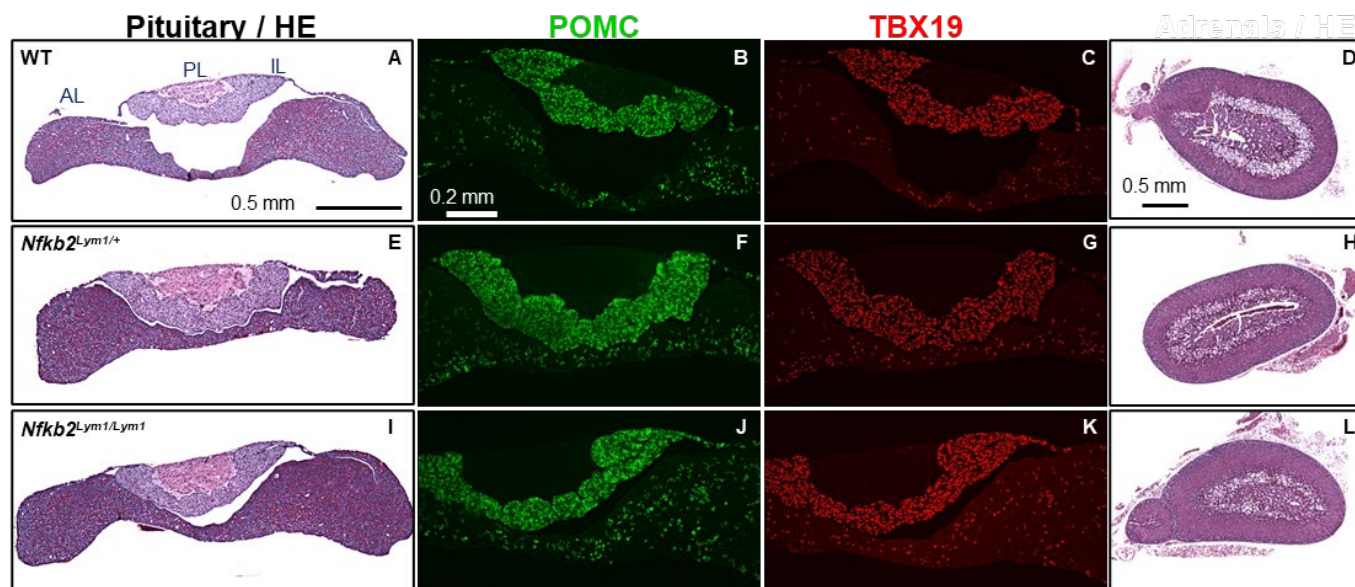




## Absence de phénotype endocrinien chez les souris Lym1

### Souris Lym1 *NFKB2* p.Y868\*

- Morphologie hypophysaire et surrénalienne normale
- Expression normale de TBX19 et POMC, pas de déficit en ACTH



Brue, BMC Genetics, 2014

### Comment expliquer le déficit en ACTH chez les patients?

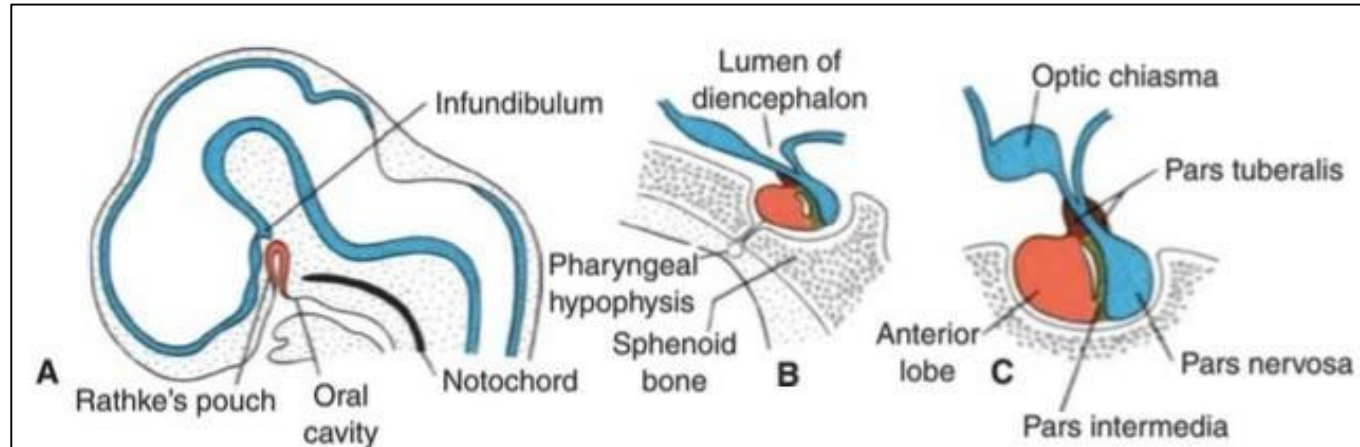
- Mécanismes auto-immun
- Chez les patients, la mutation *NFKB2* est associée à une autre mutation
- Un rôle de *NFKB2* dans le développement hypophysaire spécifique à l'Homme



