



HAL
open science

[New models to study human embryonic development]

Mathilde Burgaud, Betty Bretin, Arnaud Reignier, John de Vos, Laurent David

► To cite this version:

Mathilde Burgaud, Betty Bretin, Arnaud Reignier, John de Vos, Laurent David. [New models to study human embryonic development]. *Médecine/Sciences*, 2023, 39 (2), pp.129-136. 10.1051/med-sci/2023018 . inserm-04099103

HAL Id: inserm-04099103

<https://inserm.hal.science/inserm-04099103>

Submitted on 16 May 2023

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

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

► Depuis 2021, l'assistance médicale à la procréation (AMP) est accessible aux couples infertiles, mais aussi aux femmes seules et aux couples de femmes. Le processus de fécondation *in vitro* (FIV) a permis de franchir le seuil de cinq millions de naissances dans le monde, entre 1978 et 2013. Cependant, le taux d'échec à chaque cycle est évalué à environ 75 %. Il est donc nécessaire de mieux comprendre le développement embryonnaire humain afin d'améliorer le taux de succès des FIV. Les modèles d'étude ont beaucoup évolué ces dernières années : mise au point de la culture embryonnaire, séquençage du transcriptome de cellules individualisées, découverte des conditions de culture de cellules souches pluripotentes naïves et génération de blastoïdes. Nous revenons dans cette revue sur ces avancées récentes concernant la modélisation de l'embryon humain, qui établissent un nouveau socle de connaissances pour améliorer l'AMP. ◀

Nos connaissances du développement post-implantatoire précoce s'appuient largement sur la collection histologique de Carnegie¹. Ce recueil rassemble plus de 10 000 embryons humains répartis en 23 stades développementaux sur les huit premières semaines du développement humain. Il émerge des travaux de Franklin Mall au début des années 1900. Chaque échantillon était fixé, annoté, photographié et dessiné. La mise en place de structures, comme le tube neural, y est étudiée précisément. Les embryons proviennent de cabinets privés puis d'hôpitaux publics et certains sont prélevés lors d'autopsies de femmes en début de grossesse. Quarante-vingt dix pour cent des structures embryonnaires issues de femmes adultes

Vignette (Photo © CHU de Nantes).

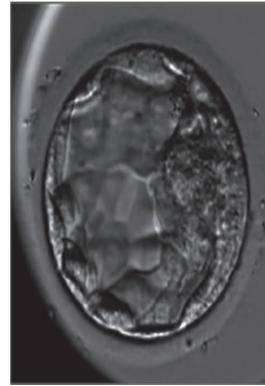
¹ Ce travail a été initié au début du xx^e siècle au département d'embryologie de la *Carnegie Institution of Washington* à Baltimore. L'analyse systématique de ces embryons humains provenant d'avortements spontanés a permis la description des premiers stades du développement humain subdivisés en 23 stades.

Organoïdes (14)

Une série animée par Thierry Jouault

Du nouveau dans les modèles d'étude de l'embryon humain

Mathilde Burgaud^{1*}, Betty Bretin^{1*},
Arnaud Reignier^{1,2}, John De Vos³, Laurent David^{1,4}



¹ Nantes université, CHU Nantes, Inserm, CR2TI, F-44000 Nantes, France.

² CHU Nantes, Service de biologie de la reproduction, F-44000 Nantes, France.

³ IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier, France.

⁴ Nantes université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, BioCore, F-44000 Nantes, France.

*Co-premières auteurs

laurent.david@univ-nantes.fr

sont identifiées comme appartenant au stade 23 de la collection, le dernier stade de développement à huit semaines. D'autres collections sont disponibles, comme celle de Kyoto qui comporte 44 000 échantillons. Ces collections ont été essentielles pour la compréhension du développement embryonnaire humain post-fécondation. Outre la collection de Carnegie, l'analyse d'embryons, issus de grossesses sans projets parentaux, ou de fœtus, suite à des interruptions volontaires de grossesse, nous ont permis de comprendre le développement humain. Dans cette revue, nous nous intéresserons particulièrement aux quatre premières semaines de gestation, période qui débute avec la cellule-œuf, ou zygote, et qui s'étend jusqu'aux ébauches de l'organogénèse.

Observations histologiques : de la fécondation au 28^e jour post-fécondation

Après la fécondation, la cellule-œuf va se diviser. Lorsque la division atteindra le stade de 10 cellules (au moins), au 4^e jour post-fécondation (ou 4 d.p.f., pour *days-post-fertilization*), les cellules se compactent en morula (*Figure 1*). À ce stade, une première rupture de symétrie a lieu : les cellules à l'extérieur de la morula (9 à 15 cellules) sont différentes de celles qui sont à l'intérieur (1 à 5 cellules) (*Figure 1*). Cette asymétrie dans l'embryon induit la différenciation des cellules externes en trophoblaste [1]. Environ huit heures après la compaction, des espaces remplis de liquide se forment et fusionnent entre eux, réalisant l'étape de cavitation. À



ce stade, l'embryon est appelé blastocyste. Il est constitué d'une sphère de cellules externes, qui deviendront une partie des annexes extra-embryonnaires, protégeant une masse de cellules internes, qui deviendront principalement le fœtus. Le blastocyste grossit ensuite jusqu'à rompre la zone pellucide, et commence son implantation dans l'endomètre à 7 d.p.f.

