



HAL
open science

Immunité et modèles expérimentaux en recherche pharmaceutique : intégration du système immunitaire dans les modèles organoïdes

Marion Prono

► **To cite this version:**

Marion Prono. Immunité et modèles expérimentaux en recherche pharmaceutique : intégration du système immunitaire dans les modèles organoïdes. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03797452

HAL Id: dumas-03797452

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03797452v1>

Submitted on 4 Oct 2022

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2022

**IMMUNITÉ ET MODÈLES EXPÉRIMENTAUX EN RECHERCHE
PHARMACEUTIQUE : INTÉGRATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE
DANS LES MODÈLES ORGANOÏDES**

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPÉCIALITÉ : RECHERCHE

Par Mme Marion PRONO

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 26/09/2022

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

M. le Dr Emmanuel DROUET

Membres :

Mme le Dr Noëline BERLAND

M. le Dr Olivier DETANTE

M. le Dr Walid RACHIDI (directeur de thèse)

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

LISTE DES ENSEIGNANTS



ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2021 / 2022

Doyen de la Faculté - Pr. Michel SEVE
 Vice-Doyen Pédagogie - Mr Pierre CAVAILLES
 Vice-Doyen Recherche – Pr. Walid RACHIDI

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE | HDR |
|--------------------|--------------------|-------------|---|--------|
| MCF | ALDEBERT | DELPHINE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx | Oui |
| PU-PH | ALLENET | BENOIT | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | Oui |
| PU | BAKRI | ABDELAZIZ | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | Oui |
| CDD | BARDET | JEAN-DIDIER | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | |
| MCF | BATANDIER | CECILE | LBFA – INSERM U1055 | |
| PU-PH | BEDOUCHE | PIERRICK | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS | Oui |
| MCF | BELAIDI-CORSAT | ELISE | HP2, Inserm U1042 | Oui |
| MAST | BELLET | BEATRICE | - | |
| MCF | BOUCHERLE | BENJAMIN | DPM - UMR 5063 CNRS | |
| PU | BOUMENDJEL | AHCENE | LRB /INSERM U 1039 | Oui |
| MCF | BOURGOIN | SANDRINE | TIMC | |
| MCF | BRETON | JEAN | LCIB – UMR E3 CEA | Oui |
| MCF | BRIANCON-MARJOLLET | ANNE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |
| PU | BURMEISTER | WILHEM | UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS | Oui |
| MCU-PH | BUSSER | BENOIT | Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309 | Oui |
| Professeur Emérite | CALOP | JEAN | | Oui |
| MCF | CAVAILLES | PIERRE | IAB | |
| MCU-PH | CHANOINE | SEBASTIEN | CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309 | |
| AHU | CHEVALIER | SIMON | TIMC IMAG | |
| MCF | CHOISNARD | LUC | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MCU-PH | CHOVELON | BENOIT | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MAST | COMBE | JEROME | - | |
| PU-PH | CORNET | MURIEL | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx | Oui |
| Professeur Emérite | DANEL | VINCENT | - | Oui |
| Professeur Emérite | DECOUT | JEAN-LUC | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF Emérite | DELETRAZ-DELPORTE | MARTINE | LPSS – EAM 4129 LYON | équiv. |
| MCF | DEMEILLERS | CHRISTINE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | Oui |
| PU-PH | DROUET | CHRISTIAN | GREPI EA7408 | Oui |
| PU | DROUET | EMMANUEL | IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale | Oui |
| MCF | DURMORT | CLAIRE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | Oui |
| PU-PH | FAURE | PATRICE | DPM – UMR5063 | Oui |
| MCF | FAURE-JOYEUX | MARIE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |

Mise à jour le 06/09/2021 Sana HACHANI

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE | HDR |
|---------------------|-----------------|---------------|---|--------|
| PRCE | FITE | ANDREE | - | |
| MCU-PH | GARNAUD | CECILE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | |
| PRAG | GAUCHARD | PIERRE-ALEXIS | - | |
| MCU-PH | GERMI | RAPHAELE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale | Oui |
| MCF | GEZE | ANNABELLE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF Emérite | GILLY | CATHERINE | DPM – UMR 5063 CNRS | équiv. |
| PU | GODIN-RIBUOT | DIANE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |
| MCF | GONINDARD | CHRISTELLE | LECA – UMR CNRS 5553 | |
| Professeure Emérite | GRILLOT | RENEE | - | Oui |
| MCF | GUIEU | VALERIE | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| CDD | HENNEBIQUE | AURELIE | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | |
| MCF | HININGER-FAVIER | ISABELLE | LBFA – INSERM U1055 | |
| MCF | KHALEF | NAWEL | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | |
| MCF | KOTZKI | SYLVAIN | HP2 – UMR S1042 | |
| MCF | KRIVOBOK | SERGE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| AHU | LEENHARDT | JULIEN | INSERM – U1039 | |
| PU | LENORMAND | JEAN-LUC | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX | Oui |
| PU | MARTIN | DONALD | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS | Oui |
| PRCE | MATTHYS | LAURENCE | - | |
| AHU | MINOVES | MELANIE | HP2 – INSERM U1042 | |
| PU | MOINARD | CHRISTOPHE | LBFA - INSERM U1055 | Oui |
| PU-PH | MOSSUZ | PASCAL | IAB – INSERM U1209 | Oui |
| MCF | MOUHAMADOU | BELLO | LECA – UMR 5553 CNRS | Oui |
| MCF | NICOLLE | EDWIGE | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MCF | OUKACINE | FARID | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF | PERES | BASILE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| MCF | PEUCHMAUR | MARINE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| PU | PEYRIN | ERIC | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| AHU | PLUCHART | HELENE | TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS | |
| PU | RACHIDI | WALID | BGE/BIOMICS/ CEA | Oui |
| PU | RAVELET | CORINNE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |
| PU | RIBUOT | CHRISTOPHE | HP2 – INSERM U1042 | Oui |
| Professeure Emérite | ROUSSEL | ANNE-MARIE | - | Oui |
| PU-PH | SEVE | MICHEL | TIMC | Oui |
| MCF | SOUARD | FLORENCE | DPM – UMR 5063 CNRS | Oui |

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE | HDR |
|--------------------|--------------|---------|-------------------------|-----|
| MCF | SPANO | MONIQUE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | |
| MCF | TARBOURIECH | NICOLAS | IBS – UMR 5075 CEA CNRS | |
| CDD | TRUFFOT | AURELIE | | |
| MCF | VANHAVERBEKE | CECILE | DPM – UMR 5063 CNRS | |
| MCF | WARTHER | DAVID | DPM | |
| Professeur Emérite | WOUESSIDJEW | DENIS | - | Oui |

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

A mon grand-père, le Général de l'Armée de l'Air Claude Paul PRONO.

*Tu t'es battu vaillamment face à un ennemi sans pitié qui a mis le monde à genoux.
Tu es parti rejoindre le paradis des généraux. J'espère pouvoir te rendre fier
de ta petite fille.*

*« Ce n'est pas parce qu'un problème n'a pas été résolu qu'il est impossible à
résoudre » - Agatha Christie, Le mystérieux Mr Quinn*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chacune des personnes qui ont participé de près ou de loin à la rédaction de cette thèse de pharmacie.

Mes remerciements vont tout particulièrement au Dr Walid Rachidi pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse d'exercice.

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir répondu présents pour la toute dernière, mais si importante, étape de ma formation pharmaceutique.

Chacun des enseignants de la faculté, qui ont partagé leurs connaissances avec moi, leur savoir-faire et leur passion tout au long de ces années recevez ma reconnaissance.

Voici pour tous les membres de ma famille, les plus jeunes et les anciens, qui ont su être présents chacun à leur façon, dans les bons comme dans les mauvais moments. Cette thèse, c'est un peu la vôtre au fond.

Je rends grâce au groupe appelé Feux de l'Amour. De petites perles qui ont illuminé mes heures sur les bancs des amphis. Toujours partantes pour une soirée au bar, une randonnée ou une tasse de thé quand l'humeur n'est pas à la fête. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir, ici ou à l'autre bout du monde. Que les astres soient avec nous.

Pour mes amis et toutes les personnes que je n'ai pas cités. Merci pour votre soutien. Merci pour aujourd'hui comme pour hier.

Enfin, Sébastien : tant de raisons de te remercier, mais surtout merci de faire partie de ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| LISTE DES ENSEIGNANTS | 2 |
| REMERCIEMENTS | 6 |
| TABLE DES MATIÈRES | 7 |
| TABLE DES FIGURES | 9 |
| TABLE DES TABLEAUX | 10 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION | 13 |
| PARTIE 1 : Rappels sur le système immunitaire | 15 |
| 1. Définition du système immunitaire | 15 |
| 2. Organes et cellules immunitaires | 16 |
| 3. Systèmes immunitaires inné et adaptatif | 18 |
| 3.1. Système immunitaire inné | 18 |
| 3.2. Système immunitaire adaptatif | 19 |
| 4. Tolérance du système immunitaire | 21 |
| 5. Cellules épithéliales et système immunitaire | 22 |
| 6. Le système immunitaire du système nerveux central | 23 |
| 7. Microbiote et système immunitaire | 25 |
| 8. Système immunitaire et cancers | 25 |
| PARTIE 2 : État des lieux sur les modèles utilisés en recherche fondamentale | 28 |
| 1. Développement d'un médicament | 28 |
| 2. Modèles cellulaires en 2D | 29 |
| 2.1. Définition | 29 |
| 2.2 Cultures de micro-organismes | 30 |
| 2.3 Cultures primaires | 31 |
| 2.4. Culture de lignées cellulaires | 31 |
| 2.5. Avantage et limites des modèles 2D | 32 |
| 3. Modèles animaux | 33 |
| 3.1. Définition | 33 |
| 3.2. Applications des modèles animaux | 34 |
| 3.3. Réglementation et réflexions éthiques | 36 |
| 3.4. Limites biologiques des modèles animaux | 38 |
| 4. Expérimentation chez l'homme | 39 |
| 4.1. Définition | 39 |
| 4.3 Avantages et limites des expérimentations humaines | 41 |
| PARTIE 3 : Les organoïdes | 43 |
| 1. Définition | 43 |
| 2. Production des modèles organoïdes | 44 |
| 2.1 Cellules utilisées pour la production d'organoïdes | 44 |
| 2.2.1 Cellules souches adultes | 45 |
| 2.2.2 Cellules souches pluripotentes | 45 |
| 2.2.3 Cellules souches embryonnaires | 45 |
| 2.2.4 Cellules somatiques et cellules souches pluripotentes induites | 46 |
| 2.2. Protocoles d'obtention des modèles organoïdes | 47 |
| 3. Applications des modèles organoïdes | 51 |

| | |
|---|----|
| PARTIE 4 : Intégration du système immunitaire dans les organoïdes | 55 |
| 1. Co-cultures d'organoïdes et de cellules immunitaires | 55 |
| 1.1. Co-cultures de cellules immunitaires et de micro-organismes | 57 |
| 1.2. Co-cultures de cellules immunitaires et cancéreuses | 57 |
| 1.3. Co-cultures de cérébroïdes et de microglie | 58 |
| 2. Organoïdes Lymphoïdes | 60 |
| 3. Organoïdes et technologie microfluidique | 61 |
| PARTIE 5 : Challenges des modèles organoïdes | 64 |
| 1. Limitations techniques | 64 |
| 2. Réflexions éthiques et organoïdes | 65 |
| CONCLUSION | 68 |
| BIBLIOGRAPHIE | 69 |
| SERMENT DE GALIEN | 79 |
| RÉSUMÉ | 80 |
| RÉSUMÉ | 81 |