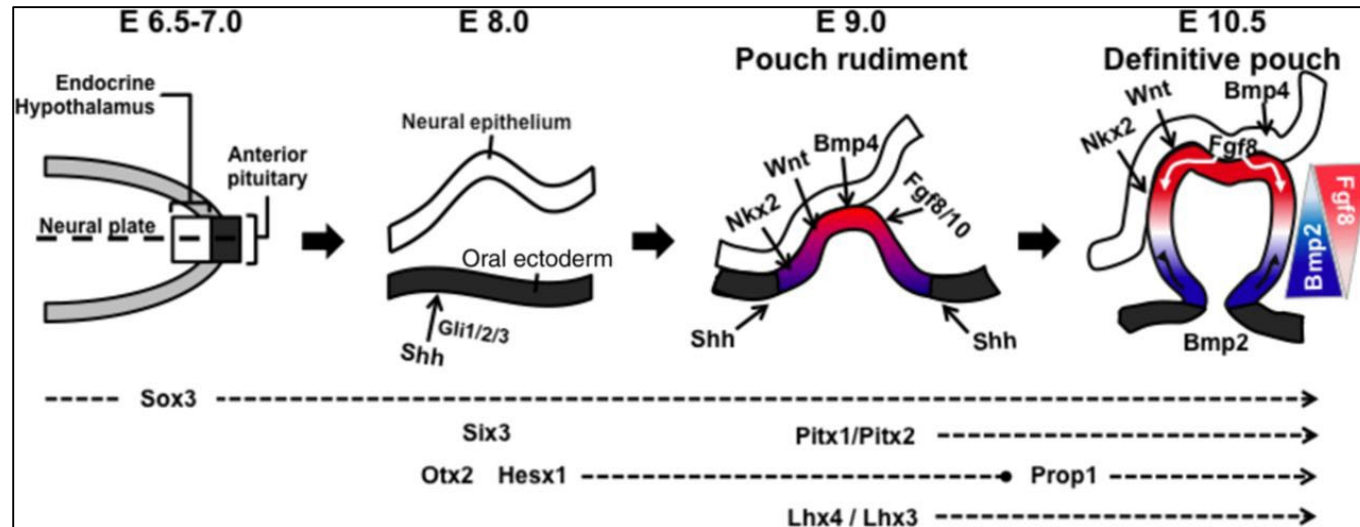


## Le développement hypophysaire

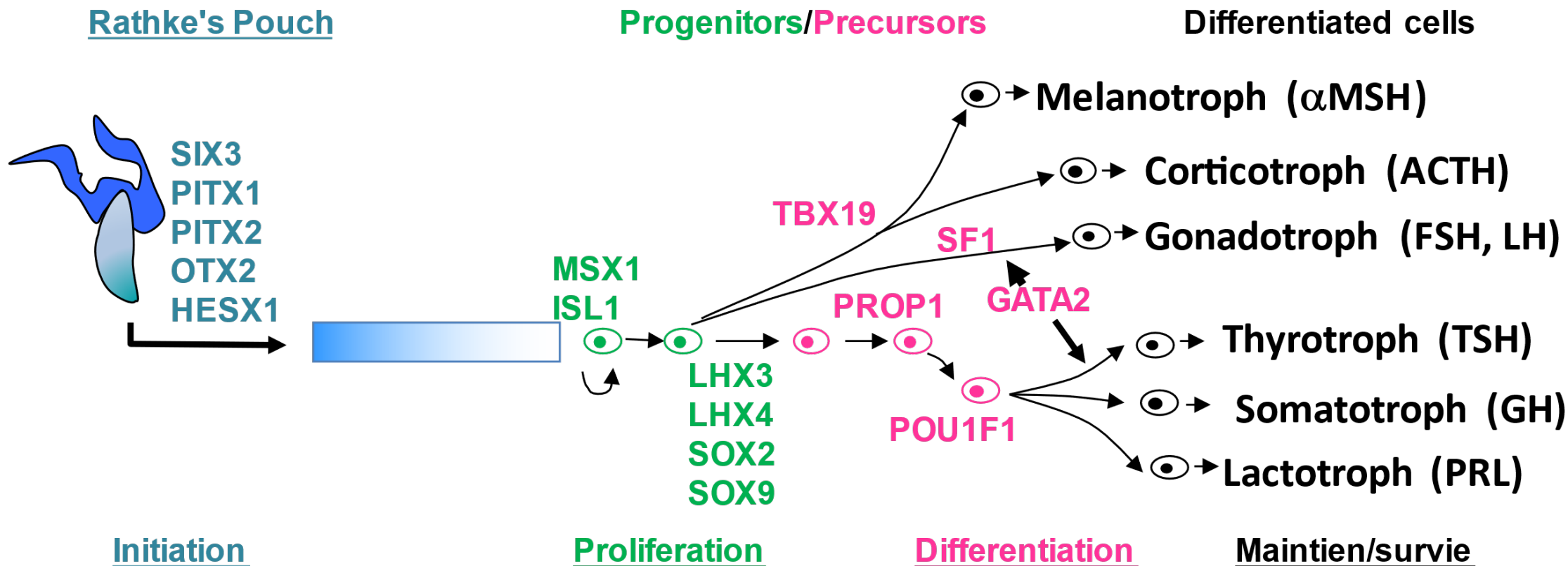
Homme



Souris

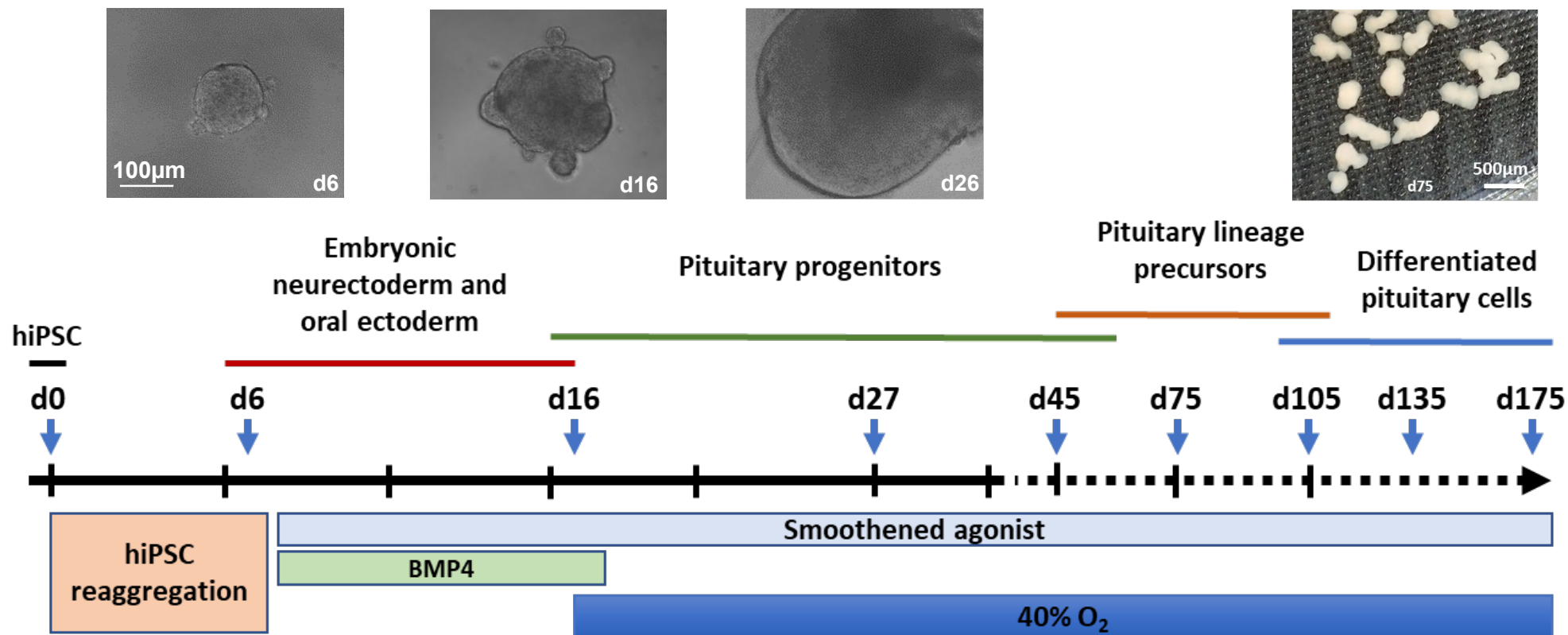


## Le développement hypophysaire chez la souris





## Les organoïdes hypothalamo-hypophysaires

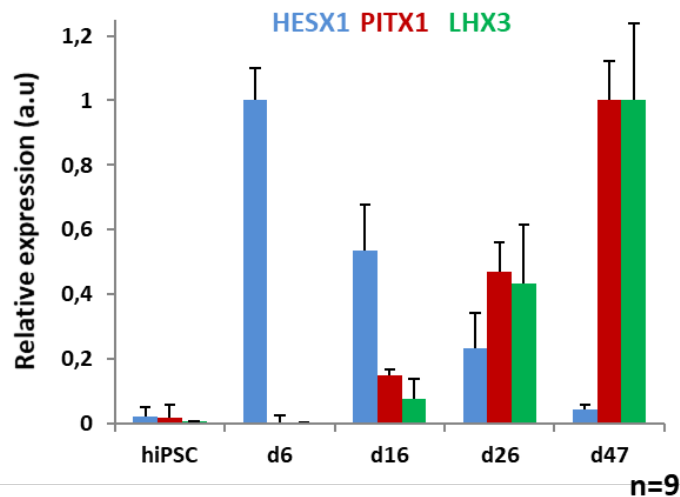




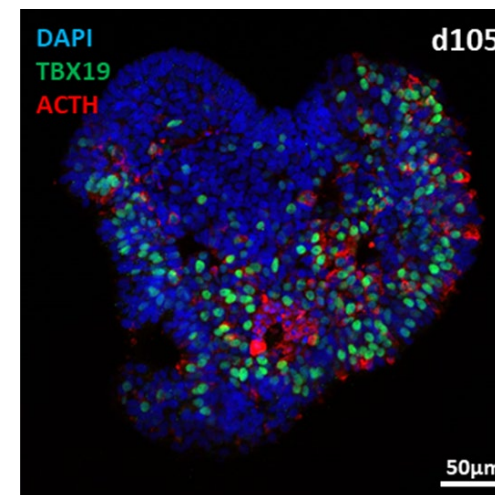
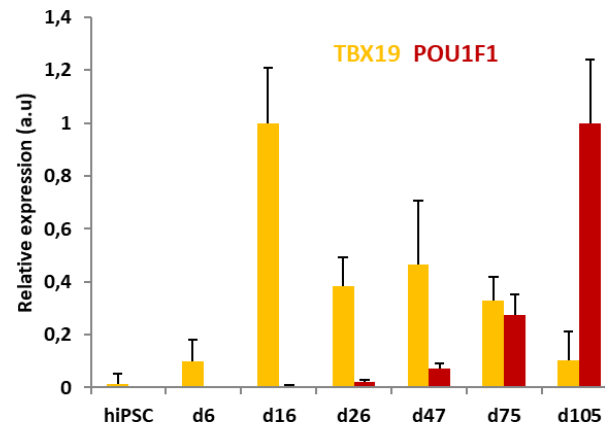


# Les organoïdes reproduisent le développement hypophysaire

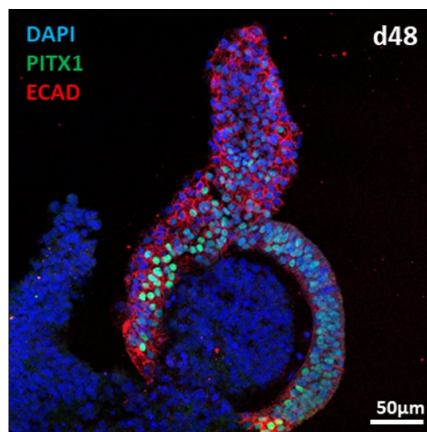
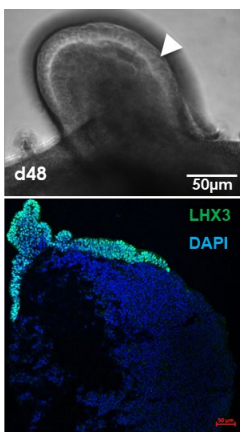
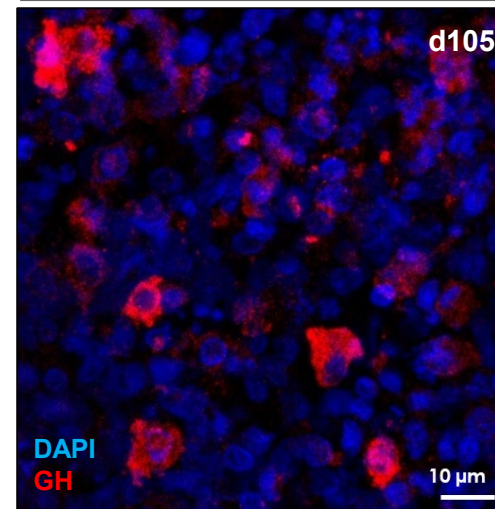
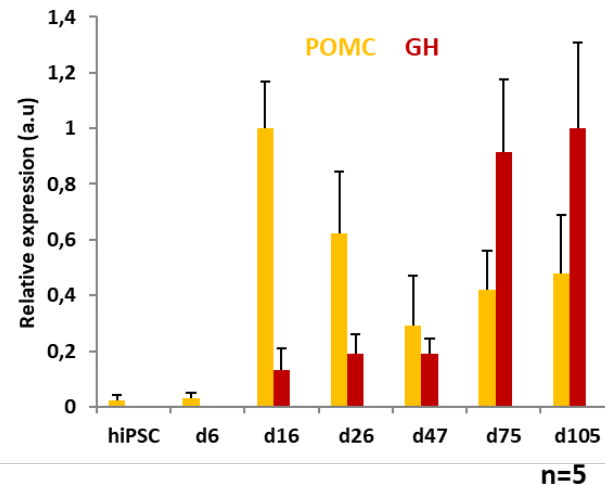
Poche de Rathke/hypophyse précoce