S'ensuit une semaine de nidation, de 7 à 14 d.p.f., durant laquelle l'embryon va envahir l'endomètre en réponse aux enzymes protéolytiques sécrétées par le syncytiotrophoblaste, partie du futur placenta. Cette pénétration entraîne une réaction de décidualisation, c'est-à-dire la différenciation des cellules du stroma utérin en cellules volumineuses remplies de glycogène et de lipides favorisant l'accueil de l'embryon. Simultanément, la masse cellulaire interne devient le bouton embryonnaire. Il a une forme de disque composé de deux feuillettes : l'épiblaste, ou ectoderme primitif, à l'origine du fœtus, et l'hypoblaste, ou endoderme primitif, à l'origine de la vésicule vitelline. Une nouvelle cavité, la cavité amniotique, se forme ensuite au sein de l'épiblaste, tandis qu'un mésoderme extra-embryonnaire se développe autour de l'embryon, et contribue au pédicule embryonnaire, futur cordon ombilical (*Figure 1*).

À 14 d.p.f., l'embryon commence à gastruler, aboutissant à la mise en place des trois feuillettes germinaux. Sous l'effet de la prolifération et de la migration des cellules du disque embryonnaire, la symétrie du disque embryonnaire disparaît au profit d'un disque tridimensionnel. La latéralisation due à la mise en place de la ligne primitive permet des ruptures successives de symétrie, aboutissant à l'émergence de types cellulaires spécifiques. Par exemple, de 16 à 20 d.p.f., a lieu l'ingression de cellules issues de l'épiblaste au centre de l'embryon produisant deux nouveaux feuillettes : l'endoderme et le mésoderme (*Figure 1*). L'épiblaste, quant à lui, change de nom pour celui d'ectoderme. Concernant les annexes, le placenta évolue avec la mise en place des villosités primaires qui délimitent des chambres intervillieuses permettant les échanges avec le sang maternel.

De 20 à 28 d.p.f., les trois feuillettes (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) se développent et produisent les ébauches des organes fœtaux. De nombreux mécanismes de prolifération et de différenciation gouvernent la mise en place de ces ébauches. En voici quelques exemples. Dès 18 d.p.f., apparaissent les gonocytes primordiaux, ou cellules sexuelles primitives, qui migreront ultérieurement vers les gonades. À 20 d.p.f., se déroule la neurulation : l'ectoblaste s'invagine jusqu'à l'isolement du tube neural, à l'origine du système nerveux. Durant la même période a lieu l'individualisation du canal chordal issu de la ligne primitive, qui donnera, par la suite, l'ébauche des vertèbres. Le système circulatoire, à la fois le contenant (vaisseaux) et le contenu (cellules sanguines primitives) se met ensuite en place, dès 21 d.p.f. Le tube cardiaque primitif connaît quant à lui ses premiers battements à 23 d.p.f. Enfin, vers 28 d.p.f., le pédicule embryonnaire commence à former le futur cordon ombilical qui sert de lien entre la face fœtale du placenta et l'ombilic du fœtus (*Figure 1*).

Les modèles embryonnaires du développement humain

Avant 2010, notre connaissance de la première semaine du développement des mammifères provenait essentiellement de travaux menés chez la souris. Ces travaux avaient permis d'identifier la chronologie de l'apparition du trophoctoderme (TE) – qui devient ensuite le placenta –, de l'endoderme primitif et de l'épiblaste. Le modèle murin a également permis de suivre la gastrulation et l'organogénèse.

Les travaux réalisés chez la souris ont été fondamentaux pour l'étude du développement humain. En effet, de nombreuses étapes du développement embryonnaire, de nombreux marqueurs cellulaires et de nombreuses voies de signalisation sont conservés entre les espèces de mammifères. Des particularités existent néanmoins chez la souris, telles que la diapause² ou le développement en cylindre de l'embryon implanté. En 2012, trois études mettent en évidence des différences notables entre l'homme et la souris : la spécification de l'endoderme primitif chez l'homme ne dépend pas de la voie de signalisation FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) [2], et CDX2 (*caudal type homeobox 2*), premier marqueur du trophoctoderme apparaissant chez la souris au stade morula, n'apparaît qu'au stade blastocyste chez l'homme [3]. Examiner des échantillons humains a alors semblé essentiel pour comprendre le développement chez l'homme.

La mise au point du séquençage d'ARN sur des cellules uniques, individualisées, a permis de franchir une étape importante dans la description de l'embryogenèse humaine et la compréhension des différences entre espèces. Il est en effet désormais possible d'avoir, pour chaque cellule de chaque embryon, une vision de l'ensemble des gènes qu'elle exprime. La première étude décrivant le transcriptome de chaque cellule, du zygote au blastocyste, a été publiée en 2013 [4], complétée quelques années plus tard par le travail de Paul Blakeley *et al.* grâce à une analyse plus poussée des données, révélant de nombreuses variations dans le développement humain par rapport au développement murin [5]. En 2016, l'équipe de Fredrik Lanner du *Karolinska Institutet* à Stockholm publia ce qui est aujourd'hui une ressource incontournable pour l'étude du développement embryonnaire humain : un jeu de données de plus de 1 500 cellules, allant du stade huit cellules jusqu'au stade blastocyste [6]. Nos travaux ont complété ces différents éléments en proposant des données de séquençage provenant d'embryons également suivis par microscopie en temps réel [7]. L'ensemble des données et

² Arrêt temporaire du développement.