TABLE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Système immunitaire et santé. | 16 |
| Figure 2. Cellules immunitaires dérivées des cellules souches hématopoïétiques | 17 |
| Figure 3. Intensité de la réaction immunitaire après rencontre avec un antigène | 21 |
| Figure 4. Tolérance immunitaire : élimination des cellules immunitaires | 22 |
| Figure 5. Processus de développement d'un médicament : de la recherche fondamentale à la mise sur le marché. | 29 |
| Figure 6. Isolation des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) | 31 |
| Figure 7. Rapport ministériel 2020 : expérimentation animale en France | 35 |
| Figure 8. Organes modélisés par les systèmes organoïdes. | 44 |
| Figure 9. Établissement d'organoïdes dérivés de cellules souches pluripotentes ou de cellules souches tissulaires. | 47 |
| Figure 10. Applications des organoïdes obtenus à partir de cellules souches | 52 |
| Figure 11. Système de co-cultures autologues | 56 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Classification des types d'études réalisées chez la personne humaine | 41 |
| Tableau 2. Principaux réactifs, facteurs de croissance, facteurs de différenciation utilisés dans les cultures organoïdes | 51 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : en 2 dimensions

3D : en 3 dimensions

Ac : Anticorps

AdSC : Cellules souches adultes

Ag : Antigène

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

BCR : B Cell Receptor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CD : Cluster de Différenciation

CE : Conseil de l'Europe

CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CPP : Comité de Protection des Personnes

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSI : Cellules Souches Intestinales

DAMPs : motifs moléculaires associés à des dommages cellulaires (Damaged Associated Molecular Patterns)

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

ECM : Matrice ExtraCellulaire (ExtraCellular Matrix)

EMA : Agence Européenne du Médicament

GALT : Tissu Lymphoïde Associé au Tube Digestif (Gut Associated Lymphoid Tissue)

GC : Centre Germinatif

hESC : Cellules Souches Embryonnaires (human Embryonic Stem Cells)

hPSC : Cellules Souches Pluripotentes (human Pluripotent Stem Cells)

IL : Interleukine

iMGL : Microglie Induite (inducted Microglia)

iPSC : Cellules Souches Pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells)

LB : Lymphocyte B

LGR5 : Leucine-Rich repeat G-protein-coupled Receptor 5

LT : Lymphocyte T

LTc : Lymphocytes T cytotoxiques

LTh : Lymphocytes T auxiliaires (ou helpers)

MALT : Tissue Lymphoïde Associé aux Muqueuses (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue)

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MO : Moëlle Osseuse

NK : Natural Killers

PAMPs : Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes (Pathogen Associated Molecules Patterns)

PBMC : Cellules Mononuclées de Sang Périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PDO : Organoïde Dérivé de Patient (Patient-Derived Organoid)

PRR : Récepteurs reconnaissant des profils moléculaires (Pattern Recognition Receptors)

PSC : Cellules Souches Pluripotentes (Pluripotent Stem Cells)

REACH : Règlement Européen enregistrement, évaluation et Autorisation des produits CHimiques

SC : Cellules Souches (Stem Cells)

SEP : Sclérose En Plaques

SNC : Système Nerveux Central

TAM : Macrophage Associé à la Tumeur (Tumor Associated Macrophage)

TIL : Lymphoïde infiltrant de la Tumeur (Tumor-Infiltrating Lymphocyte)

TCR : T Cell Receptor

Treg : Lymphocyte T régulateur

UE : Union Européenne

INTRODUCTION

Un organisme vivant est un ensemble complexe, composé de différentes structures qui interagissent entre elles. Parmi ces composantes, le système immunitaire assure une mission essentielle de protection de l'organisme face aux agressions, qu'elles soient d'origine exogène ou endogène. Il intervient dans de nombreux mécanismes physiologiques et physiopathologiques comme le maintien de l'homéostasie cérébrale ou l'apparition de maladies neurodégénératives.

Le développement d'un médicament est un processus long qui suit une réglementation stricte. L'efficacité et l'innocuité des candidats médicaments sont évaluées successivement sur des modèles *in vitro* et différentes espèces animales lors des essais précliniques, puis chez l'Homme durant des essais cliniques. Or certains modèles d'étude utilisés restent éloignés de la physiologie humaine et n'intègrent pas toujours le système immunitaire. Leur manque de représentativité est un facteur conduisant à de nombreux échecs de mise au point de médicaments, qui pourraient pourtant être évités très tôt dans leur processus de développement.

Ces dernières années ont vu l'apparition de nouveaux modèles appelés organoïdes. Ces structures en 3 dimensions (3D) fabriquées à partir de cellules prélevées sur des animaux ou directement chez l'humain, sont capables de reproduire au moins partiellement l'anatomie et le fonctionnement des organes. Des études récentes ont réussi à concevoir des organoïdes immunocompétents ouvrant ainsi la voie à de nombreuses perspectives en recherche pharmaceutique.

Après quelques rappels sur le système immunitaire et les modèles

expérimentaux déjà utilisés dans l'industrie pharmaceutique, l'objectif de cette thèse consiste en faire un état des lieux sur les avancées autour des organoïdes et de présenter les différents moyens d'intégrer le système immunitaire à ces modèles. La dernière partie aborde les limites et les réflexions éthiques autour de l'utilisation de ces technologies innovantes.

PARTIE 1 : Rappels sur le système immunitaire

1. Définition du système immunitaire

Le mot « immunité » dérive du latin *immunis* qui signifie « exempté de ». En droit, ce terme juridique désigne une personne ou une caste exemptée de charges, de services. En médecine et biologie, le terme « immunité » tire son nom de premières observations ayant mis en évidence une protection de l'organisme contre des bactéries grâce à une composante appelée système immunitaire [1].

Le système immunitaire est un mécanisme de défense présent chez tous les êtres vivants, des mammifères aux végétaux. Chez l'Homme, il regroupe l'ensemble des processus physiologiques permettant de protéger un hôte contre des agents pathogènes (ex : virus, bactéries, champignons, parasites, molécules protéiques néfastes pour l'organisme) ou contre des cellules modifiées (ex : cellules cancéreuses). Il est constitué d'organes et de cellules interagissant entre eux pour médier une réponse immunitaire face à un danger, qu'il soit d'origine exogène ou endogène [2]. Le rôle du système immunitaire ne se limite pas à cette mission de protection. Il intervient également dans divers mécanismes physiologiques ou physiopathologiques comme la cicatrisation, la gestion de la douleur ou encore le maintien de l'homéostasie au niveau cérébral (Figure 1).

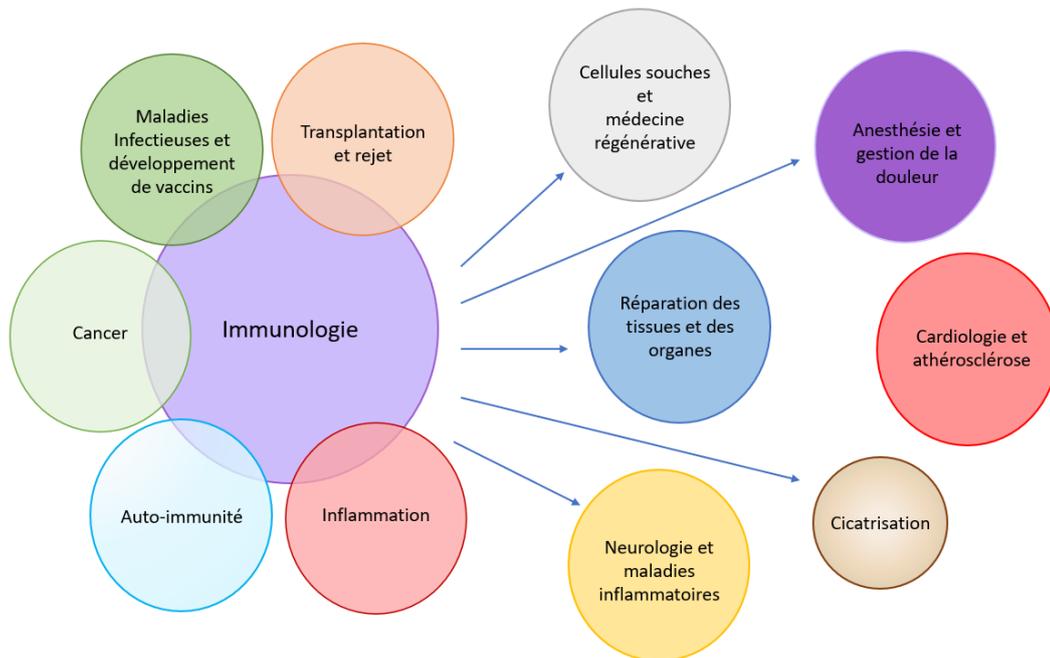


Figure 1. Système immunitaire et santé.

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans différents processus biologiques et pathologiques, notamment dans la capacité de résistance, de récupération et de maintien de l'homéostasie

Schéma adapté de [3]

2. Organes et cellules immunitaires

Le système immunitaire comprend des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Ils sont essentiels dans les processus de production, différenciation, maturation et recrutement des cellules immunitaires en cas de détection de signaux de danger [4].

Les organes lymphoïdes primaires sont au nombre de deux : le thymus et la moëlle osseuse (MO). Ils assurent la production et la maturation de la majorité des lignées cellulaires du système immunitaire.

Après la petite enfance, la plupart des cellules sont produites dans la MO (Figure 2). Elles dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui se différencient dans un second temps en cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes.

La lignée myéloïde aboutit à la formation des monocytes, macrophages,

cellules dendritiques, granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), et des cellules mastocytes. Elle fournit également les érythrocytes, ou hématies, et les mégacaryocytes précurseurs des thrombocytes.

Les cellules lymphoïdes progénitrices, quant à elles, sont les précurseurs des cellules Natural Killer (NK), des lymphocytes B (LB) ou cellules B, et des lymphocytes T (LT) ou cellules T. La MO assure la production et la maturation des LB ainsi que la production des LT. De son côté, le thymus composé de thymocytes et de cellules stromales, permet la thymopoïèse, qui correspond à l'ensemble des évènements conduisant à la différenciation des LT, et la maturation des LT [5].