Marqueurs de lignage



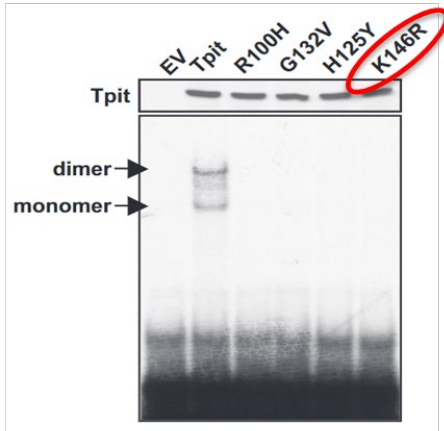
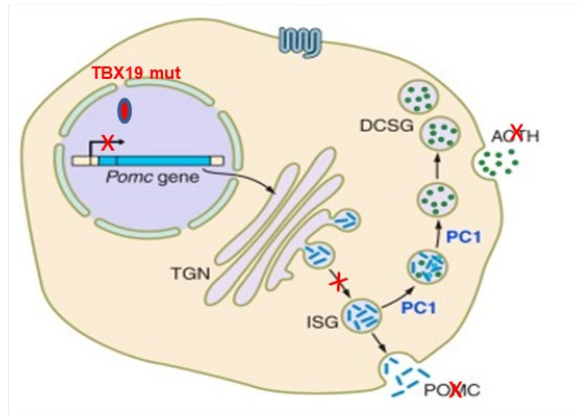
Hormones



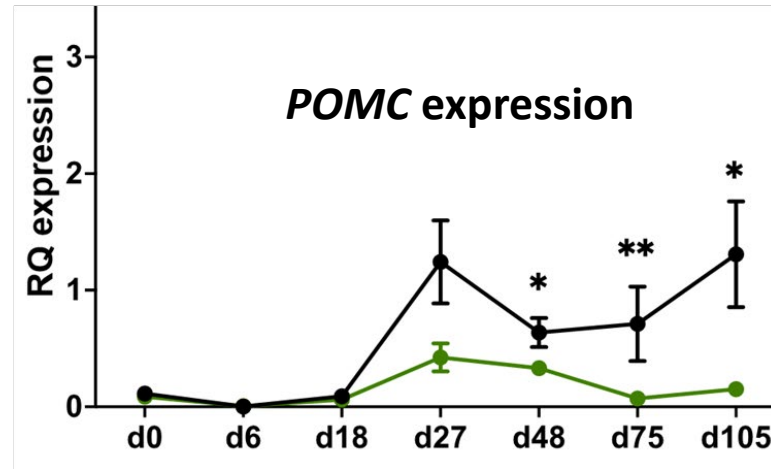
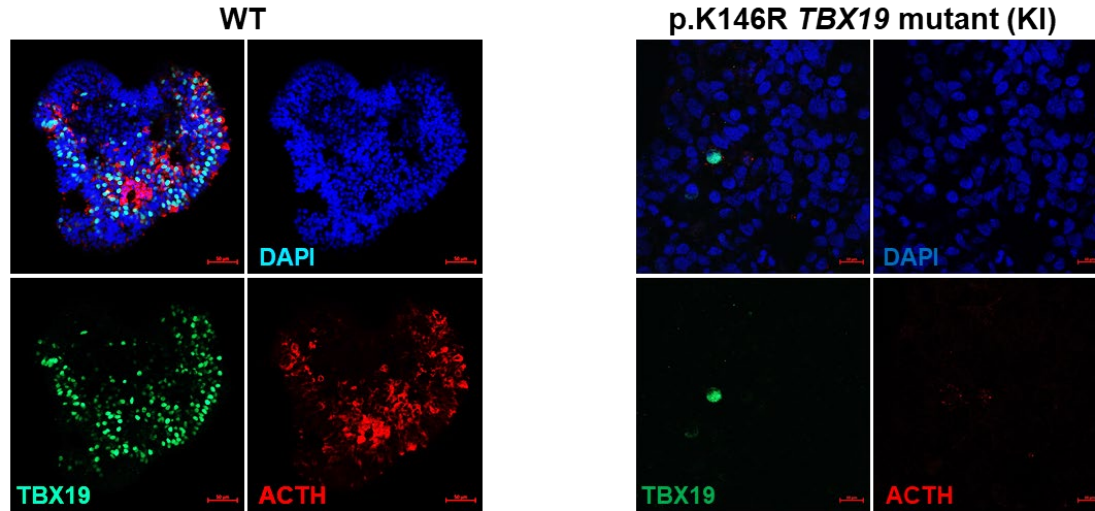


## Première modélisation d'un déficit corticotrope

p.K146R *TBX19* mutant



(Couture et al., JCEM 2012)



• WT  
• KI TBX19 K146R





## Validation du modèle

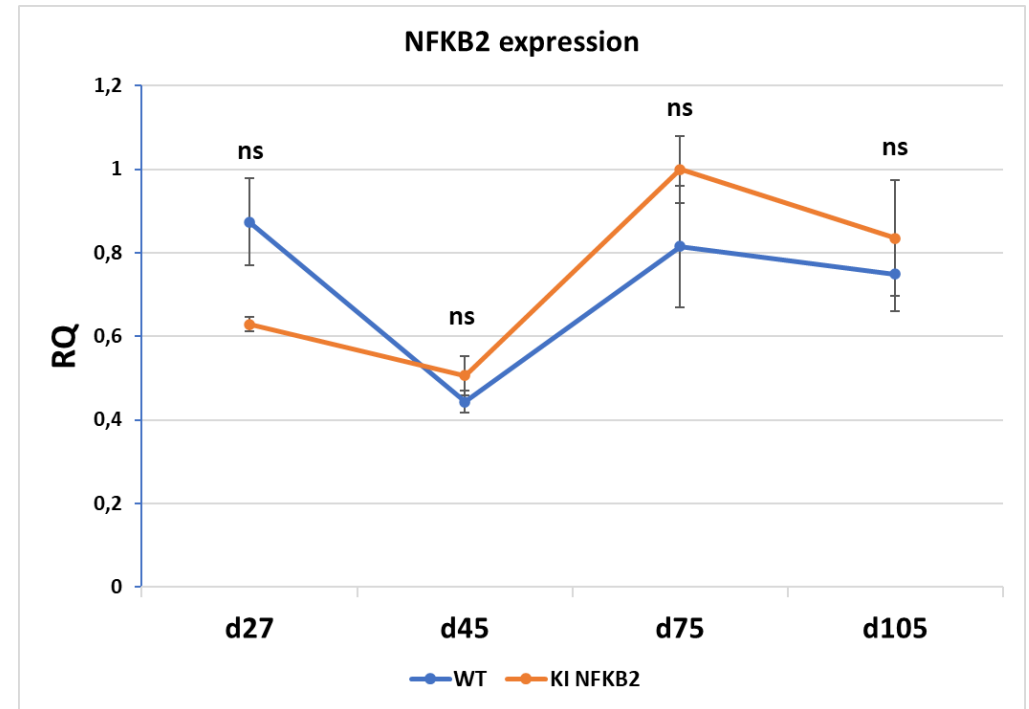
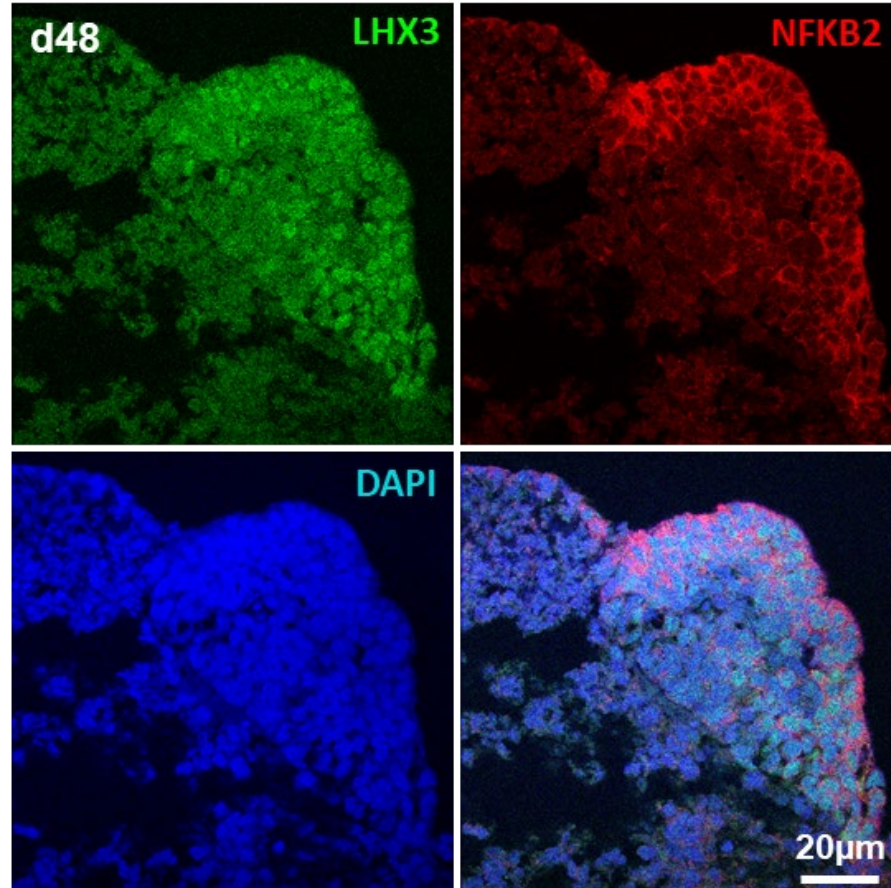
- La culture d'organoïdes mime au moins en partie le développement hypophysaire tel qu'il est connu chez la souris et en partie chez l'Homme
- Un déficit corticotrope peut être induit en copiant une mutation de *TBX19* identifiée chez des patients

Preuve de concept nécessaire avant d'étudier l'effet de la mutation  
*NFKB2*<sup>D865G/D865G</sup> sur le développement des organoïdes