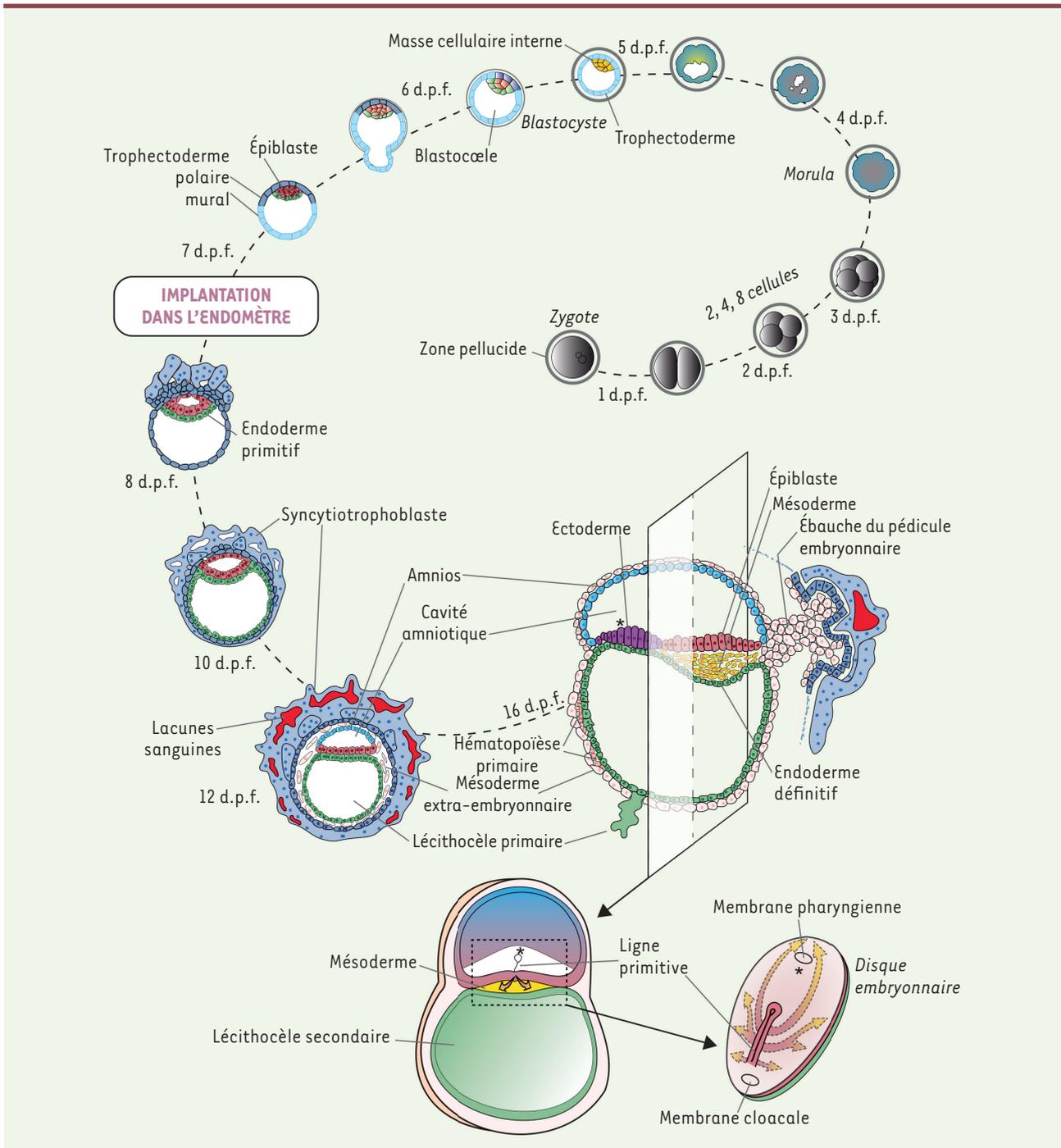


Figure 1. Développement péri-implantatoire humain. Schéma récapitulant les étapes développementales entre la fécondation (zygote) et le 16^e jour post-fécondation (16 d.p.f.). L'astérisque (*) marque la même zone dans les trois vues (inspirée de [40-42]).

leurs analyses nous ont permis de dessiner une cartographie des événements moléculaires ayant lieu lors du développement pré-implantatoire. Ces études ont également montré une différence fondamentale entre l'embryon humain et l'embryon murin : chez l'homme, la maturation du trophoctoderme, qui permet l'implantation dans l'endomètre, se fait du côté polaire, c'est-à-dire du côté du bouton embryonnaire, alors que chez l'embryon murin, c'est le côté opposé qui mature [8]. Les données

obtenues étant issues d'analyses transcriptomiques, il était essentiel de valider les hypothèses en démontrant la présence des protéines correspondantes, par immunofluorescence, et de tester fonctionnellement le rôle des différents acteurs moléculaires. *In vitro*, il est possible de moduler la composition du milieu de culture des embryons pour évaluer l'importance d'une voie de signalisation

dans une étape du développement. Il est également possible d'invalider un gène pour en évaluer son importance. Des équipes ont ainsi invalidé le gène codant OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*) et ont montré que cette protéine est essentielle pour le passage au stade blastocyste [9], alors que l'invalidation de TEAD4 (*TEA domain transcription factor 4*) ralentit la mise en place du trophoctoderme mais ne compromet pas le développement préimplantatoire.

La culture de l'embryon humain jusqu'à 14 d.p.f. : une nouvelle référence dans l'étude du développement péri-implantatoire humain

En 2016, pour la première fois, deux équipes, l'une au Royaume-Uni et l'autre aux États-Unis, réussirent à cultiver des embryons adhérents jusqu'au 13^e d.p.f. [10, 11]. Ces équipes observent alors la ségrégation nette de l'épiblaste et de l'endoderme primitif (PrE), ce qui leur permet d'étudier ainsi l'amniogenèse, les cellules épiblastiques devenant amnioblastes pour former ensuite la cavité amniotique. Néanmoins, elles découvrent alors que les embryons adhérents s'affaissent et ne restent pas sphériques. Il leur est cependant possible d'observer la maturation du trophoctoderme en cellules trophoblastiques.