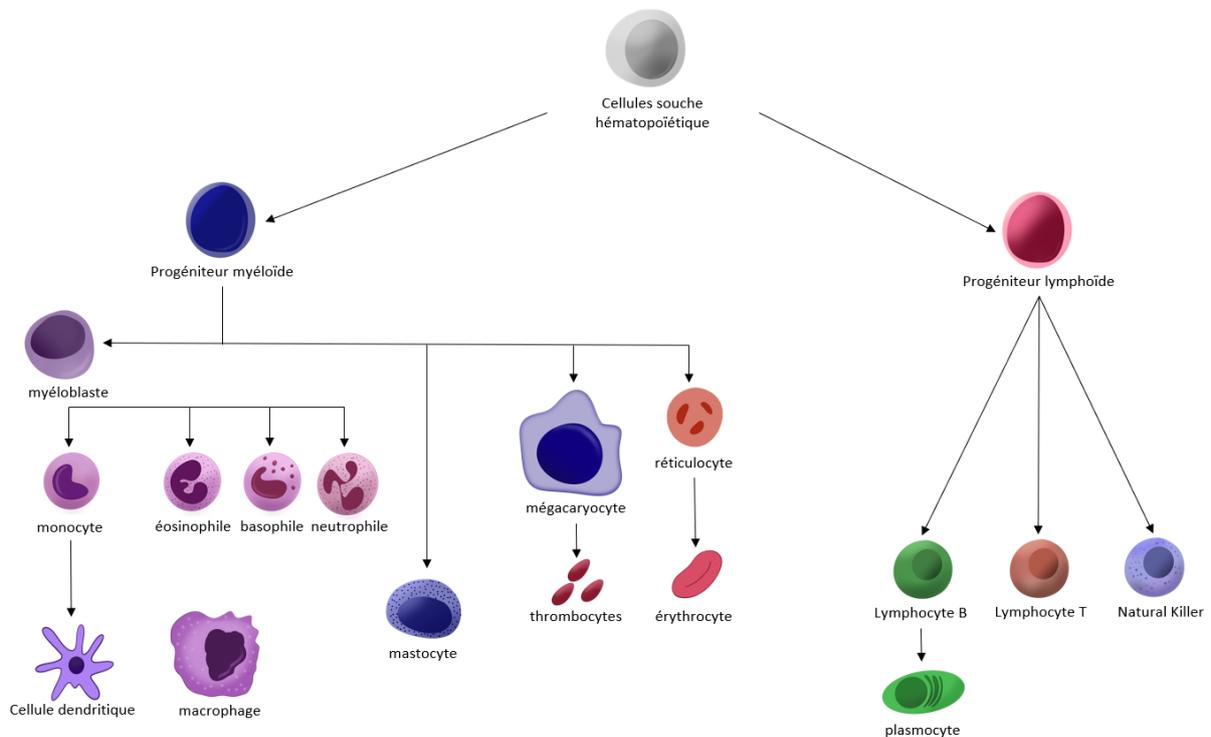


Figure 2. Cellules immunitaires dérivées des cellules souches hématopoïétiques

Ces cellules peuvent être subdivisées en sous-populations en fonction de l'expression de récepteurs et de marqueurs présents à leur surface ou en intracellulaire (ex : clusters de différenciation (CD)). Ils assurent des fonctions fondamentales, comme le transport du glucose dans les cellules. Les récepteurs associés au système immunitaire ont généralement pour fonction de détecter des

signes de danger dans l'environnement comme la présence de pathogènes ou une mort cellulaire anormale [6].

Ainsi on définit plusieurs populations de lymphocytes : les lymphocytes CD4 positifs, aussi appelées LT auxiliaires (LTh), et les lymphocytes CD8+ ou LT cytotoxiques (LTc) forment les lymphocytes $\alpha\beta$ T conventionnels avec les LT régulateurs (Treg). On trouve également des lymphocytes γ/δ T dits non conventionnels.

Les organes lymphoïdes secondaires comprennent la rate, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) et les ganglions lymphatiques. Ils sont le lieu de recrutement des cellules B et T via présentation de fragments protéiques de molécules reconnues comme signal de danger, nommés antigène (Ag), par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ils garantissent le dialogue entre les deux composantes principales du système immunitaire : le système immunitaire inné, dit naturel ou non spécifique, et le système immunitaire adaptatif, ou spécifique.

3. Systèmes immunitaires inné et adaptatif

3.1. Système immunitaire inné

Chez les vertébrés, le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme [7]. Il est présent dès la naissance de l'individu. Il comprend l'ensemble des cellules de la lignée myéloïde (à l'exception des érythrocytes et des thrombocytes), les cellules lymphoïdes innées dont font partie les cellules NK et les lymphocytes γ/δ T qui sont à l'interface entre les systèmes inné et adaptatif. Des cellules sentinelles sillonnent les tissus jusqu'à détecter

des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou des motifs moléculaires associés à des dommages cellulaires (DAMPs) relargués par des cellules mortes ou celles dont la barrière membranaire a été compromise. Ces molécules de danger sont reconnues par des récepteurs reconnaissant des profils moléculaires (PRRs). Ils peuvent être solubles ou cellulaires, localisés directement sur la membrane extracellulaire ou au niveau cytosolique. La liaison des PRRs avec leurs ligands déclenche des cascades de signalisation intracellulaires entraînant une réponse inflammatoire qui vise à éliminer le danger. La production de cytokines pro-inflammatoires qui en résulte (ex: histamine, Interleukine-6 [IL6], Interféron- γ [IFN γ]) permet l'amplification de la réponse en recrutant les cellules immunitaires vers le lieu de l'inflammation.

Un des mécanismes principaux de défense mis en place par le système immunitaire inné est la phagocytose. Des cellules phagocytaires dites professionnelles se servent de leur membrane plasmique pour internaliser les micro-organismes ou microparticules afin de les éliminer [8-9].

A cela s'ajoutent d'autres mécanismes qui facilitent l'élimination des éléments pathogènes par le système immunitaire comme la présence de barrières physiques (ex: peau), la sécrétion de mucus par les cellules tissulaires, l'activation de la cascade du complément et la lyse de cellules infectées ou transformées par les cellules NK [7].

3.2. Système immunitaire adaptatif

Il peut arriver que la réponse du système immunitaire inné ne soit pas suffisante. Dans ce cas, les cellules phagocytaires internalisent l'Ag et vont l'exprimer à leur surface membranaire. Elles deviennent alors des CPA et

peuvent présenter cet Ag aux cellules du système immunitaire adaptatif. Cette interaction conduit au recrutement des lymphocytes α/β T (auxiliaires, cytotoxiques, régulateurs) et LB. La reconnaissance de l'Ag par les cellules T et les cellules B est médiée par la liaison entre l'Ag et leur *T cell receptor* (TCR) ou *B cell receptor* (BCR) respectivement. Le recrutement des LT nécessite que l'Ag soit associé à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I pour les LT CD8 et de classe II pour les LT CD4. Les cellules activées vont proliférer pour constituer un pool de cellules clonales capables de cibler les éléments porteurs de cet Ag. C'est le phénomène d'expansion clonale. L'activation antigénique associée à la présence de cytokines pro-inflammatoires guident les lymphocytes vers leur lieu où leur action est requise.

Les LB médient la réponse humorale. Une fois activés, ils se différencient en cellules plasmocytes productrices d'anticorps (Ac). Ces Ac neutralisent les agents pathogènes en se liant à eux. Ce mécanisme permet leur reconnaissance et leur phagocytose par les cellules de la réponse immunitaire innée qui vont également éliminer les cellules infectées. Les LT quant à eux, médient la réponse cellulaire en collaboration avec les NK. Ils induisent la mort des cellules infectées ou transformées par apoptose via la sécrétion de molécules cytotoxiques [10].

Si le système adaptatif est plus long à se mettre en place, il permet cependant d'induire une réponse très spécifique. Il est doté d'une capacité d'apprentissage et de mémoire à long terme [11]. En effet, une partie des cellules, expandues pendant la réaction immunitaire, deviennent des cellules dites mémoires et vont persister dans l'organisme, parfois durant plusieurs décennies. Ainsi, en cas de deuxième rencontre avec un même Ag, le système immunitaire adaptatif réagira plus rapidement et de façon plus efficace (Figure 3). C'est sur

ce principe que se fonde la vaccination.

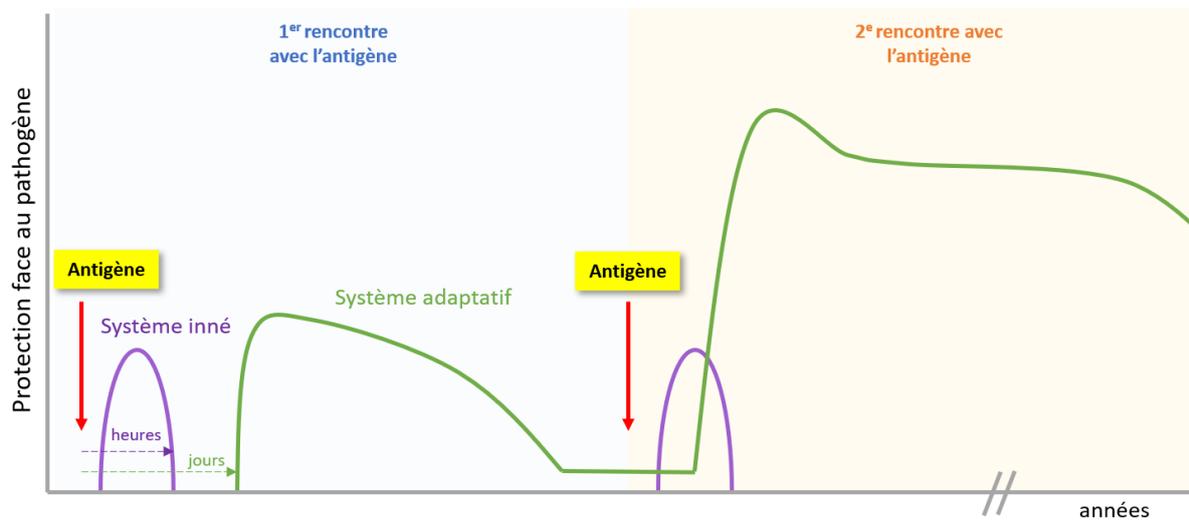


Figure 3. Intensité de la réaction immunitaire après rencontre avec un antigène

4. Tolérance du système immunitaire

Les Ag des agents pathogènes ou cellules transformées présentent parfois des similitudes avec les Ag de l'hôte. De par leur polyspécificité, les lymphocytes peuvent être amenés à reconnaître de façon erronée ces derniers comme signaux de danger.

La tolérance du système immunitaire vis-à-vis des Ag du soi est sous le contrôle d'une régulation fine. Au sein du thymus, les cellules de l'épithélium thymique expriment un certain nombre d'Ag afin de détecter et d'éliminer les LT autoréactifs : c'est la tolérance centrale. Cependant, tous les Ag ne sont pas exprimés au sein du thymus, c'est le cas notamment des Ag alimentaires. Des mécanismes de tolérance additionnels limitent le nombre et/ou la fonction des LT qui ciblent ces Ag. Ils agissent sur les cellules T circulantes matures et font partie de la tolérance périphérique. Ainsi il ne subsiste que les cellules dont l'affinité aux Ag du soi ne représente pas un danger pour l'organisme [12]. Les cellules B porteuses de récepteurs autoréactifs de forte affinité sont de leur côté déplétées par apoptose principalement au sein de la MO (Figure 4).