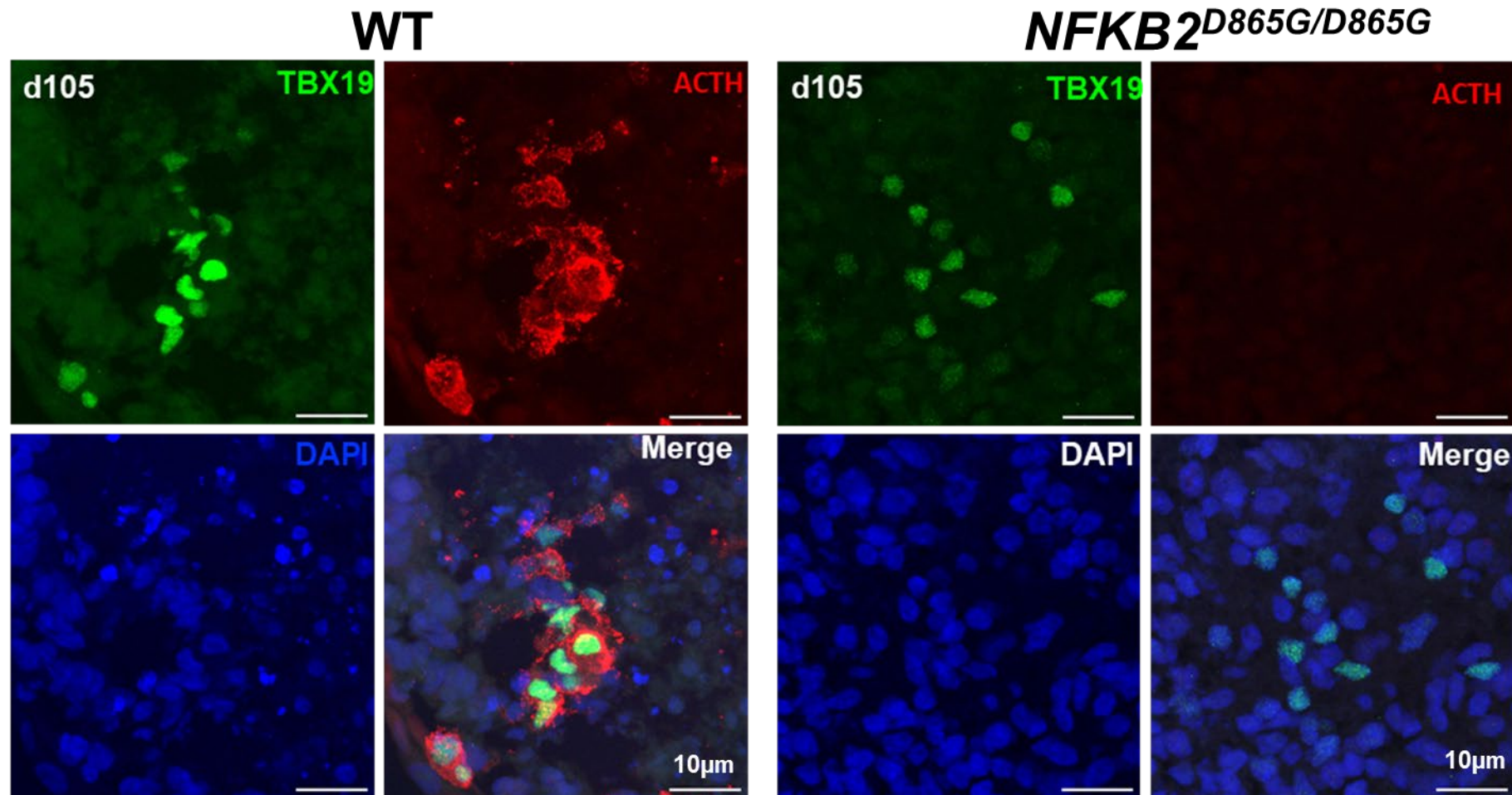


## Développement altéré des cellules corticotropes chez les mutants $NFKB2^{D865G/D865G}$





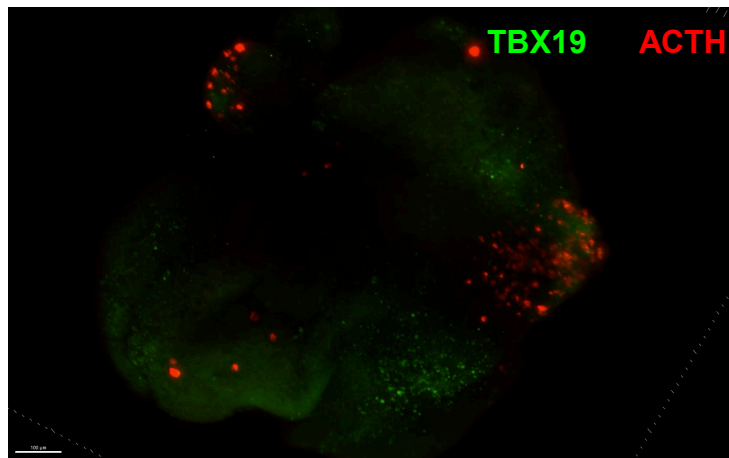
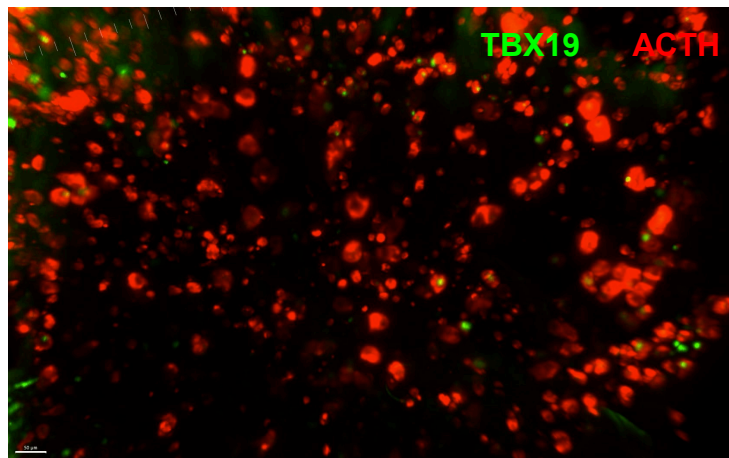
## Développement altéré des cellules corticotropes chez les mutants $NFKB2^{D865G/D865G}$



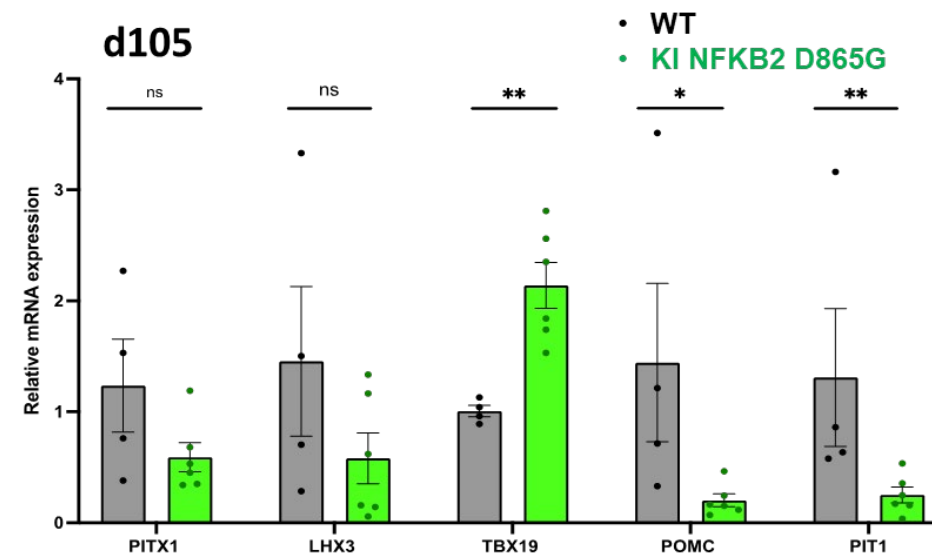
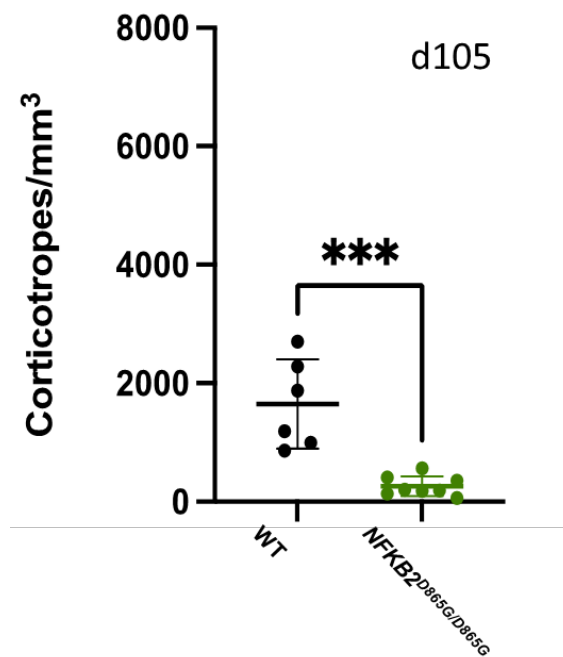