Ces travaux seront étoffés en 2019 par Lifeng Xiang *et al.* avec la culture non adhérente des embryons. Ce type de culture permet de progresser en obtenant des embryons contenant des structures comme l'épiblaste polarisé, la cavité amniotique, le lécithocèle primaire et des lacunes intra-syncytiotrophoblastes. Pour la première fois, l'ébauche de la ligne primitive est visualisée. Cependant, la fonctionnalité des structures observées n'est pas déterminée et la maturation du trophoblaste extravilleux est bloquée [12]. D'autres équipes commencent à élaborer des conditions de co-culture d'embryons avec des cellules endométriales, comme celle d'Asma Aberkane *et al.* qui ont cultivé des embryons à 6 d.p.f. sur ces cellules, améliorant ainsi les modèles [8].

Ces modèles post-implantatoires permettent d'évaluer l'effet de modifications des milieux de culture, les embryons pouvant être suivis jusqu'à 14 d.p.f., afin de vérifier que le développement se déroule normalement. Cette approche est complémentaire des modèles embryonnaires murins qui permettent un transfert *in utero* et un développement jusqu'à la naissance des embryons, mais qui n'est pas envisageable chez l'homme. Depuis 2016, beaucoup de travaux sur l'embryon humain précoce ont donc été menés et de nouveaux modèles ont été développés. Ce domaine de recherche est en plein essor. En particulier, beaucoup d'hypothèses naissent des analyses « omiques », mais elles demandent d'être validées avant de pouvoir être transférées à la clinique. Ce type d'approches nécessite une grande quantité d'embryons, ce qui est limitant. Des modèles alternatifs sont donc essentiels, bien que l'étape ultime visée reste la validation de ces hypothèses à l'aide d'embryons humains.

Utiliser les cellules souches pour mimer le développement péri-implantatoire

Pour mimer l'embryon humain, il est nécessaire de disposer de modèles cellulaires capables de proliférer *in vitro* et ayant le potentiel de se

différencier dans tous les types cellulaires de l'embryon péri-implantatoire, c'est-à-dire ayant le potentiel de participer au fœtus (pour l'épiblaste), à la vésicule vitelline (pour l'endoderme primitif) et au placenta (pour le trophoctoderme). Certaines cellules souches ont ces caractéristiques : les cellules souches pluripotentes (hPSC) et les cellules souches trophoblastiques (hTSC). Ces deux types de cellules souches peuvent être obtenus par dérivation à partir de blastocystes ou de placenta [13, 14].

Une autre méthode permettant de générer ces cellules souches est la reprogrammation de cellules somatiques par surexpression transitoire de facteurs de transcription clés. Les gènes associés à la pluripotence (cellules souches pluripotentes induites humaines [hiPSC]) ou au destin trophoblastique (cellules souches trophoblastiques induites humaines [hiTSC]) sont alors réactivés. Ces cellules souches, dites induites, permettent l'accès à un large choix de fonds génétiques. En utilisant ces différents types cellulaires induits, il est possible de générer des modèles dits « intégrés », c'est-à-dire contenant tous les types cellulaires de l'embryon.

Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC), dérivées d'embryons pour la première fois en 1998, et les hiPSC, ressemblent à l'épiblaste post-implantatoire. Mises en culture, ces cellules modélisent la polarisation de l'épiblaste, la luminogenèse et l'amniogenèse [10]. Leur état de pluripotence est dit « amorcé ».

Leur équivalent préimplantatoire sont les cellules souches pluripotentes naïves (hNPSC et hiNPSC) [15-18]. Ces deux types cellulaires partagent l'expression de facteurs de transcription de pluripotence comme NANOG et OCT4. Cependant, les cellules naïves ont une signature moléculaire plus proche de l'embryon avant son implantation. Par exemple, l'un des critères de distinction des cellules souches pluripotentes naïves ou amorcées est l'état d'inactivation des chromosomes X des cellules de génotype féminin : les deux chromosomes X sont actifs dans les cellules pluripotentes naïves, tandis qu'un seul de ces chromosomes l'est dans les cellules pluripotentes amorcées [19].

La difficulté de modéliser l'endoderme primitif

Le deuxième type cellulaire émergent de la masse cellulaire interne est l'endoderme primitif (PrE). Le PrE est difficile à définir chez l'homme puisque, contrairement à ce qui est observé chez la souris, sa ségrégation de l'épiblaste n'est pas clairement objectivée avant l'implantation [20, 21]. En 2019, Madeleine Linneberg-Agerholm *et al.* ont différencié, à partir d'hiNPSC, des cel-

lules mimant le PrE post-implantatoire [22]. Cependant, les cellules qu'ils ont obtenues ne s'autorenouvellent pas, pourtant une caractéristique du PrE *in vivo*. Des cellules ayant les caractéristiques de l'endoderme primitif sont aussi retrouvées dans les blastoïdes (voir plus loin). Récemment, une équipe a réussi à générer des cellules souches extra-embryonnaires induites (iXEN) dont les caractéristiques se rapprochent de celles de l'endoderme primitif [23]. L'étape suivante sera d'analyser l'aptitude de ces cellules à se différencier et à former une cavité proche de la structure du léctothocèle primaire.

Les cellules souches trophoblastiques : innovation dans l'étude de la placentation

Pour étudier la lignée trophoblastique, des placentas issus de grossesses menées à terme ont longtemps été utilisés. Ces tissus ne prolifèrent cependant pas. De même, les cellules de lignées placentaires cancéreuses prolifèrent, mais elles ne permettent pas une modélisation fidèle du placenta normal. La mise au point d'un modèle cellulaire transcriptionnellement proche du trophoctoderme péri-implantatoire, se renouvelant de façon autonome et capable de générer à la fois du syncytiotrophoblaste et du trophoblaste extra-villeux, était donc indispensable.