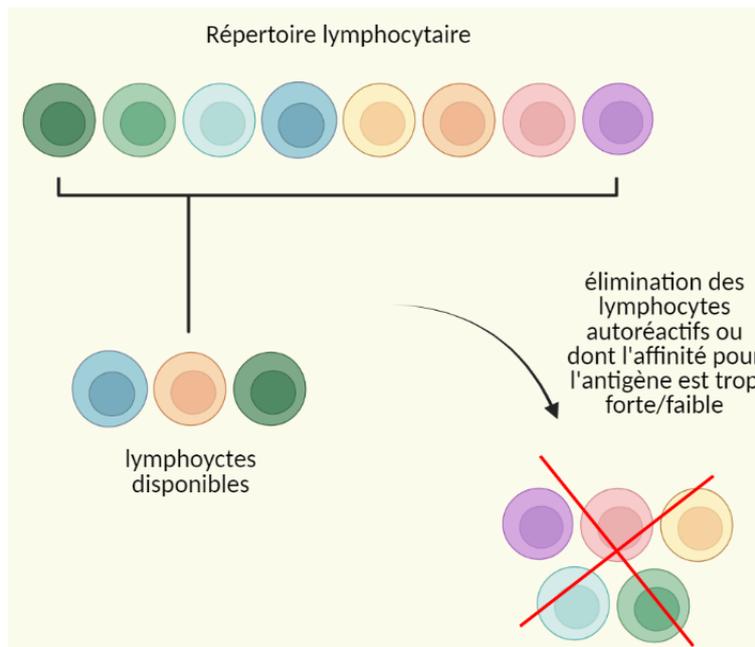


Figure 4. Tolérance immunitaire : élimination des cellules immunitaires (schéma réalisé sur Biorender.com)

Ce système de protection n'est cependant pas infaillible. Une dérégulation de cet équilibre immunitaire peut conduire à une perte de tolérance du système immunitaire vis-à-vis de structures du soi. Les cellules immunitaires se mettent à cibler les Ag de l'hôte reconnus comme étrangers, pouvant conduire au développement de maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organes. A noter que l'environnement (tabagisme, infection virales, etc.), l'épigénétique et la génétique peuvent être des facteurs prédisposants à l'apparition de ces pathologies.

5. Cellules épithéliales et système immunitaire

Le système immunitaire inné est particulièrement présent au niveau des barrières épithéliales (peau, intestin, poumons) qui sont en contact constant avec le monde extérieur [13]. Les cellules épithéliales, qui tapissent ces structures, participent à la reconnaissance des agents pathogènes grâce à l'expression de certains PRR. Leurs interactions avec les cellules immunitaires assurent la

protection de l'organisme face aux infections. Elles facilitent la réparation et la régénération tissulaire en cas de lésions et elles contribuent également à la maturation des cellules immunitaires, comme au niveau du thymus [14].

Les cellules localisées dans ces tissus épithéliaux vont être différentes d'une zone à l'autre. Au niveau de la peau, on retrouve les cellules de Langerhans qui sont des macrophages résidents, ainsi que des cellules dendritiques et des lymphocytes γ/δ T. La barrière intestinale, avec près de 400m² a la surface de contact la plus étendue de l'organisme. La majorité des substances pharmaceutiques administrées par voie orale transite au travers. L'ensemble des cellules MALT au niveau intestinal, appelé aussi GALT pour tissu lymphoïde associé au tube digestif ou *gut-associated-lymphoid-tissue* en anglais, comprend les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés. Enfin, des macrophages et cellules dendritiques résidant dans les voies aériennes préviennent les infections au niveau pulmonaire [13].

6. Le système immunitaire du système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) comprend l'encéphale (cerveau, tronc cérébral, cervelet) et la moelle épinière. Il est isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique (BHE). En conditions physiologiques, elle prévient le passage d'agents pathogènes mais également de cellules immunitaires de la périphérie vers le SNC. Cependant, elle ne constitue pas le seul élément qui permette au SNC de faire face aux agressions exogènes et endogènes.

Pio Del Rio Hortega décrit au début du XXe siècle des cellules distinctes des populations cérébrales déjà identifiées, les astrocytes et les oligodendrocytes, capables de phagocyter au sein même du SNC [15]. Ces cellules immunitaires résidentes du SNC constituent la microglie et se composent

principalement de cellules immunitaires innées [16]. Elles jouent un rôle essentiel dans la mise en place des structures cérébrales au cours du développement pré et postnatal, et assurent le maintien de l'homéostasie cérébrale en collaboration avec les autres cellules du SNC [16-17].

Les cellules microgliales ont une longue durée de vie. Elles s'autorenouvellent avec un taux de prolifération relativement faible. Contrairement aux autres cellules immunitaires qui dérivent majoritairement de la MO, leurs précurseurs myéloïdes sont issus du sac vitellin, une structure extra-embryonnaire. Ces derniers migrent en direction du cerveau au travers du tube neural et colonisent le parenchyme durant le développement fœtal où ils subissent localement un processus de maturation [16,18]. Des observations suggèrent que le phénotype de cellules microgliales diffère d'une zone cérébrale à l'autre [16].

Au même titre que les macrophages périphériques, les cellules microgliales assurent une protection immunitaire. Elles sont à la recherche constante de signaux de danger (ex: DAMPs, PAMPs). L'activation des cellules microgliales induit un changement de leur phénotype. Elles sécrètent alors des cytokines pro- ou anti-inflammatoires qui vont venir influencer sur leur environnement et prendre en charge les éventuelles lésions ou infections. Cependant même "au repos" la microglie reste active. Elle phagocyte notamment les neurones surnuméraires durant le développement cérébral et régulent l'activité pré- et post-synaptique [19].

La microglie a récemment été identifiée comme étant un acteur majeur dans l'apparition et le développement de neuropathologies qu'elles soient inflammatoires, neurodégénératives ou psychiatriques [18,20-21]. Ses mécanismes précis restent cependant encore mal connus.

7. Microbiote et système immunitaire

Le microbiome se définit comme une “communauté microbienne caractéristique” occupant un habitat délimité qui présente des propriétés physico-chimiques particulières. En plus du microbiote, composé d'un ensemble de micro-organismes appartenant à différents règnes du vivant (procaryotes et eucaryotes), le microbiome englobe également leur théâtre d'activité. Il regroupe toutes les structures microbiennes, métabolites, éléments génétiques mobiles (ex : transposons, phages et virus) qui forment des niches écologiques spécifiques. Le microbiome est un micro-écosystème dynamique et interactif susceptible de changer au cours du temps en fonction des habitudes de vie, de la prise de traitements médicaux, de maladies et de l'alimentation. Il s'intègre dans des macro-écosystèmes (ex: organisme humain) où il participe activement à leur bon fonctionnement. Il représente 10^{13} micro-organismes rien qu'au sein du tube digestif [22-23]. Les cellules spécialisées présentes au niveau des barrières épithéliales garantissent un privilège immunitaire à ces micro-organismes qui participent au maintien de l'homéostasie corporelle [13].

Plusieurs études soulignent son rôle dans le développement de pathologies inflammatoires, tant au niveau intestinal que dans le cadre de maladies neurologiques [24]. Il semble ainsi qu'une activation préalable par le microbiome des cellules immunitaires au niveau intestinal conduirait à une activation secondaire de la microglie et favoriserait le développement d'une sclérose en plaques (SEP) [25].

8. Système immunitaire et cancers

Le développement d'un cancer résulte de la prolifération anarchique de

cellules qui présentent une ou plusieurs mutations génétiques. Elles peuvent survenir après l'infection d'un pathogène (ex: le papillomavirus qui augmente le risque de cancer du col de l'utérus), l'exposition à des carcinogènes (ex: amiante, radiations ionisantes, formaldéhyde, etc.) ou être une conséquence d'une inflammation chronique qui participe au maintien d'un stress génotoxique et favorise ainsi l'apparition de mutations au sein du génome [10].

La majorité des cellules du soi présentant des caractéristiques anormales finissent par mourir par d'apoptose. Celles qui arrivent à contourner ce mécanisme, sont soumises à des pressions d'élimination par le système immunitaire. Il assure une immunosurveillance constante afin de les identifier et de les éliminer. Les cellules immunitaires cytotoxiques sont capables de reconnaître des Ag spécifiques des cellules tumorales. Cependant, il arrive qu'une de ces cellules mutées possède un ou plusieurs avantages génétiques lui permettant de se soustraire, au moins temporairement, à cette régulation : c'est ce que l'on appelle l'échappement immunitaire. La cellule va se diviser de façon incontrôlée et conduire à la formation d'une tumeur primaire.

Les cellules tumorales peuvent éduquer les cellules chargées de leur destruction, en leur faisant acquérir des propriétés pro-tumorigènes [26]. Le microenvironnement du cancer, ou microenvironnement de la tumeur, représente l'ensemble des cellules non cancéreuses présentes dans la tumeur, à savoir les fibroblastes, les cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, Treg) et les cellules qui composent les vaisseaux sanguins. Il comprend également les protéases, cytokines, facteurs de croissances ou toute autre protéine sécrétée qui favorisent la croissance de la masse tumorale [27]. La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les cellules tumorales ou du microenvironnement perturbe et freine la réponse immunitaire vis-à-vis de la tumeur via, entre autres,

l'inhibition du recrutement des LT et LB [26].

Le système immunitaire joue ainsi un rôle ambivalent dans la physiopathologie des cancers ; tour à tour protecteur et pro-tumoral. L'étude de ces interactions permet l'exploration de ces mécanismes immuno-oncogènes et l'identification de potentielles cibles thérapeutiques anti-cancéreuses efficaces.

PARTIE 2 : État des lieux sur les modèles utilisés en recherche fondamentale

Comme expliqué précédemment, le système immunitaire est une structure complexe où un ensemble d'éléments interagissent entre eux afin de protéger l'hôte. Des dérèglements de ce système peuvent induire des pathologies diverses allant du développement de cancers à l'apparition de maladies inflammatoires chroniques. Les interactions entre les différents acteurs de cette médiation immunitaire et leurs fonctions n'ayant à ce jour pas tous été identifiés, le développement de traitements reste un processus compliqué. L'utilisation de modèles d'étude permet d'en apprendre davantage sur ces mécanismes. Ils aident à l'élaboration de nouveaux médicaments (ex: vaccins, immunothérapie) et à l'exploration de leurs potentiels effets indésirables immunogènes.

Après une brève présentation du circuit de vie d'un médicament, l'objectif de cette partie est de faire un état des lieux des modèles déjà utilisés par la recherche et l'industrie pharmaceutique. Nous allons passer en revue leurs avantages et leurs inconvénients afin de mettre en exergue les arguments qui poussent au développement de nouveaux modèles expérimentaux.