## Développement altéré des cellules corticotropes chez les mutants $NFKB2^{D865G/D865G}$

WT organoid, d105



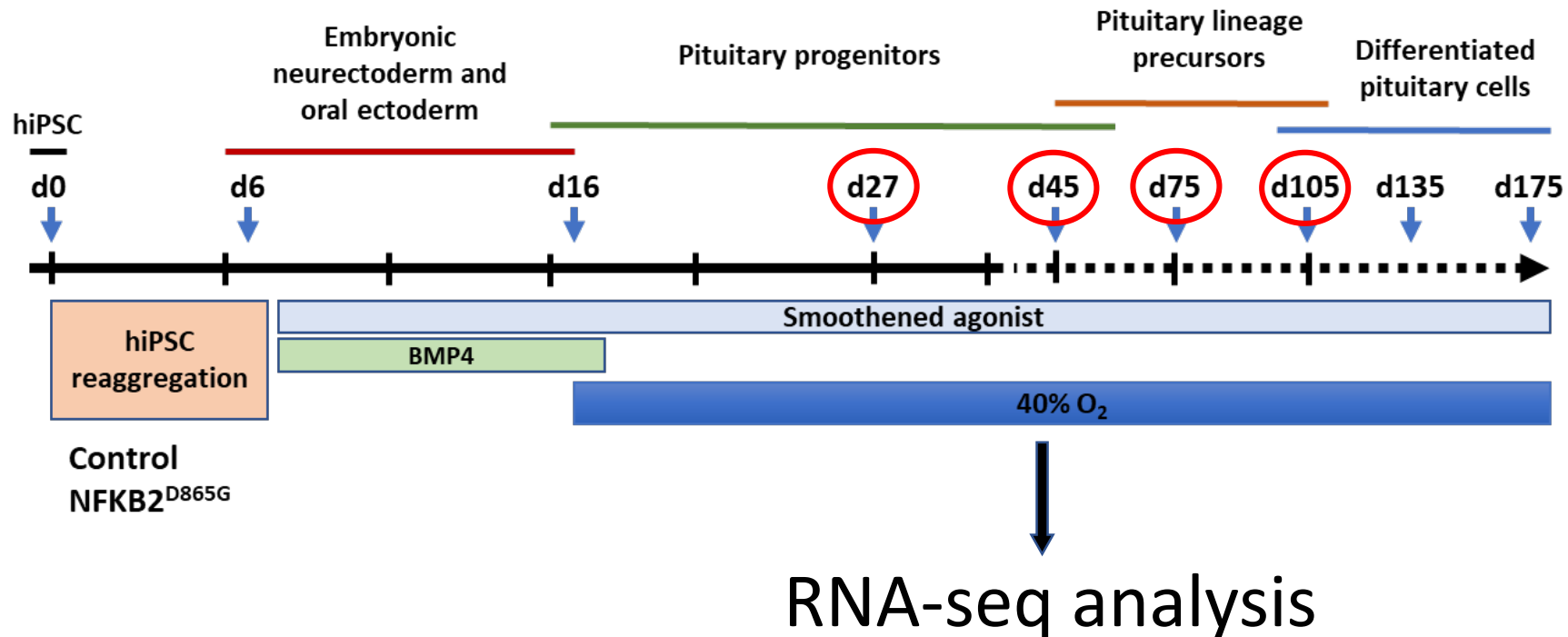
$NFKB2^{D865G/D865G}$  organoid, d105





## Conclusions 1

La mutation de *NFKB2* est responsable du déficit corticotrope, vraisemblablement *via* un effet direct sur le développement hypophysaire



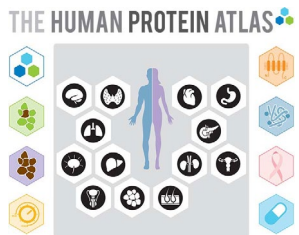
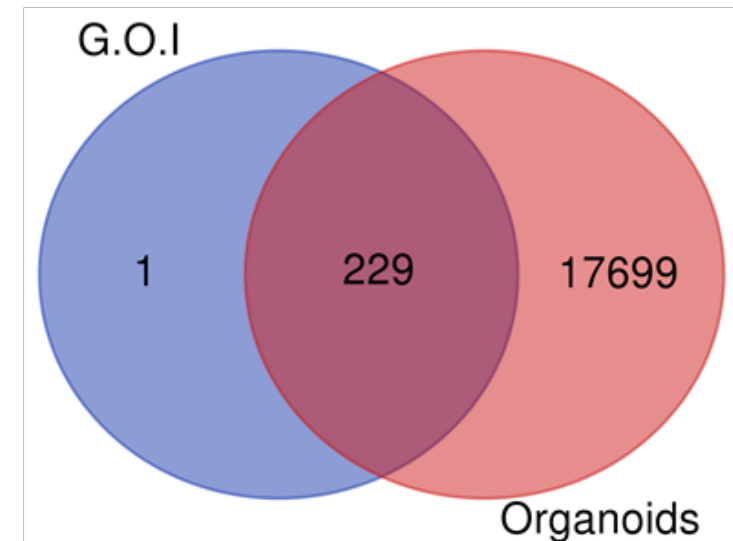
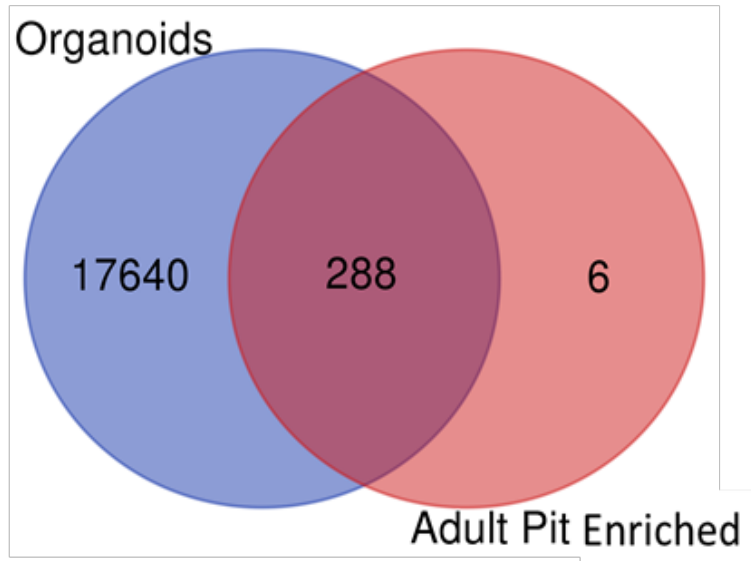


## Données globales RNA-seq

Organoïdes : 17930 transcrits codants, i.e 89,2% du transcriptome humain (20090 gènes)

Adult Pit Enriched: 294 gènes fortement exprimés dans l'hypophyse adulte

G.O.I: 230 gènes impliqués dans le développement hypophysaire







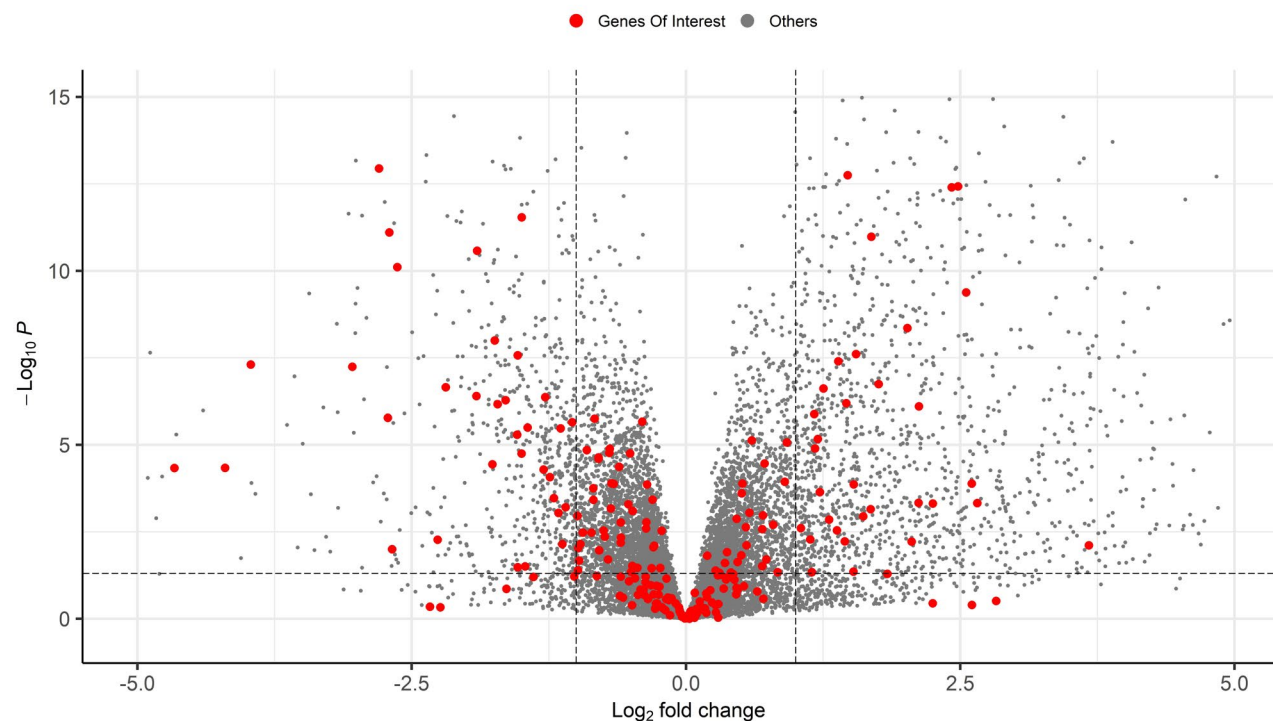
## Analyse des D.E.G dans les organoïdes mutants *NFKB2*<sup>D865G/D865G</sup>

D.E.G: filtrage  $0,5 < \text{Fold Change} < 2$ ;  $\text{padj} < 0,05$

	All coding genes			
	d27	d45	d75	d105
Upregulated	199	1105	142	150
Downregulated	185	520	133	102
Total	384	1625	275	252

	230 genes of interest			
	d27	d45	d75	d105
Upregulated	17	31	13	8
Downregulated	25	31	10	6
Total	42	62	23	14