Vingt ans après la dérivation de cellules souches trophoblastiques chez la souris [24], une équipe a finalement réussi à dériver des cellules souches trophoblastiques humaines (hTSC) [13]. Ces cellules s'auto-renouvellent et se différencient en syncytiotrophoblaste et en trophoblaste extra-villeux. Elles correspondent transcriptionnellement à du cytotrophoblaste à 10 d.p.f. [25]. Une autre équipe a établi, la même année, des lignées de cytotrophoblastes à partir de placenta de premier trimestre [26]. En utilisant un mode de culture non adhérente, ces cellules s'assemblent et forment des blastoïdes de trophoblaste qui présentent *in vitro* la maturation des cytotrophoblastes, se différenciant spontanément en syncytiotrophoblaste. Une fine régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine permet au cytotrophoblaste de générer des trophoblastes extra-villeux. Malheureusement, dans ce modèle, les structures ne s'assemblent pas comme les tissus primaires : le syncytiotrophoblaste se développe à l'intérieur de la sphère de cytotrophoblaste et les trophoblastes extra-villeux à l'extérieur.

Les nombreuses études tentant de générer des cellules souches trophoblastiques humaines (hTSC) ont révélé l'existence de liens entre la pluripotence et la lignée trophoblastique. Or, ces deux destins, ségrégués précocement vers 5 d.p.f., impriment aux cellules une identité moléculaire et des compétences très différentes. En 2013, Mitsuyoshi Amita *et al.* stimulent des cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) avec de la protéine morphogénétique osseuse 4 (*bone morphogenetic protein 4*, BMP4). Ils obtiennent alors des cellules qui expriment des marqueurs du trophoblaste, qui fusionnent et sécrètent de la β -hCG (la sous-unité β de l'hormone chorionique gonadotrope [hCG]), spécifique des trophoblastes [27]. En 2019 et 2020, plusieurs équipes génèrent des cellules souches trophoblastiques humaines (hTSC) par conversion de cellules souches pluripotentes naïves humaines (hNPSC) [25, 28, 29]. Ils en concluent que l'état de pluripotence naïf est permissif au destin trophoblastique. Rapporté au

contexte de l'embryon, cela signifie que l'épiblaste pré-implantatoire est potentiellement capable de suppléer au trophoctoderme. Cette hypothèse reste cependant à vérifier dans l'embryon.

La génération de hTSC et de hiTSC va permettre l'essor de l'étude de la physiopathologie placentaire humaine, dont des modèles cellulaires sont en cours de développement, comme les organoïdes placentaires issus de hTSC [30].

Les blastoïdes, une révolution dans la modélisation embryonnaire ?

Les différentes lignées de cellules souches que nous avons décrites sont donc capables de produire tous les types et états cellulaires péri-implantatoires. Chez la souris, en combinant des cellules souches embryonnaires avec des cellules souches trophoblastiques, des blastoïdes, c'est-à-dire des structures qui s'auto-assemblent en une structure qui mime l'embryon au stade blastocyste, et qui sont capables de s'implanter dans l'utérus murin, ont pu être obtenus [31].

Un blastoïde humain est défini selon plusieurs critères. Il comporte les trois lignées cellulaires (trophoctoderme, cellules de l'épiblaste et cellules de l'endoderme primitif) formant le blastocyste, et leur différenciation doit respecter la séquence spatio-temporelle embryonnaire physiologique. En 2022, selon Harunobu Kagawa *et al.*, « à 96 h, le blastoïde est défini par sa similarité morphologique du stade B6 du blastocyste humain, avec une cavité entourée d'une monocouche cellulaire d'un diamètre de 150 à 200 micromètres qui comprend une masse de cellules interne » [32]. On retrouve alors dans le blastoïde, environ 27 % d'épiblaste (20 cellules qui expriment OCT4), 63 % de trophoctoderme (70 cellules qui expriment GATA3) et 5 % d'endoderme primitif (5 cellules qui expriment GATA4). Cela correspond à la répartition retrouvée dans l'embryon humain [32].

Plusieurs équipes ont généré des blastoïdes humains [33, 34]. Plus récemment, nous avons participé à la mise au point d'une nouvelle méthode de génération de ces blastoïdes. L'étude comparative de ces nouveaux modèles avec les précédents montre une plus grande efficacité d'élaboration associée à une moindre différenciation « parasite » [32, 35].

Les blastoïdes créés par Kagawa et ses collègues [32] se sont révélés capables d'interagir avec l'endomètre humain et de s'y attacher. En utilisant des hESC naïves pour reconstituer un tissu pré-implantatoire, ce modèle a atteint, pour la première fois, 12 d.p.f. dans des conditions semblables à celles d'un blastocyste. Plus de 70 % des structures obtenues étaient similaires à celle du blastocyste.