1. Développement d'un médicament

De la découverte d'une molécule d'intérêt thérapeutique à sa mise sur le marché, il s'écoule généralement entre 10 et 15 ans [28]. Le développement d'un médicament requiert des investissements conséquents estimés à environ 985,3 millions de dollars [29]. En France, la loi exige que le candidat médicament soit testé successivement sur des modèles *in vitro*, des modèles animaux et enfin chez l'Homme. Au cours de ces essais, l'efficacité et l'innocuité de la substance

sont évaluées. Si la balance bénéfices/risques est favorable, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) peut délivrer une autorisation de mise sur le marché (AMM). Une fois commercialisé, la sécurité du médicament continuera à être évaluée grâce à un suivi en continu par la pharmacovigilance et ce jusqu'à son retrait éventuel du marché [30].

Cependant, de nombreux candidats médicaments ne passent pas les phases de test, par manque d'efficacité et/ou parce qu'ils présentent trop d'effets indésirables. Sur 10 000 molécules d'intérêt, 10 feront l'objet d'un brevet et 1 seule obtiendra une AMM [31] (Figure 5).

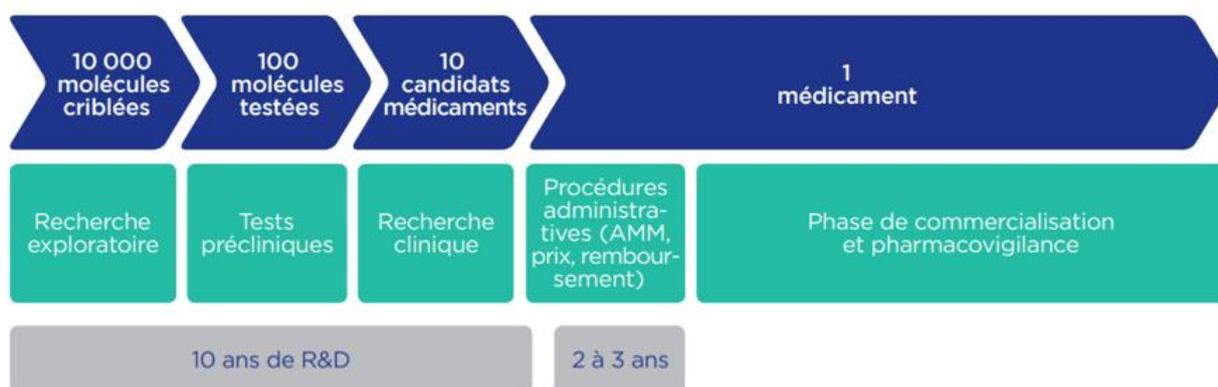


Figure 5. Processus de développement d'un médicament : de la recherche fondamentale à la mise sur le marché.
Schéma adapté de [31].

2. Modèles cellulaires en 2D

2.1. Définition

Les modèles cellulaires en deux dimensions (2D) sont composés de cellules séparées de leur environnement d'origine et disposées dans un milieu de culture contenant des nutriments, facteurs de croissance ou tout autre réactif nécessaire à leur croissance et leur viabilité. Ils permettent d'étudier les mécanismes physio(patho)logiques à l'échelle cellulaire.

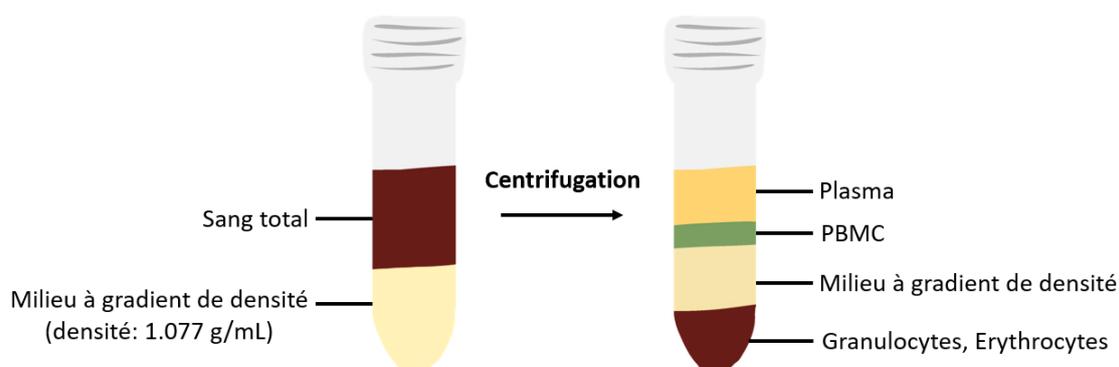
Dès 1910, Ross G. Harrison réussit à maintenir des fibres nerveuses de grenouille en culture *ex vivo*, c'est-à-dire en dehors d'un organisme [32]. Depuis, les modèles 2D se sont enrichis et diversifiés. Les cultures cellulaires peuvent se composer de bactéries, de champignons, de cellules primaires prélevées sur un organisme vivant (animal, humain), de lignées cellulaires immortalisées ou encore de tranches d'organes. Les cellules peuvent être en suspension et baigner dans le milieu de culture, ou dites adhérentes et venir se fixer au fond du contenant dans lequel elles sont stockées. Chaque type cellulaire possède ses propres caractéristiques, ses propres besoins et se maintiendra plus ou moins longtemps en culture.

2.2 Cultures de micro-organismes

Les cultures *in vitro* de micro-organismes (bactéries, champignons, levures) sont des outils intéressants pour étudier le développement de pathogènes. Dans le cadre de la médecine personnalisée, elles sont utilisées à visée diagnostique ou pour tester l'efficacité des traitements antibiotiques et la résistance des souches bactériennes face à ces molécules. À l'échelle industrielle, des cultures de bactéries peuvent être utilisées pour produire des traitements médicamenteux. Dès la fin des années 1970, de l'insuline humaine recombinante est ainsi obtenue à partir de souches d'*Escherichia coli* génétiquement modifiées [33]. Plusieurs modèles de culture de micro-organismes sont d'ailleurs validés par l'Union Européenne (UE) afin d'évaluer le potentiel cancérigène, mutagène ou reprotoxique (CMR) de substances chimiques dans le cadre du règlement européen enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques (REACH) (ex: test d'Ames) [34].

2.3 Cultures primaires

Les cultures obtenues à partir de cellules prélevées directement sur un organisme animal ou humain, sont appelées cultures primaires. Ces cellules peuvent provenir d'un échantillon de liquide biologique (ex: sang, liquide cérébro-spinal) ou être issues de tissus. Les cellules mononucléées périphériques sanguines (LT, LB, monocytes, NK) sont par exemple généralement isolées à partir d'échantillons de sang total (Figure 6). Leur durée de vie en culture est restreinte.



*Figure 6. Isolation des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC)
Schéma adapté de [35]*

2.4. Culture de lignées cellulaires

En se servant de la capacité de prolifération quasi illimitée des cellules cancéreuses et des cellules souches (SC), ont été créées des lignées cellulaires immortalisées. Ces lignées sont isolées directement à partir de cellules cancéreuses ou obtenues après modifications génétiques. La première lignée cellulaire humaine immortalisée a été établie en 1951. Les cellules ont été initialement prélevées chez une patiente du nom d'Henrietta Lacks (1920 – 1951), atteinte d'un adénocarcinome du col de l'utérus et décédée peu de temps après la découverte de son cancer. Nommées cellules HeLa en son honneur,

elles ont permis des avancées considérables en immunologie que ce soit en recherche sur les cancers ou sur des maladies infectieuses. Ces découvertes ont d'ailleurs permis à plusieurs chercheurs de remporter des prix Nobel [36], montrant ainsi l'intérêt majeur des modèles *in vitro* en sciences.

2.5. Avantage et limites des modèles 2D

Les modèles 2D sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique dans les premières phases de développement d'un médicament. Ils permettent de tester de façon relativement simple, rapide et peu coûteuse l'efficacité et l'innocuité de nouvelles substances pharmacologiques. Du fait de leur facilité d'utilisation, il est rendu possible de mener des analyses toxicologiques à haut débit, dites *High Throughput Analysis* où de nombreux composés peuvent être testés simultanément : c'est le criblage de molécules, ou screening toxicologique.

S'ils possèdent des avantages, elles présentent également des limites importantes. Un organisme est un système complexe dans lequel des organes aux fonctions diverses interagissent entre eux via l'intermédiaire de signaux cellulaires, physiques ou chimiques (hormones, cytokines...). Ces cellules évoluent dans un environnement en trois dimensions (3D) que par définition les cultures en 2D ne permettent pas de modéliser. Les paramètres physico-chimiques de conservation des cellules (température, pH, hygrométrie, rugosité du support, etc.) peuvent influencer sur le profil des cellules et leur comportement cellulaire. À titre d'exemple, les cellules sont traditionnellement cultivées sur des surfaces dont la rigidité avoisine les 10^5 kPa pour des boîtes de Petri contre 2 à 10^2 kPa pour les tissus. Leur profil d'expression génique peut en être modifié et, en conséquence, certains réseaux de signalisation cellulaires sont altérés ou absents [37]. Les lignées cancéreuses capables de se maintenir à long terme en

culture, ne peuvent pas pour autant récapituler l'hétérogénéité cellulaire d'un tissu. En effet, les mutations génétiques procancéreuses qui tendent à dérégler un certain nombre de voies cellulaires fondamentales (cycle cellulaire, apoptose...) sont favorisées par sélection positive. Comme il n'est pas toujours possible d'établir une culture de lignées cancéreuses à partir d'échantillon de patient. Ceci conduit à une perte de représentativité de la variabilité génétique interindividuelle. À l'inverse, si les prélèvements d'échantillons primaires permettent de refléter une meilleure diversité cellulaire au sein d'un tissu et interindividuelle, une fois en culture, les cellules ne s'autorenouvellent pas. Un apport de tissu frais régulier est donc nécessaire, ce qui n'est pas toujours compatible avec l'étude d'organes peu accessibles comme le cerveau [38].

Des différences d'efficacité de substances pharmacologiques sont souvent observées entre les modèles en 2D et les modèles *in vivo* [39], en latin "au sein du vivant", qui désigne les expériences menées sur un organisme entier. Ils sont séparés en deux grandes catégories : les recherches menées sur les modèles animaux et les recherches impliquant la personne humaine.

3. Modèles animaux

3.1. Définition

Selon l'*American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging* : "En recherche biomédicale, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales".

3.2. Applications des modèles animaux

Les animaux sont utilisés dès l'Antiquité afin de mieux comprendre l'anatomie et les mécanismes physiologiques ou physiopathologiques de l'organisme humain. Au IV^e siècle avant J-C, Aristote étudie les processus d'embryogenèse et d'ontogenèse sur le poulet. Au XII^e siècle, Abou Merwan Ibn Zuhr, aussi connu sous le nom de Avenzoar en Occident, pratique des techniques de chirurgie sur des animaux pour déterminer leurs conséquences sur l'organisme avant de les appliquer à l'Homme [40]. Il expérimente notamment la trachéotomie sur une chèvre [41].