Volcano plot  
*EnhancedVolcano*

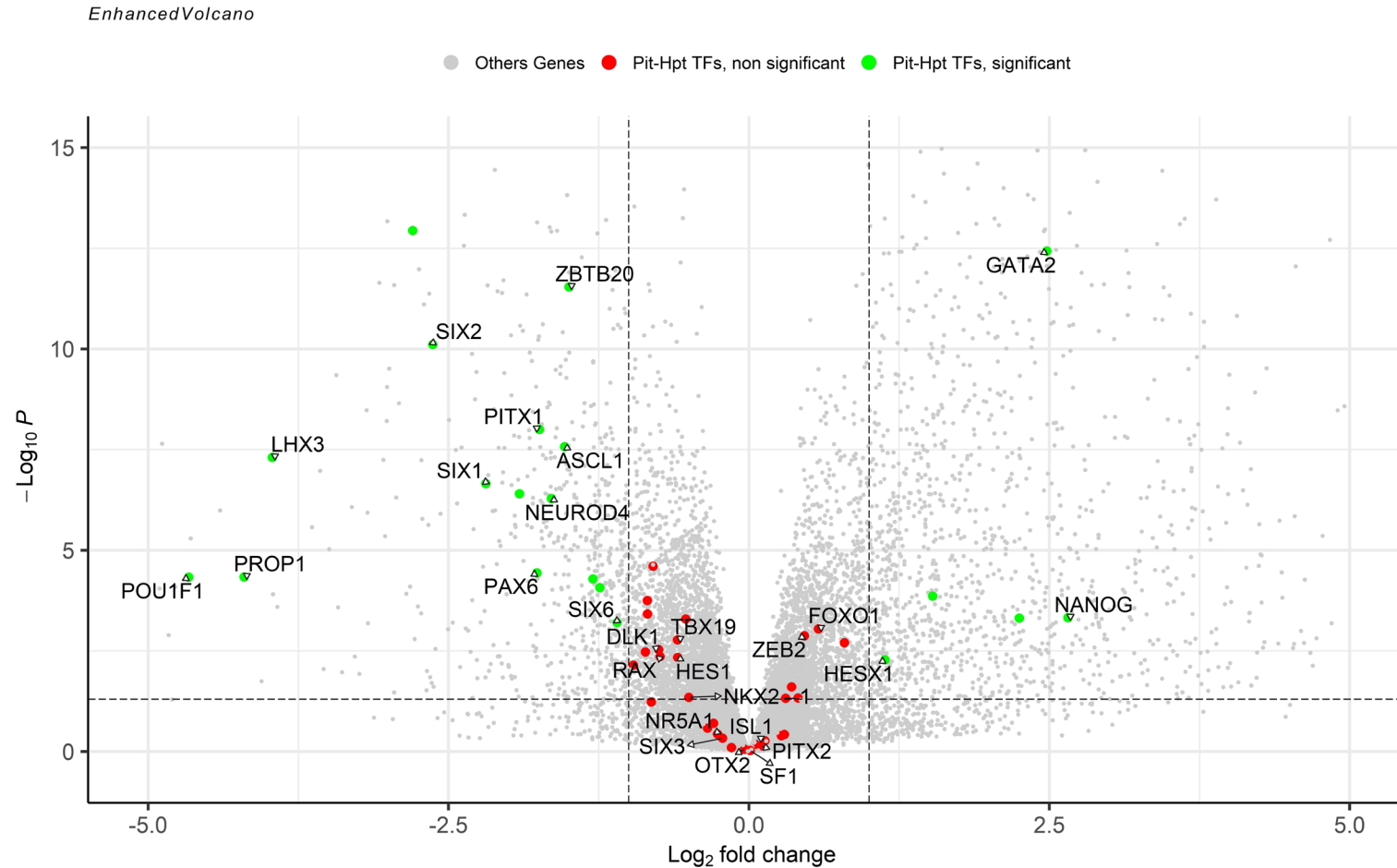


total = 16716 variables





## Baisse de l'expression des facteurs de transcription à d45

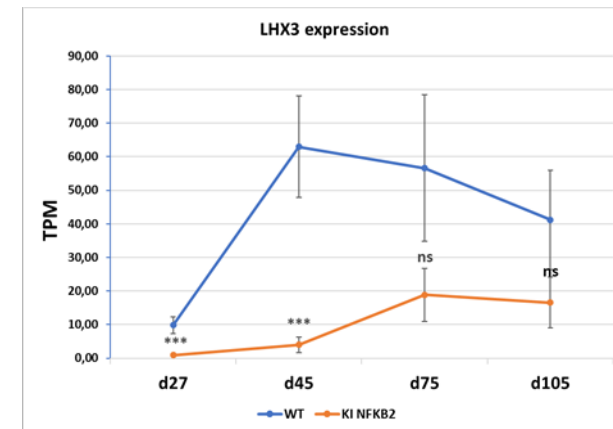
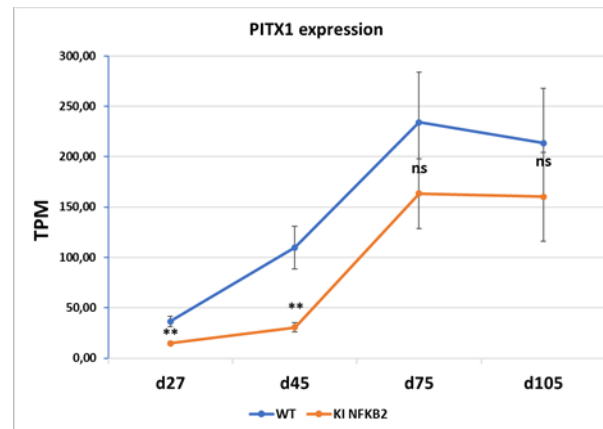
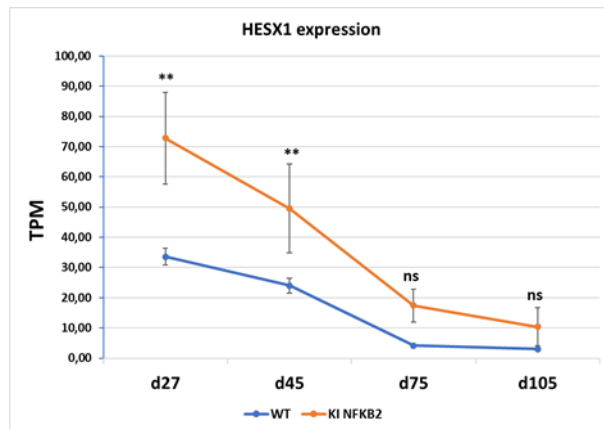
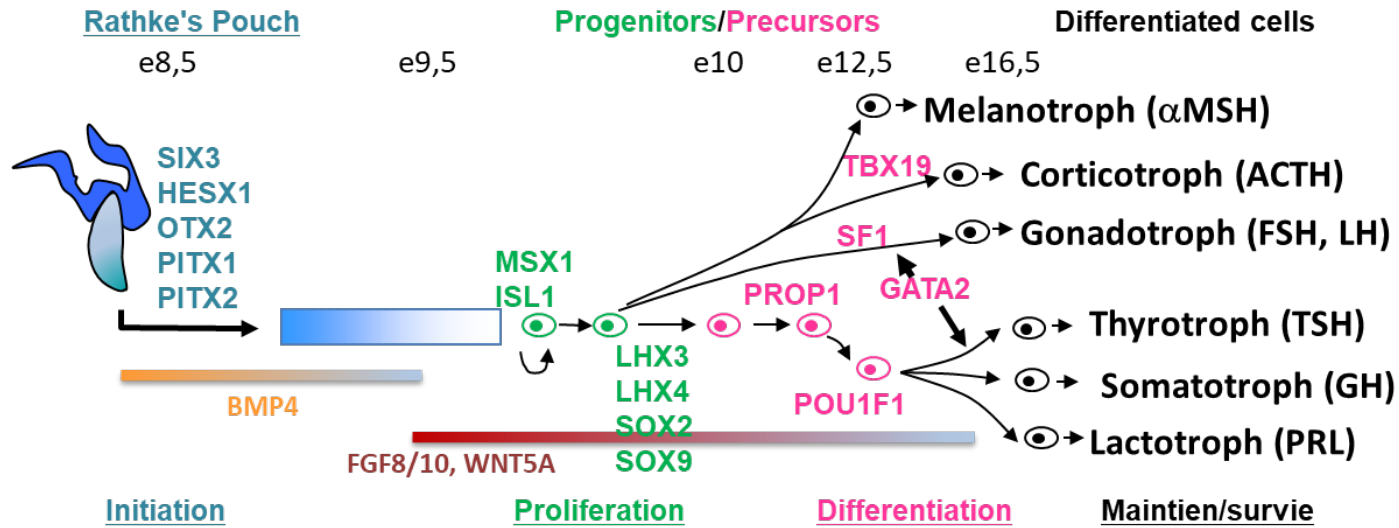