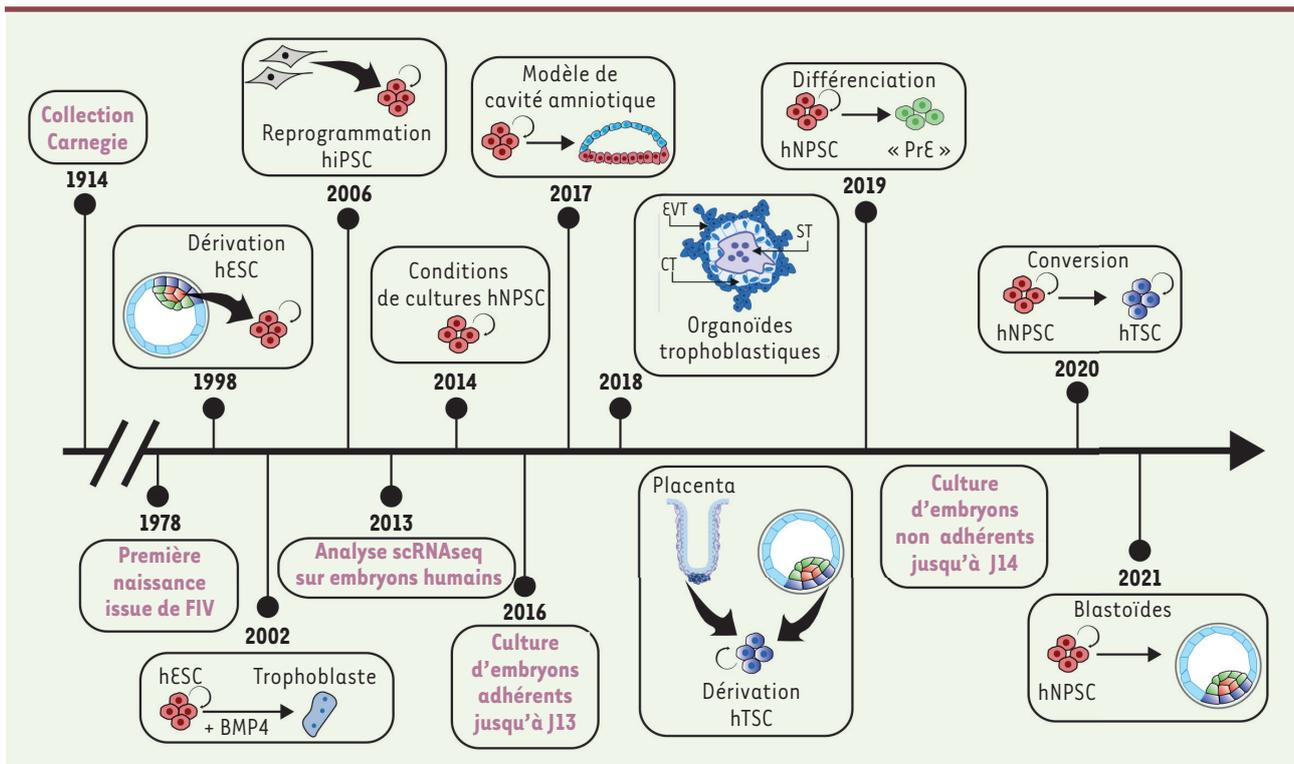


Figure 2. Frise chronologique des découvertes ayant un impact sur notre compréhension du développement péri-implantatoire humain. Références bibliographiques : 1914, 1970, 1998 [14] ; 2002 [46] ; 2006 [47] ; 2013 [4] ; 2014 [15, 16] ; 2016 [10, 11] ; 2017 [48] ; 2018 [13, 26, 49] ; 2019 [12, 22] ; 2020 [25, 28, 29, 50] ; 2021 [32-34].

Générer des milliers de blastoïdes par semaine est donc désormais possible. Cette avancée permet de pallier le manque d'embryons disponibles et de rechercher, par exemple, de nouvelles cibles thérapeutiques, comme le montre l'étude de l'équipe de Kagawa [32], avec l'utilisation d'un contraceptif capable d'inhiber le phénomène d'implantation. Les blastoïdes générés permettent également de mieux comprendre les phénomènes d'implantation. L'approfondissement des connaissances dans ce domaine pourrait permettre d'améliorer les taux de réussite des FIV, de comprendre des maladies comme la pré-éclampsie, deuxième cause de décès maternels en France, ou encore le placenta *praevia*³. Le modèle de l'embryon humain reste cependant la référence indispensable pour valider les observations réalisées dans des modèles alternatifs, tels que les blastoïdes.

Les gastruloïdes : une fenêtre sur l'inconnu

Parmi les modèles expérimentaux émergents fondés sur l'utilisation des cellules souches pluripotentes (PSC), figure notamment le modèle gastruloïde. Les gastruloïdes sont dérivés d'un nombre précis de hPSC qui subissent une prolifération contrôlée conduisant à l'ébauche des trois tissus germinaux. Des similitudes existent entre gastruloïdes dérivés de hPSC et gastruloïdes issus de cellules souches embryonnaires (ESC) de souris [36]. Les gastruloïdes humains arrivent à initier la somitogenèse, c'est-à-dire la segmentation liée au canal chordal, mais pas jusqu'à la formation de somites à l'origine des vertèbres et du système nerveux. Ce modèle peut

cependant être utilisé pour comprendre la morphogenèse jusqu'à la gastrulation, et sert aussi de référence pour les tests tératologiques [37].

Discussion

L'étude du développement péri-implantatoire humain n'a jamais été aussi dynamique (Figure 2). La combinaison des modèles animaux, des nouvelles techniques, des modèles cellulaires et leur assemblage en blastoïdes, nous permet désormais d'émettre des hypothèses sur les besoins de l'embryon humain lors des premières semaines de développement, ainsi que de déterminer l'identité moléculaire d'un embryon humain apte à se développer. Ces modèles permettent d'étudier les différents stades de développement de 0 à 28 d.p.f. (Tableau 1). De nouveaux modèles continuent d'être développés comme, par exemple, les cellules humaines de type 8 cellules (8CPC), une sous-population retrouvée dans des cultures de hNPSC [38].

Ces progrès suivent les évolutions des réglementations nationales [40] et internationales [41]. Ils ne sont cependant pas sans poser de questions éthiques, notamment celle de savoir jusque quand il est acceptable de pousser le développement embryonnaire humain *in vitro* ? Cette

³ Le placenta *praevia* est une localisation anormale du placenta.