Les animaux restent à ce jour des modèles d'étude pertinents et essentiels en recherche translationnelle et fondamentale. Lors des essais précliniques le candidat médicament est testé sur au moins deux espèces animales différentes dont une espèce de rongeur (exemple: rat, souris).

Ils permettent d'étudier [42]:

- la **pharmacocinétique** c'est-à-dire le devenir du médicament dans l'organisme: la biodisponibilité, vitesse de distribution et d'élimination de la molécule...
- la **pharmacologie** soit l'impact du médicament sur l'organisme : mécanisme d'action...
- la **toxicité** à la fois sur l'individu (effets indésirables) et l'environnement.

Chaque année, le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation publie une enquête statistique relative à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements français. En 2020, 1 643 787 animaux ont été utilisés à des fins expérimentales (Figure 7). Ce nombre est en baisse par rapport aux chiffres de 2019 (1 865 403 animaux) et

ceux de 2018 (1 910 519 animaux). Cette diminution peut être en partie expliquée par la pandémie de COVID-19 ayant entraînée un ralentissement, voire un arrêt, de l'activité de certains établissements de recherche.

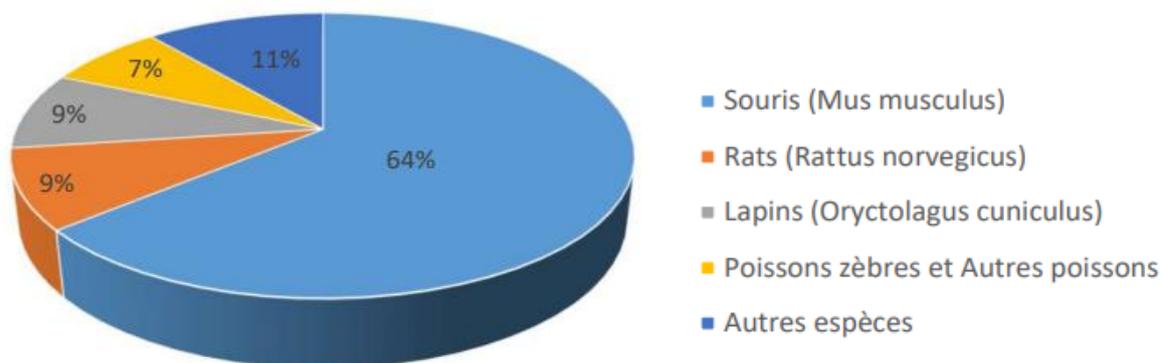


Figure 7. Rapport ministériel 2020 : expérimentation animale en France Répartition en pourcentage (%) des espèces d'animaux utilisées à des fins expérimentales en France en 2020 [43]

La souris est l'animal le plus fréquemment utilisé (64% des utilisations), puis viennent le rat (9.1%), le lapin (8.8%), les poissons (7.3% toutes espèces confondues), et les poulets (4.6%). D'autres types d'animaux sont également utilisés mais ne représentent que 2.6% tout au plus, pris séparément. Les primates représentent seulement 0.24% des utilisations, les chiens 0.25% et les chats 0.06% [43].

Ces essais permettent de prendre en compte la physiologie intégrée au sein d'un organisme entier. Ils sont plus représentatifs de la physiologie humaine que les modèles en 2D. Cependant, s'ils permettent de s'affranchir de certains inconvénients des cultures en 2D, ils présentent également des limites à la fois éthiques, économiques et biologiques.

En immunologie, les modèles animaux les plus utilisés sont les mammifères car leur système immunitaire reste proche de celui de l'être humain. Parmi eux, la souris domestique commune (*Mus musculus*) est le modèle de

prédilection. Son génome connu possède 99% de gènes en commun avec l'Homme. Du fait de sa petite taille (7 à 10 centimètres de long pour 20 à 50 grammes), elle est facilement manipulable. Il est possible d'accueillir une plus grande quantité d'individus au sein d'une même structure. Leur capacité à se reproduire est atteinte aux alentours de 6 semaines chez les femelles et 8 semaines chez les mâles. Le temps de gestation est relativement court (19-21 jours) ce qui permet d'obtenir rapidement de nouvelles générations d'individus [44].

À titre d'exemple, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle d'étude murin de référence de SEP. L'EAE peut être induite ou spontanée. Elle a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes de la SEP, et a permis de tester des médicaments envisagés comme nouveaux traitements pour cette pathologie [45]

3.3. Réglementation et réflexions éthiques

Il est impossible d'aborder la question de l'expérimentation animale sans évoquer la réglementation stricte qui encadre les essais sur les animaux, et les réflexions éthiques relatives à leur utilisation. La loi du 2 juillet 1850, dite Grammont, est la première loi publiée relative à la protection des animaux. Elle interdit d'exercer publiquement tout mauvais traitement envers des animaux domestiques. Au sein de l'Union Européenne (UE), le Conseil de l'Europe (CE) établit en mars 1986 le Convention STE 123 [46] qui servira de point de départ et de laquelle découle les législations européenne et française concernant l'expérimentation animale [47]. Elle a pour objectif de réduire le nombre d'expériences et d'animaux utilisés à des fins scientifiques et de limiter la

souffrance animale [48]. Dans cette optique, elle encourage l'utilisation de méthodes dites alternatives (modèles 2D, in silico, etc.).

En France, la législation encadrant l'utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques est régie par le Code rural et de la pêche maritime des articles R214-87 à R214-137 [49] instaurés par un décret de février 2013 et associés à 5 arrêtés [50]. Il est la transposition dans le droit français de la directive européenne 2010/63/UE. Cette réglementation définit les espèces animales sur lesquelles elle s'applique, et leur origine. Elle précise les conditions d'hébergement et d'entretien des animaux, et les conditions de mise à mort. Elle établit également les modalités d'agrément et de contrôle des établissements éleveurs, fournisseurs et utilisateurs de ces animaux à visée scientifique, ainsi que les procédures expérimentales et les compétences requises pour concevoir ou réaliser des essais sur ces animaux. Depuis, plusieurs décrets et arrêtés sont venus enrichir et préciser la réglementation [51]. Le dernier mis en place date du 17 mars 2020 [52].

L'expérimentation animale est régie par les 3R énoncés par William Russel et Rex Burch dès 1959 dans leur ouvrage "Les principes d'une technique expérimentale conforme à l'éthique" (The Principles of Humane Experimental Technique) à savoir: "réduire", "remplacer", "raffiner" [53]. Ce principe des 3R se base sur la réduction du nombre d'animaux utilisés dans les expériences au strict nécessaire, le remplacement des modèles animaux par des méthodes alternatives quand cela est possible, et enfin par le raffinement consistant à réduire, supprimer, ou soulager la douleur et la détresse provoquées chez les animaux lors des essais [54]. A cela peut s'ajouter un quatrième R pour "responsabilité" qui englobe la notion de réflexion vis à vis de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques et à leur possible réhabilitation.

Respecter le bien-être des animaux en leur fournissant un environnement adapté à leurs besoins ne représente pas uniquement une obligation réglementaire, mais également une nécessité scientifique : “*Happy animals make good science*” qui signifie littéralement “Des animaux heureux font de la bonne science”. Exposer des animaux à des facteurs de stress excessifs ou inutiles peut conduire à des modifications comportementales et/ou physiologiques comme des troubles de la reproduction ou à un affaiblissement du système immunitaire [55]. Ces perturbations peuvent avoir un impact non négligeable sur la qualité des résultats des expériences obtenus. Or, mettre en place et entretenir de telles structures a un coût, qui est à anticiper et qui va dépendre du modèle animal utilisé. Prendre soin de grands mammifères, tels que des chats, des chiens, des cochons, des brebis ou des primates requiert par exemple l'utilisation de locaux plus grands et de plus grandes quantités de nourriture que ceux nécessaires à l'hébergement de rongeurs (souris, rats).

3.4. Limites biologiques des modèles animaux

Le système immunitaire de l'être humain diffère de celui d'autres animaux. Il existe des spécificités d'espèces concernant de nombreux mécanismes cellulaires ou physiologiques. Ces différences sont dues en partie aux différentes niches écologiques, à la taille et à la durée de vie des animaux de laboratoire par rapport à l'homme [13]. Ainsi, les Toll-like Receptors (TLRs), des récepteurs essentiels intervenant dans la détection de pathogènes par le système immunitaire inné, sont au nombre de 10 chez l'homme et 12 chez la souris [56]. Diverses pathologies spécifiques de l'être humain ne sont, à ce jour, pas modélisables chez l'animal.

Du fait de la spécificité d'espèces de certains mécanismes biologiques, les réponses pharmacologiques peuvent différer entre des espèces animales utilisées et celles induites chez l'être humain. De plus, l'utilisation de lignées d'animaux consanguins dans les expériences, ne permet pas de tenir compte de toute la diversité génétique humaine. Il devient alors difficile d'appréhender l'impact du facteur génétique sur l'apparition et le développement de pathologies, de même que la réponse de l'organisme face à de nouveaux traitements médicamenteux [57].

4. Expérimentation chez l'homme

4.1. Définition

Suite aux essais précliniques sur des modèles *in vitro* puis *in vivo* chez l'animal, l'évaluation de l'efficacité et de la tolérance d'une substance est réalisée chez l'humain au cours des essais cliniques. Ils déterminent les conditions d'utilisation optimales du candidat médicament. Il s'agit de recherches prospectives impliquant des sujets volontaires sains ou malades [58].

Les essais cliniques se découpent en 4 phases [59] :

Phase 1 : essais menés sur de petits groupes de volontaires sains ou malades, afin d'analyser la cinétique, c'est-à-dire le devenir d'une substance dans l'organisme, et la toxicité des molécules testées.

Phase 2 : essais menés sur des groupes de patients malades afin de déterminer la dose minimale efficace, la tolérance à court terme et l'efficacité des molécules.

Phase 3 : essais menés sur de plus grands groupes de patients (quelques centaines à plusieurs milliers de malades suivant la pathologie) afin d'évaluer

l'intérêt thérapeutique de la molécule. Le candidat-médicament est comparé à un placebo ou un traitement de référence.

Phase 4 : après obtention de l'AMM, suivi en continu par la pharmacovigilance pour évaluer l'innocuité du traitement à long terme ou identifier d'éventuels mésusages de la substance qui correspondent à *“une utilisation intentionnelle et inappropriée d'un médicament ou d'un produit, non conforme à l'autorisation de mise sur le marché ou à l'enregistrement, ainsi qu'aux recommandations de bonnes pratiques”* [60].

4.2. Réglementation

En France, la première loi à encadrer les essais cliniques est publiée le 20 décembre 1988 dans le Code de la Santé Publique sous le nom de Loi Huriet-Sérusclat [61-62]. La loi Jardé du 5 mars 2012 vient enrichir et compléter cette réglementation. Elle classe les recherches impliquant la personne humaine en trois catégories (Tableau 1) en fonction de la nature de l'intervention et du niveau de risques et contraintes imposés aux sujets [63].