total = 16716 variables



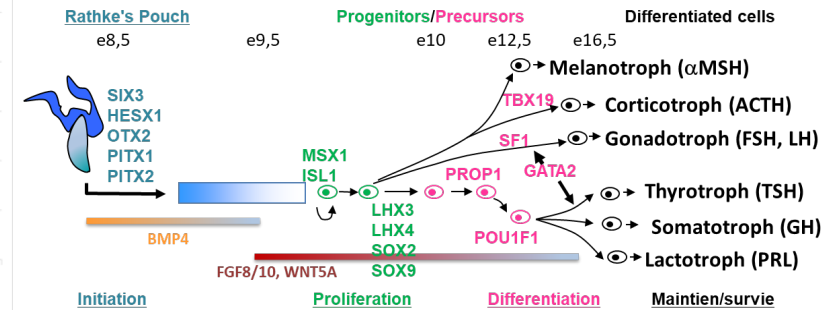
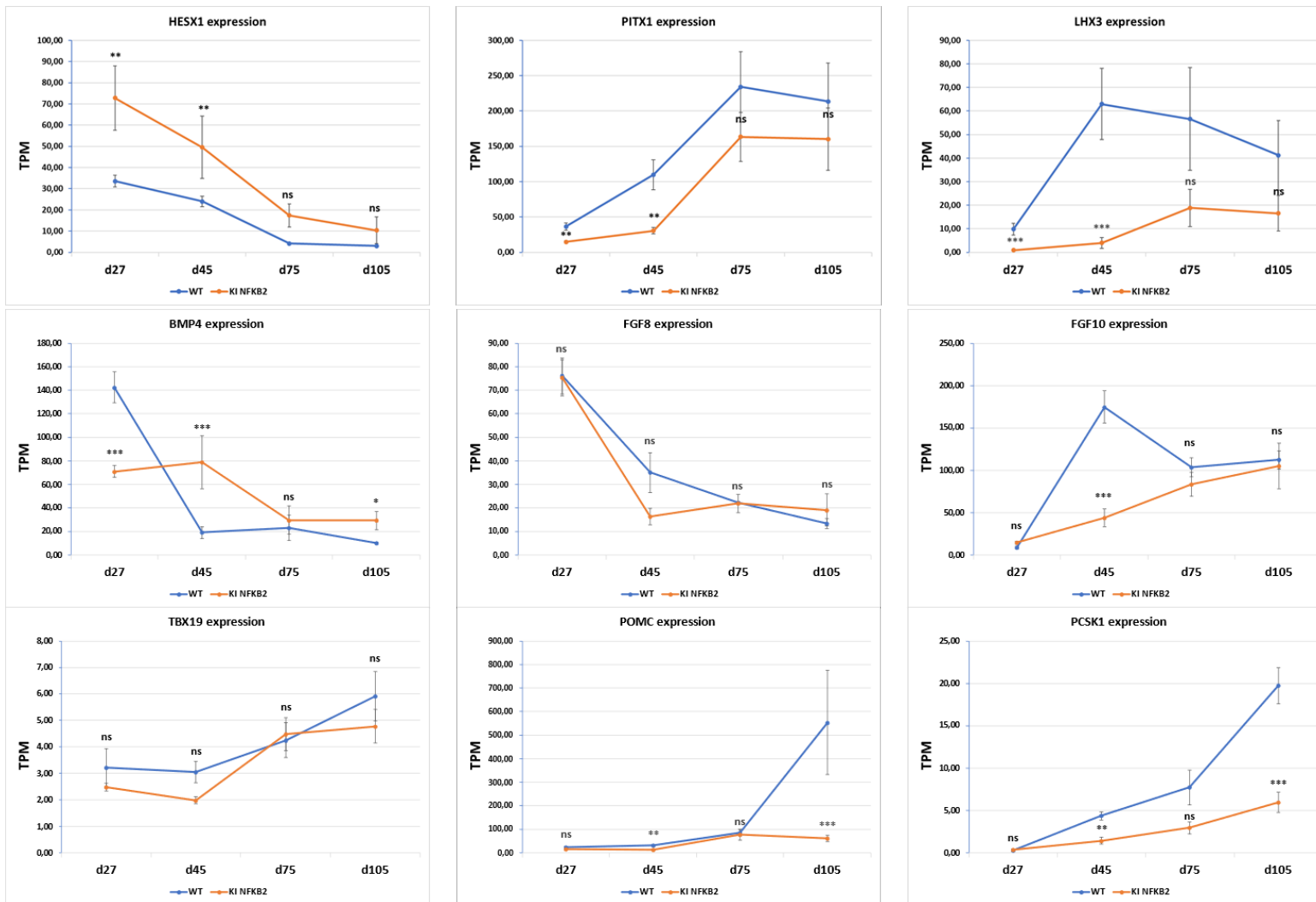


## Changements dans l'expression des facteurs de transcription précoces



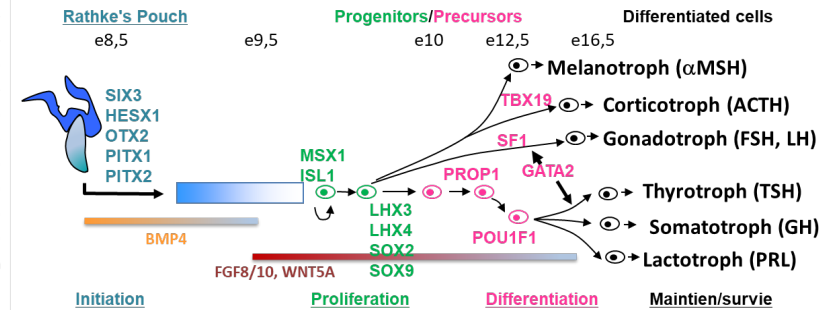
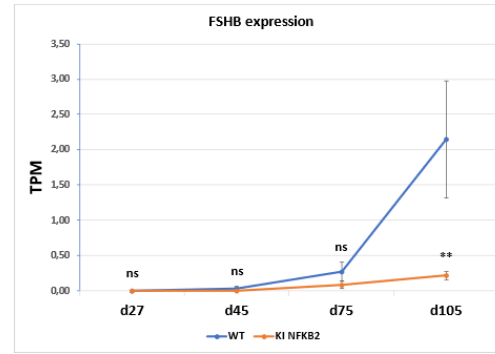
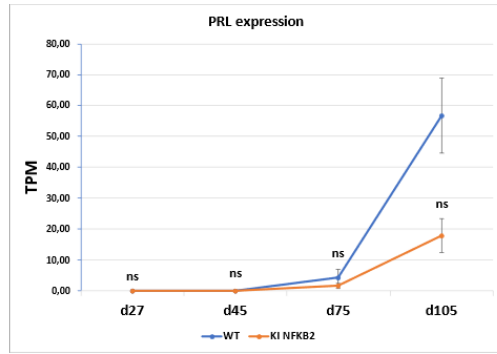
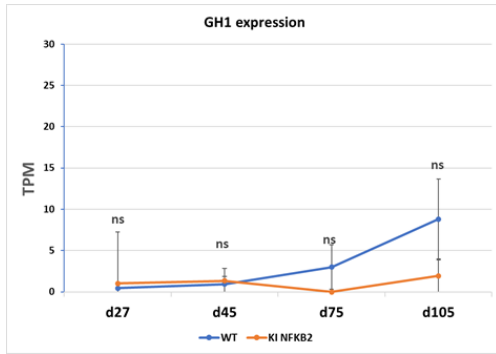
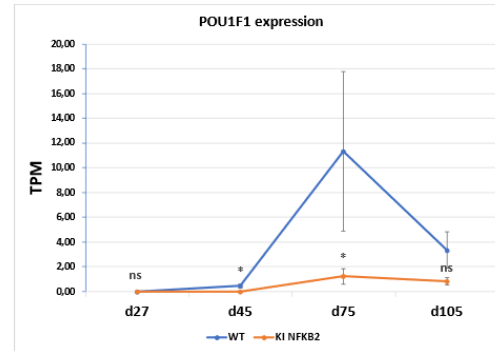
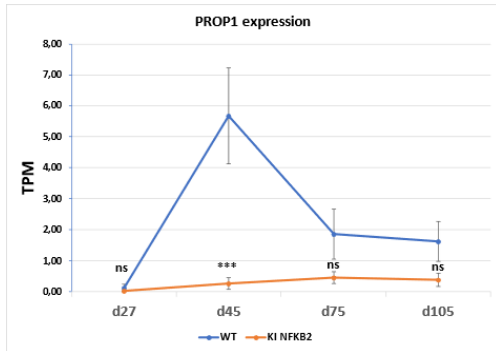
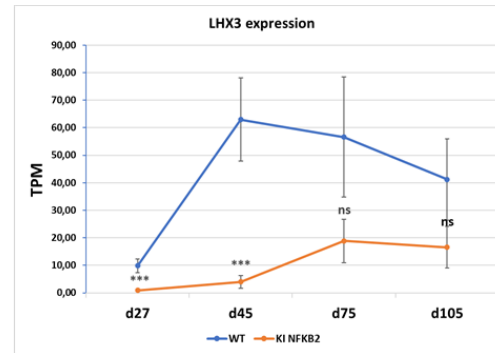
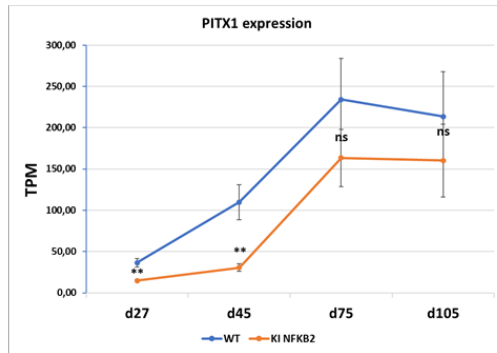
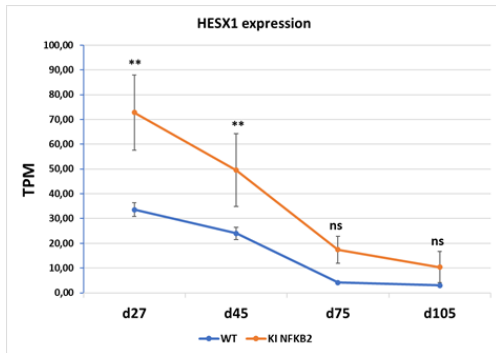


# Effet de la mutation *NFKB2*<sup>D865G/D865G</sup> sur le développement corticotrope





# Effet de la mutation *NFKB2*<sup>D865G/D865G</sup> sur le développement du lignage POU1F1





## Conclusions

Les organoïdes hypothalamo-hypophysaires pourraient offrir la possibilité d'étudier les phases les plus précoces du développement hypophysaire humain

Dans les organoïdes, la mutation de *NFKB2* agit sur plusieurs étapes du développement