0-3 d.p.f.	Les modèles animaux semblent les plus adaptés. Existence d'une sous-population de cellules humaines avec un profil moléculaire de type 8 cellules (8CPC) parmi les hNPSC ; leur fonctionnalité doit être étudiée.
3-5 d.p.f.	Embryons surnuméraires disponibles. Modèles animaux comparables à l'homme, tels que le modèle bovin [2].
5-9 d.p.f.	Les embryons humains surnuméraires restent la référence. Les blastoïdes humains se rapprochent le plus de l'embryon humain. Possibilité d'attachement à une couche de cellules endométriales. Les NPSC représentent l'épiblaste et peuvent se différencier en trophoctoderme et endoderme primitif.
9-14 d.p.f.	Étude d'embryons humains en culture prolongée. Les PSC amorcées et les TSC permettent l'étude de l'épiblaste et du trophoblaste post-implantatoire. Le modèle blastoïde peut se développer jusqu'à 12 d.p.f. mais, au-delà, le modèle n'est pas maîtrisé.
14-28 d.p.f.	Étude sur un embryon : l'analyse des transcriptomes des cellules lors de la gastrulation [51] a permis d'établir le passage d'un disque embryonnaire à un embryon avec trois axes : antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral. Il y a une concordance spatio-temporelle précise corrélée à l'état transcriptionnel. Cela reste cependant observationnel. Le modèle le plus complexe est celui des gastruloïdes, mais il ne permet pas l'obtention des annexes extra-embryonnaires ni des tissus neuronaux antérieurs et des tissus extra-embryonnaires. En France, les premières IVG sont réalisées à partir de 21 d.p.f.

Tableau I. Les différents modèles disponibles selon les périodes du développement embryonnaire humain.

GLOSSAIRE

Cellule souche pluripotente humaine (hPSC) : la pluripotence cellulaire est la faculté à se différencier en cellules d'un des trois feuillettes embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), ou cellules germinales.

Cellule souche embryonnaire humaine (hESC) : cellule souche pluripotente retrouvée dans un embryon durant le stade blastocyste.

Cellule souche pluripotente humaine induite (hiPSC) : cellule souche pluripotente générée en laboratoire à partir d'une cellule somatique.

Cellule souche trophoblastique (hTSC) : cellule souche ayant la capacité de former tous les types cellulaires trophoblastiques retrouvés dans le placenta.

Cytotrophoblaste : couche la plus interne du trophoblaste à l'origine du futur placenta dans sa partie fœtale.

Days post fertilization (d.p.f.) : jour post-fécondation.

Endoderme primitif (ou hypoblaste) : couche de cellules entre l'épiblaste et le blastocœle qui sera ensuite remplacée par l'endoderme définitif.

Épiblaste : cellules pluripotentes de l'embryon, qui donneront naissance à tous les types cellulaires du fœtus.

Fécondation in vitro (FIV) : technique médicale qui consiste à reproduire la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde pour obtenir un embryon, en laboratoire, lorsque celle-ci ne se fait pas naturellement.

Masse cellulaire interne : partie interne de l'embryon constituée de l'épiblaste et de l'hypoblaste.

Procréation médicalement assistée (PMA) : ensemble de techniques médicales, cliniques et biologiques, permettant la procréation en dehors du processus naturel.

Syncytiotrophoblaste : couche la plus externe du trophoblaste à l'origine du futur placenta dans sa partie maternelle.

Trophoctoderme : couche externe de la cellule morula, à l'origine du placenta.

question est d'autant plus d'actualité qu'une équipe de l'université de Cambridge aux États-Unis [42] et une équipe de l'institut Weizmann en Israël [43] ont récemment rapporté la formation de modèles embryonnaires murins au 8^e jour de développement, produits *ex vivo* à partir de cellules souches pluripotentes de souris, et qui présentent une gastrulation complète avec neurulation et une organogenèse de nombreux organes, notamment le cœur. Un autre point important de vigilance est la terminologie employée, les termes « embryons synthétiques » étant clairement proscrits car ne reflétant pas la réalité des résultats.

Ces modèles vont toutefois permettre d'étudier des questions jusqu'alors restées sans réponse comme celle de savoir comment se déroule l'implantation de l'embryon humain. Ils vont également permettre d'étudier en profondeur les contenus protéiques des embryons humains et de tester le rôle fonctionnel de ces protéines. La biologie de la reproduction entre donc dans une nouvelle ère qui devrait permettre de franchir le seuil de 25 % de naissance par cycle de FIV. ♦