Les recherches appartenant à la catégorie 1 doivent faire l'objet d'une autorisation auprès de l'ANSM. L'ANSM doit toutefois être informée de la réalisation de recherches de catégorie 2 ou 3 avant leur commencement. Les investigateurs sont tenus d'informer et de recueillir le consentement éclairé par écrit de chacun des participants. Toute étude impliquant la personne humaine requiert une autorisation préalable du comité de protection des personnes (CPP).

| Catégorie | Type d'étude | Risque(s) |
|-----------|--------------------|---|
| 1 | interventionnelles | Non négligeables <i>exemples</i> : administration d'un principe actif, chirurgie, ponction lombaire... |
| 2 | interventionnelles | Contraintes minimales qui se limitent à une liste d'interventions établie par le Ministère en charge de la Santé <i>exemples</i> : prise de sang, collecte de données par capteurs, examens radiologiques... |
| 3 | observationnelles | Négligeables <i>exemples</i> : comparaison de pratiques entre deux centres de soins, questionnaire de qualité de vie, utilisation d'un faible volume de sang complémentaire à l'occasion d'un prélèvement... |

Tableau 1 : Classification des types d'études réalisées chez la personne humaine

4.3 Avantages et limites des expérimentations humaines

Les études chez l'humain permettent d'étudier les pathologies associées au système immunitaire en prenant en compte l'individu dans son intégralité. Cela comprend sa génétique mais également son âge, ses antécédents médicaux, ses comorbidités et de manière plus globale tout l'environnement dans lequel il évolue (hygiène de vie, tabagisme, activité sportive, psychologie...). C'est le modèle d'étude le plus pertinent.

Cependant, au même titre que pour l'expérimentation animale, les études menées sur la personne humaine poussent à de véritables questionnements éthiques. Les populations particulières (mineurs, femmes enceintes, personnes très âgées etc.) ne sont généralement pas intégrées dans les essais cliniques sauf dérogation. Si la réglementation limite leur inclusion pour éviter, à raison, des dérives ou pour prévenir la mise en danger éventuelle de ces populations fragiles, il en résulte un manque de données concernant les effets indésirables spécifiques de certaines substances médicamenteuses sur ces individus. Ceci limite grandement l'éventail thérapeutique disponible pour soigner ces

populations. Des adaptations de posologies sont réalisées sans toujours prendre en compte les modifications métaboliques ou physiologiques qui peuvent intervenir à ces différents stades de la vie.

La réglementation stricte qui encadre ces essais, limite grandement les études interventionnelles de grande envergure. De plus, il est impossible de récapituler toutes les particularités génétiques des patients en particulier dans le cadre des cancers. La compréhension de ces mécanismes reste un enjeu crucial de santé publique.

PARTIE 3 : Les organoïdes

Nous l'avons vu, il existe un véritable besoin de développer des méthodes alternatives aux modèles d'études préexistants afin de réduire voire remplacer au maximum l'utilisation d'animaux, améliorer leur représentativité des mécanismes physio(patho)logiques et diminuer les contraintes liées aux expérimentations *in vivo*. Dans l'optique d'apporter des solutions à ces interrogations, de nouveaux modèles *in vitro* ont été mis au point : les organoïdes.

1. Définition

Le terme « organoïde » est composé du mot *organe* et du suffixe *-oïde*, « a la forme de », et signifie donc littéralement « qui a la forme d'un organe ». Il est référencé pour la première fois sur PubMed dans une étude datant de 1946 [64]. La signification du mot « organoïde » a évolué au cours du temps. Dans les années 1950 et 1960, le mot « organoïde » était principalement utilisé pour désigner d'une part des organelles [65-67], qui sont des structures intracellulaires, et d'autre part des excroissances cellulaires ou des tumeurs [68-69] dont la forme pouvait faire penser à un organe. Actuellement, les organoïdes sont définis comme des structures constituées de cellules capables de s'auto-organiser pour former une architecture en 3D possédant au moins partiellement les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles d'un organe [70].

2. Production des modèles organoïdes

Les premières cultures d'organoïdes intestinaux murins sont obtenues en 2009 grâce aux travaux de Sato *et al.* qui établissent les conditions nécessaires à leur croissance [71]. A ce jour, les organoïdes modélisent des organes aux fonctions très diverses : cerveau [72-73], pancréas [74], thyroïde [75], rein [76], foie [77-78], intestins [79-82], rétine [83-84], poumons [85-87], vessie [88-89], glandes salivaires [90], amygdales [91], trompes de Fallope [92], testicules [93-94], utérus [95], estomac [96] (Figure 8), entre autres. Les organoïdes humains peuvent être générés à partir de tissus primaires normaux ou malins [97].

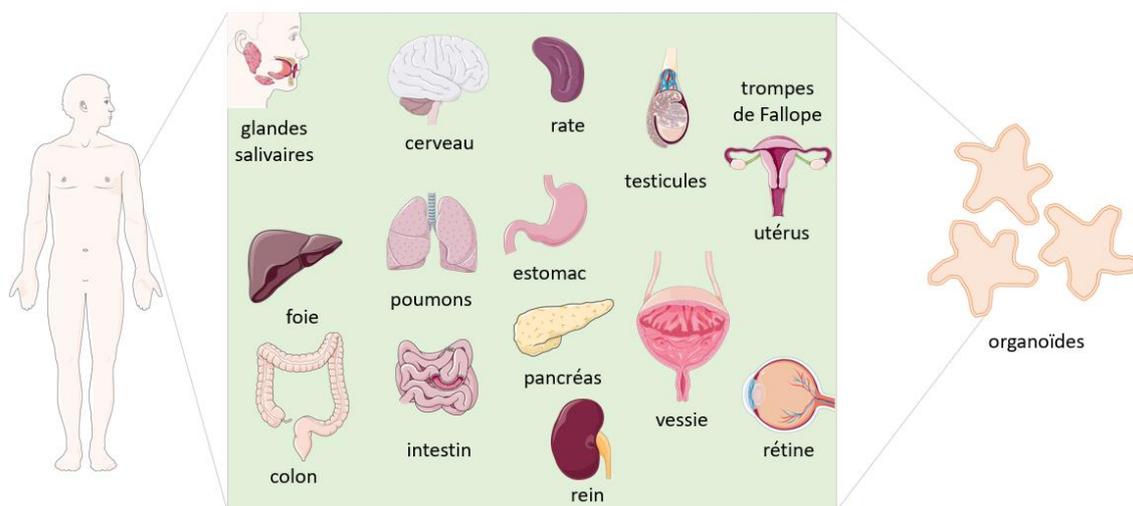


Figure 8. Organes modélisés par les systèmes organoïdes.

2.1 Cellules utilisées pour la production d'organoïdes

Les organoïdes sont généralement obtenus à partir de SC. Décrites pour la première fois dans les années 1960 par Till *et al.* [98], les SC sont des cellules capables de se renouveler pour reconstituer un pool de cellules disponibles et de se différencier en de nombreuses lignées cellulaires. Il en existe différents sous-types.

2.2.1 Cellules souches adultes

Les cellules souches adultes (AdSC), ou cellules souches tissulaires, sont retrouvées, comme leur nom l'indique, au niveau des tissus de sujets adultes et sont généralement prélevées lors de biopsies [38]. Elles peuvent se différencier en cellules ou former des organes de même lignée génétique que leur tissu d'origine. Leur durée de vie *in vitro* est limitée et leur culture nécessite donc un apport régulier d'échantillons frais. Les SC intestinales LGR5+ mises en évidence par Sato *et al.* entrent dans cette catégorie [71].

2.2.2 Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes (PSC) peuvent se différencier en de nombreuses lignées cellulaires et générer un organisme entier. Elles sont particulièrement utiles pour former des organoïdes de structures peu accessibles comme la rétine ou le cerveau.

2.2.3 Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) sont isolées pour la première fois en 1998 par James Thomson *et al.* [99]. Ce sont des PSC dérivées d'un blastocyste, qui représente le stade embryonnaire obtenu après 5-6 jours de développement (*in vivo* ou *in vitro*) [100]. Les hESC permettent d'étudier les processus d'embryogenèse et d'organogénèse.

Cependant, du fait de leur origine, leur utilisation soulève des questions éthiques majeures. En 1994, les premières lois de bioéthique interdisent toute recherche sur les cellules embryonnaires humaines en France. A compter de

2004, ces expériences sont autorisées uniquement sur dérogation et ce n'est qu'à partir de la loi de bioéthique de 2013 qu'elles sont finalement autorisées [101]. La dernière loi de bioéthique n°2021-1017 datant du 2 août 2021 stipule que la recherche sur l'embryon humain ne peut être entreprise sans autorisation préalable par les institutions compétentes. L'Agence de biomédecine valide les protocoles de recherche sur la base d'arguments justifiant la pertinence et l'intérêt scientifique de ces recherches. Elles se déroulent uniquement au sein d'établissements agréés [102].

2.2.4 Cellules somatiques et cellules souches pluripotentes induites

Les cellules somatiques sont des cellules tissulaires prélevées sur des organes [103]. Elles ont perdu leur capacité à se différencier et à s'auto-renouveler. Il est cependant possible de les "reprogrammer" pour qu'elles acquièrent à nouveau des propriétés de SC. Elles sont alors appelées cellules souches pluripotentes induites (iPSC) [104]. Leur découverte a valu un prix Nobel en 2012 au chercheur japonais Shinya Yamanaka [105].

Via exposition à des protéines ou facteurs de croissance, il est possible d'orienter le devenir des iPSC. Elles sont utilisées comme sources des trois couches germinales (endoderme, mésoderme et ectoderme) couramment appelés feuillets embryonnaires [97]. Leur génération et différenciation en tissus spécifiques requièrent cependant plusieurs semaines de culture ce qui augmente significativement le risque de contamination ou de différenciation non souhaitée [106]. L'utilisation de ces cellules permet de contourner les problèmes liés aux hESC.

2.2. Protocoles d'obtention des modèles organoïdes

L'obtention d'organoïdes est un processus découpé en plusieurs étapes (Figure 9). Dans un premier temps, les cellules sont prélevées d'un individu. Les tissus sont dissociés si nécessaire à l'aide d'enzymes, pour obtenir des suspensions unicellulaires. Il faut ensuite établir leur identité cellulaire adaptée à l'organe modélisé. Ceci passe par l'activation ou la déplétion de voies de signalisation essentielles pour le développement à l'aide de morphogènes ou de inhibiteurs de signalisation. Les cellules somatiques sont éventuellement reprogrammées en iPSC. Puis, placées dans un milieu de culture adapté, les cellules sont orientées vers leur différenciation terminale. Enfin, se déroule l'étape d'expansion en 3D des cultures de cellules. Pour se faire, les cellules peuvent être intégrées à une matrice 3D préexistante ou être agrégées en structures en 3D [57].