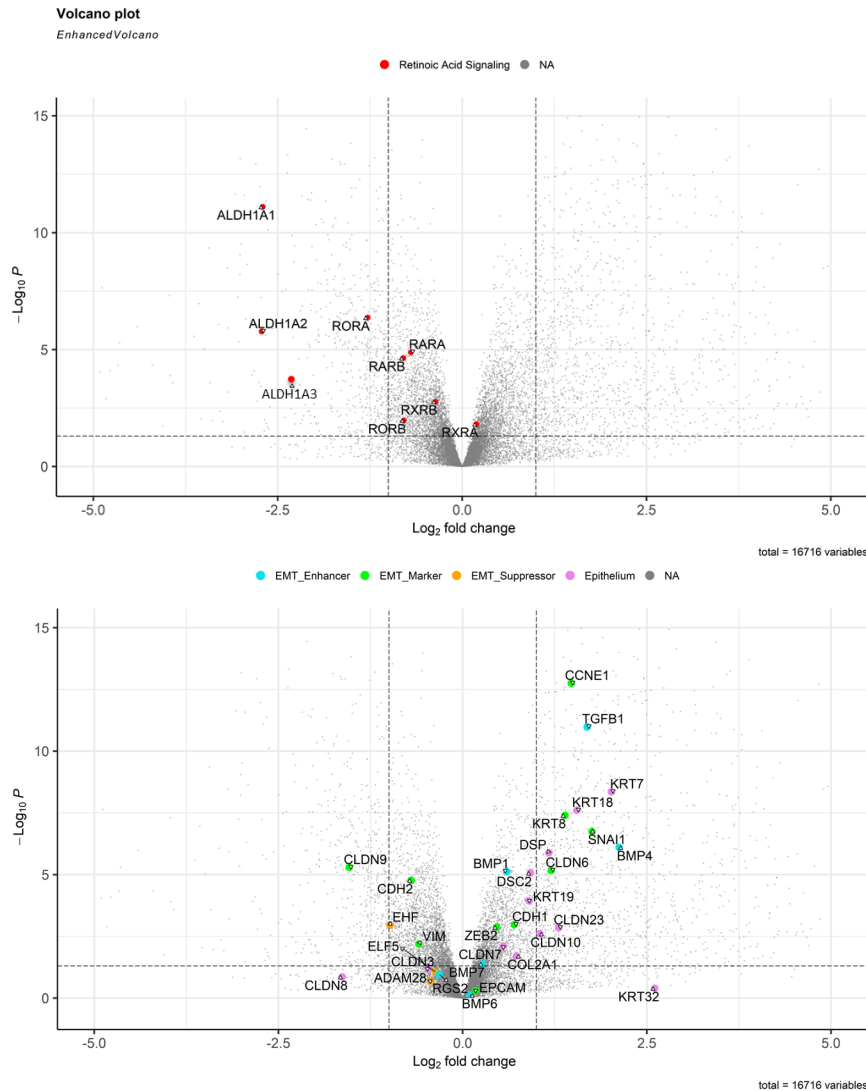
- Sur la formation précoce des progéniteurs hypophysaires, via une modification de la balance BMP4/FGF10 et sa temporalité
- Sur la transition de l'état de progéniteur au stade de précurseur des différents lignages
- Sur la différenciation terminale des cellules corticotropes et possiblement des lignages dépendants de POU1F1

QUEL EST LE LIEN AVEC NFKB2?



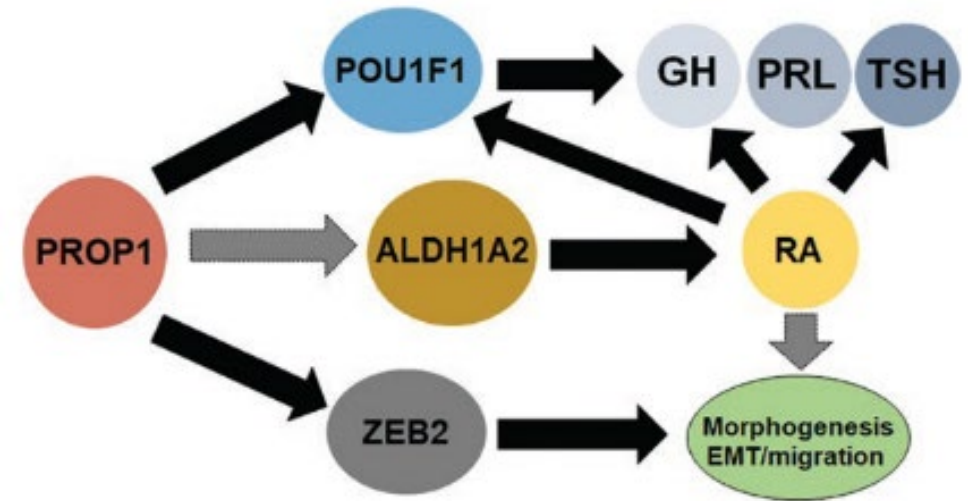


# Transition épithélio-mésenchymateuse et voie de signalisation de l'acide rétinoïque



## PROP1-Dependent Retinoic Acid Signaling Regulates Developmental Pituitary Morphogenesis and Hormone Expression

Leonard YM Cheung<sup>1</sup> and Sally A Camper<sup>1</sup>





## Suites du projet

Quel serait l'effet d'un traitement à l'acide rétinoïque sur des organoïdes à d27/d45

Regarder les phases encore plus précoces et plus tardives de la différenciation dans les organoïdes

Renouveler ce types d'expériences avec une approche multi-omique (scRNA-seq/scATAC-seq)

- établir une cartographie de référence du transcriptome et du paysage chromatinien dans les organoïdes
- mieux comprendre le développement de notre modèle
- élucider les mécanismes de pathogénicité mutation de *NFKB2*

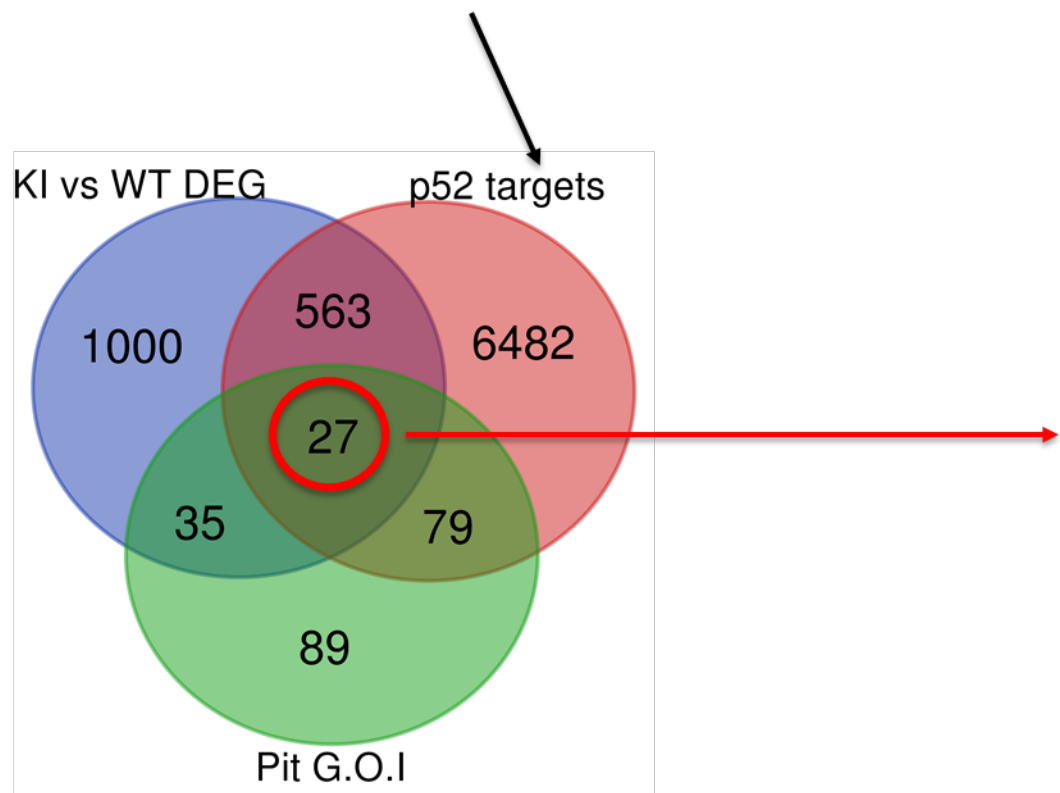






## Quelles sont les cibles directes de p52?

Données ChIP-seq sur cellules de Lymphome de Hodgkin  
Cistrome NFKB (De Oliveira *et al.*, Genome Medicine 2016)



ACVRL1  
BAMBI  
BMPRI1B  
CCNE1  
**CGA**  
CYP11A1  
DKK1  
DKK2  
DRD2  
DUOX2  
ETS1  
EYA4  
**FGF18**  
GATA3  
KRT7  
NEUROD4  
NEUROG2  
**NR4A2**  
**PCSK1**  
**PITX1**  
**POMC**  
**PROP1**  
RORA  
SIX2  
SNAI1  
TGFB1  
THRB





## Remerciements



Marseille  
Medical  
Genetics

### DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION OF NEUROENDOCRINE TISSUES

Thierry BRUE  
Frederic CASTINETTI  
Thi-Thom MAC  
Heather ETCHEVERS  
Anne BARLIER  
Rachel REYNAUD  
Gregoire MONDIELLI  
Thomas CUNY  
Gregory MOUGEL  
Pauline ROMANET  
Alexandru SAVEANU  
Adeline QUERDRAY  
Christophe LISBONIS  
Mathias MORENO  
Elise MARECHAL

### CELL REPROGRAMMING AND DIFFERENTIATION FACILITY

Frederique MAGDINIER  
Natacha BROUCQSAULT  
Claire EL YAZIDI

### GENOMICS & BIOINFORMATICS PLATFORM

Valerie DELAGUE  
Catherine ROBERT  
Christel CASTRO  
Camille HUMBERT  
Nicolas Lenfant



Nicolas JULLIEN  
Emmanuel NIVET



Jacques DROUIN



Sally Camper