SUMMARY

New models to study human embryonic development

Since 2021, assisted reproductive technologies (ART) are available to infertile couples, but also to single women and female couples. The process of *in vitro* fertilization (IVF) has allowed to cross the threshold of 5 million births worldwide, between 1978 and 2013. However, the failure rate per each IVF cycle is estimated to be around 75%. Therefore, there is a need to better understand human embryonic development in order to improve the success rate of IVF. Study models have evolved significantly in recent years: development of embryo culture, sequencing of the transcriptome of individualized cells, discovery of culture conditions for naive pluripotent stem cells and generation of blastoids. Here, we review these recent advances in human embryo modeling that establish a new knowledge base for improving ART. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Gerri C, McCarthy A, Alanis-Lobato G, et al. Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature* 2020 ; 587 : 443-47.
- Roode M, Blair K, Snell P, et al. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev Biol* 2012 ; 361 : 358-63.
- Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol* 2013 ; 375 : 54-64.
- Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013 ; 20 : 1131-9.
- Blakeley P, Fogarty NME, Valle I del, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* 2015 ; 142 : 3151-65.
- Petropoulos S, Panola SP, Schell JP, et al. Single-cell RNA sequencing: revealing human pre-implantation development, pluripotency and germline development. *J Intern Med* 2016 ; 280 : 252-64.
- Meistermann D, Loubersac S, Reigner A, et al. Spatio-temporal analysis of human preimplantation development reveals dynamics of epiblast and trophectoderm. *bioRxiv* 2019 ; 604751.
- Aberkane A, Essahib W, Spits C, et al. Expression of adhesion and extracellular matrix genes in human blastocysts upon attachment in a 2D co-culture system. *Mol Hum Reprod* 2018 ; 24 : 375-87.
- Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017 ; 550 : 67-73.
- Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 2016 ; 18 : 700-8.
- Deglincerti A, Etoc F, Guerra MC, et al. Self-organization of human embryonic stem cells on micropatterns. *Nat Protoc* 2016 ; 11 : 2223-32.
- Xiang L, Yin Y, Zheng Y, et al. A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. *Nature* 2020 ; 577 : 537-42.
- Okae H, Toh H, Sato T, et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2018 ; 22 : 50-63 e6.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7.
- Takahima Y, Guo G, Loos R, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 2014 ; 158 : 1254-69.
- Theunissen TW, Powell BE, Wang H, et al. Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014 ; 15 : 471-87.
- Kilens S, Meistermann D, Moreno D, et al. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 360.
- Liu X, Nefzger CM, Rossello FJ, et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming. *Nat Methods* 2017 ; 14 : 1055-62.
- Vallot C, Patrat C, Collier AJ, et al. XACT Noncoding RNA Competes with XIST in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. *Cell Stem Cell* 2017 ; 20 : 102-11.
- Meistermann D, Bruneau A, Loubersac S, et al. Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell* 2021 ; 28 : 1625-40.e6.
- Radley A, Corujo-Simon E, Nichols J, et al. Entropy sorting of single-cell RNA sequencing data reveals the inner cell mass in the human pre-implantation embryo. *Stem Cell Rep* 2022 ; S2213671122004568.
- Linneberg-Agerholm M, Wong YF, Romero Herrera JA, et al. Naive human pluripotent stem cells respond to Wnt, Nodal and LIF signalling to produce expandable naive extra-embryonic endoderm. *Development* 2019 ; 146.
- Guan J, Wang G, Wang J, et al. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 2022 ; 605 : 325-31.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 ; 292 : 154-6.
- Castel G, Meistermann D, Bretin B, et al. Induction of Human Trophoblast Stem Cells from Somatic Cells and Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 2020 ; 33 : 108419.
- Turco MY, Gardner L, Kay RG, et al. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature* 2018 ; 564 : 263-7.
- Amita M, Adachi K, Alexenko AP, et al. Complete and unidirectional conversion of human embryonic stem cells to trophoblast by BMP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : E1212-21.
- Cinkornpumin JK, Kwon SY, Guo Y, et al. Naive Human Embryonic Stem Cells Can Give Rise to Cells with a Trophoblast-like Transcriptome and Methylome. *Stem Cell Rep* 2020 ; 15 : 198-213.
- Dong C, Beltcheva M, Gontarz P, et al. Derivation of trophoblast stem cells from naive human pluripotent stem cells. *Elife* 2020 ; 9 : e52504.
- Karvas RM, Khan SA, Verma S, et al. Stem-cell-derived trophoblast organoids model human placental development and susceptibility to emerging pathogens. *Cell Stem Cell* 2022 ; 29 : 810-25.e8.
- Rivron NC, Frias-Aldeguer J, Vrij EJ, et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature* 2018 ; 557 : 106-11.
- Kagawa H, Javali A, Khoei HH, et al. Human blastoids model blastocyst development and implantation. *Nature* 2022 ; 601 : 600-5.
- Yu L, Wei Y, Duan J, et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature* 2021 ; 591 : 620-6.
- Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell* 2021 ; 28 : 1016-22.e4.
- Zhao C, Reyes AP, Schell JP, et al. Reprogrammed blastoids contain amnion-like cells but not trophectoderm. *Developmental Biology*, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.07.442980>
- Moris N, Anlas K, Brink SC van den, et al. An in vitro model of early anteroposterior organization during human development. *Nature* 2020 ; 582 : 410-5.
- Arias AM, Marikawa Y, Moris N. Gastruloids: Pluripotent stem cell models of mammalian gastrulation and embryo engineering. *Dev Biol* 2022 ; 488 : 35-46.
- Taubenschmid-Stowers J, Rostovskaya M, Santos F, et al. 8C-like cells capture the human zygotic genome activation program in vitro. *Cell Stem Cell* 2022 ; 29 : 449-59.e6.
- Mazid MdA, Ward C, Luo Z, et al. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage. *Nature* 2022 ; 605 : 315-24.
- Reignier A, Loubersac S, Lammers J, et al. Recherche sur l'embryon humain : le point après la révision de la Recherche sur l'embryon humain : le point après la révision de la loi de bioéthique de 2021. *La Lettre du Gynécologue* 2022 ; 437.
- Lovell-Badge R, Anthony E, Barker RA, et al. ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. *Stem Cell Rep* 2021 ; 16 : 1398-408.
- Amadei G, Handford CE, Qiu C, et al. Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis. *Nature* 2022 ; 610 : 143-53.
- Tarazi S, Aguilera-Castrejon A, Joubran C, et al. Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs. *Cell* 2022 ; 185 : 3290-306.e25.
- Goedel A, Lanner F. A peek into the black box of human embryology. *Nature* 2021 ; 600 : 223-4.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology* - 6th ed. New York : Elsevier, 2020.
- Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002 ; 20 : 1261-4.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
- Shao Y, Taniguchi K, Townshend RF, et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 208.
- Haider S, Meinhardt G, Saleh L, et al. Self-Renewing Trophoblast Organoids Recapitulate the Developmental Program of the Early Human Placenta. *Stem Cell Rep* 2018 ; 11 : 537-51.
- Liu X, Ouyang JF, Rossello FJ, et al. Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature* 2020 ; 586 : 101-7.
- Tyser RCV, Mahammadov E, Nakanoh S, et al. Single-cell transcriptomic characterization of a gastrulating human embryo. *Nature* 2021 ; 600 : 285-9.

TIRÉS À PART

L. David