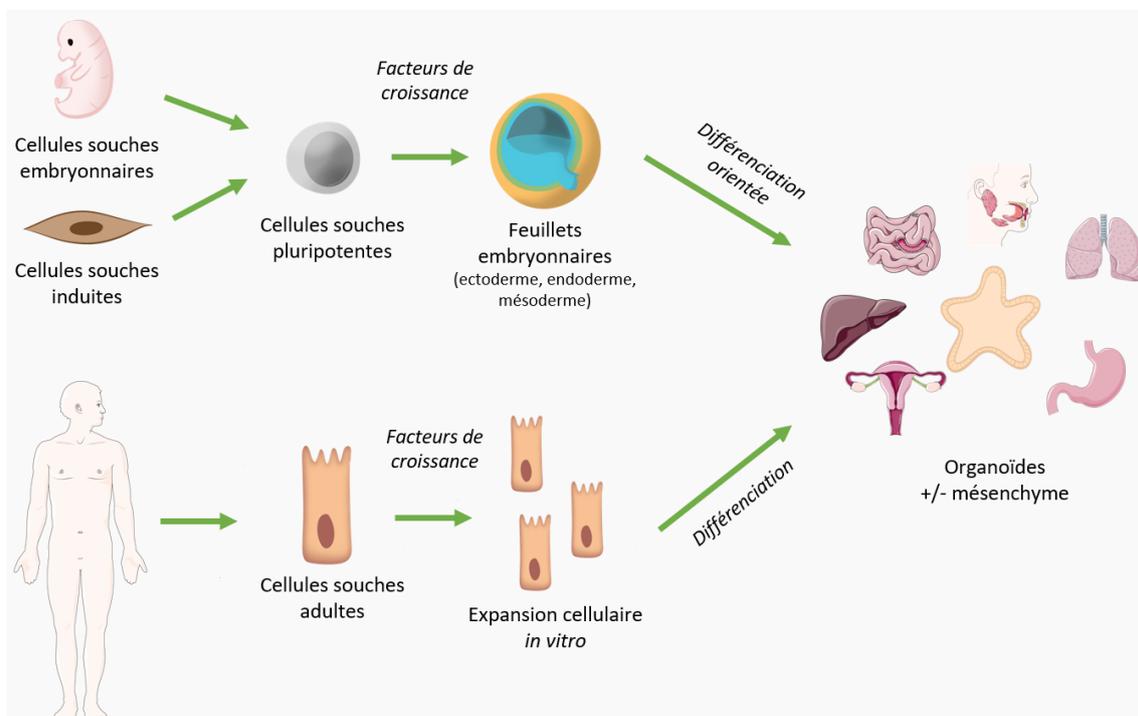


Figure 9. Établissement d'organoïdes dérivés de cellules souches pluripotentes ou de cellules souches tissulaires.
Schéma adapté de [107]

Les facteurs de croissance, de différenciation, ou tout autre réactif présent dans le milieu de culture, agissent sur les cellules et orientent le devenir. En fonction du type d'organoïde souhaité, la composition du milieu et les conditions de culture vont varier. Les principaux composés utilisés pour la formation des organoïdes sont regroupés dans un tableau (Tableau 2). Par ailleurs, les cultures organoïdes, en particulier les cellules d'origine humaine, nécessitent la présence d'antibiotiques et de fongicides pour prévenir les contaminations par des micro-organismes [108].

La matrice extracellulaire impacte également la différenciation des SC. La matrice (ou hydrogel) la plus couramment utilisée pour mettre au point des organoïdes est appelée Matrigel. Cette membrane basale riche en laminine est extraite du sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm. Elle se compose de plus de 2000 protéines différentes. Du fait de son origine animale et de son manque de caractérisation précise, il n'est pas encore possible de l'utiliser pour des applications cliniques chez l'humain. Des recherches sont menées pour développer de nouveaux hydrogels, à base de matériaux naturels (acide hyaluronique, fibrine, collagène) ou synthétiques [38]. La mise au point d'une matrice universelle adaptée à l'ensemble des modèles organoïdes et présentant des caractéristiques compatibles à des transferts chez l'être humain, permettra sans nul doute des avancées considérables en recherche biomédicale.

Les systèmes organoïdes issus d'AdSC sont le plus souvent obtenus par la méthode R-spondin. Ce protocole nécessite l'activation de la voie de signalisation Wnt (R-spondin 1 et Wnt3a), la présence d'une matrice extracellulaire, de facteurs de croissance spécifiques pour la prolifération épithéliale des cellules de l'organe modélisé, et enfin de facteurs permettant l'autorenouvellement des SC, comme le facteur de croissance transformant β

(TGF- β) et l'inhibiteur de la protéine morphogénétique osseuse (BMP). Cette méthode permet l'obtention d'organoïdes intestinaux [57,97].

La méthode SFEBq consiste à cultiver des agrégats ressemblant à des corps embryonnaires dans un milieu sans sérum et sans facteurs de croissance. Elle requiert la dissociation préalable des PSC ou iPSC en une suspension unicellulaire. L'objectif est de limiter tout signal inductif endogène. Cette dissociation est ensuite suivie d'une agrégation rapide des cellules. Elle conduit à la formation d'organoïdes dérivés d'épithélium neural [97].

Pour développer des organoïdes cérébraux, appelés aussi cérébroïdes, les cellules sont orientées de telle façon à former des corps embryoides avant de se différencier vers la lignée neuroectodermique. Les agrégats cellulaires contenant les précurseurs du développement du tissu cérébral sont ensuite placés dans un bioréacteur rotatif pour le reste du développement [57]. Ces derniers modélisent les forces de frottements et de cisaillements au sein des liquides biologiques. Ils augmentent la probabilité de contact entre les cellules et favorise l'obtention de structures 3D. En combinaison avec des facteurs de différenciation et de maturation appropriés, Qian *et al.* obtiennent ainsi différents types de cérébroïdes [73].

Le tissu d'origine des organoïdes dérivés des iPSC n'est généralement pas inflammatoire (ex: fibroblastes de la peau). Les cellules sont reprogrammées et cultivées pendant plusieurs semaines ou mois en l'absence de milieu inflammatoire. Les systèmes dérivés des iPSC ne sont donc pas à privilégier pour l'étude de pathologies inflammatoires complexes et multifactorielles. À contrario, ils s'avèrent être d'excellents outils pour étudier les troubles inflammatoires d'origine génétique exclusivement, tels que les MICI monogéniques [106].

| Réactifs | Mécanisme d'action | Applications dans les cultures organoïdes |
|---|---|---|
| Activine A | Active de la voie TGF- β [109] | Facteur de croissance Différenciation des PSC en endoderme définitif [110-111] |
| B27 (Supplément) | Mélange d'enzymes antioxydantes, protéines, vitamines et acides gras [112] | Favorise la différenciation et la survie neuronale en culture [113] Maintient et facilite la formation de sphères tumorales <i>in vitro</i> [108, 114] |
| BDNF (<i>brain derived neurotrophic factor</i>) | Liaison au récepteur TrkB [115] | Facteur de croissance Augmente la survie cellulaire dans les organoïdes de côlon [116]. Augmente la maturation des neurones dans les organoïdes du cerveau antérieur [117] |
| BMP (<i>bone morphogenetic protein</i>) | Activation de la voie BMP | Limite l'hyperprolifération de l'épithélium intestinal et l'autorenouvellement des SC Lgr5+ [118-119] |
| CHIR99021 | Stimule la voie WNT canonique [120] | Stimule la prolifération des SC [120] |
| DMEM*/F12 (* <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>) | - | Milieu de culture sans sérum utilisé pour la culture d'organoïdes [116] |
| EGF (facteur de croissance épidermal) | Activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK [121] | Stimule la migration, la prolifération des SC et inhibe l'apoptose [121] |
| FGF** agonistes (** <i>Fibroblast growth factor</i>) | Activation de la voie de signalisation FGF [122] | Favorisent la survie, la prolifération des SC, la morphogénèse épithéliale et le maintien des organoïdes <i>in vitro</i> à long terme [123] |
| Gastrine | Agoniste sélectif du récepteur <i>cholecystokinin-2-receptor</i> (CCK2R) [124] | Effet mitogène sur les cellules gastriques [124] |
| GDNF (<i>facteur neutrophe dérivé de la glie</i>) | Liaison au récepteur de la famille GDNF- α 1 (GFR α 1) et activation du récepteur tyrosine kinase RET [125] | Facteur de croissance Augmente la maturation des neurones dans les organoïdes du cerveau antérieur [117] |
| IL-22 | Signalisation du transducteur de signal et de l'activateur de la transcription 3 (STAT3) [14] | Induction de la prolifération des SC et de la croissance des organoïdes [14] |
| Insuline | - | Maintenance de SC neurales [113] |
| Jagged-1 | Stimulation de la voie Notch [126] | Préserve l'état indifférencié des SC, favorise la prolifération, bloque la différenciation sécrétoire, maintenant ainsi les cryptes prolifératives [121] |
| LDN-193189 | Inhibiteur de la voie BMP [127] | Facilite la différenciation des PSC en progéniteurs neuraux [127] |
| N2 (Supplément) | - | Favorise la croissance des cellules post-mitotiques [108] |
| N-Acétylcystéine | Piège les espèces réactives de l'oxygène et active ERK1/2. Précurseur du glutathion [108] | Augmente la survie cellulaire en diminuant le stress auquel sont exposées les cellules primaires en culture [108] |
| Nicotinamide (vitamine PP ou B3) | inhibiteur ROCK [128] | Augmente la survie et favorise la différenciation des ESC et des iPSC [128] |

| Réactifs | Mécanisme d'action | Applications dans les cultures organoïdes |
|----------------------------------|--|--|
| Noggin | Inhibiteur de la voie BMP [118] | Facteur de croissance Inhibe la différenciation induite par la voie BMP [129] Stimule la formation de cryptes intestinales [118] |
| p38 | Activation en réponse à un stress cellulaire | Module la prolifération, la différenciation des cellules et le mécanisme d'apoptose [108] |
| Pénicilline/ Streptomycine | Action combinée contre les bactéries à Gram positif et négatif [130] | Antibiotiques utilisés pour éviter les contaminations bactériennes dans les cultures <i>in vitro</i> [130] |
| PGE2 (prostaglandine E2) | Activation des composants de la voie WNT canonique [131] | Augmente la survie et la prolifération des SC [121] Favorise la différenciation des hESC et iPSC [132] |
| Purmorphamine | Active la voie Hedgehog par liaison au récepteur Hedgehog Smoothened [133] | Favorise la différenciation des progéniteurs et des motoneurons de la colonne vertébrale ventrale issus de PSC humaines [134] |
| R-spondin 1 | Augmente la voie WNT/ β -caténine [135-136] | Facteur de croissance Préserve l'état indifférencié des SC stimule la prolifération des cellules cryptiques [121, 135] |
| SB431542 | Inhibiteur de TGF- β [137] | Reprogrammation de cellules somatiques en iPSC [116, 138] |
| SHH (<i>sonic hedgehog</i>) | - | Orienté la différenciation neurale des PSC [139] |
| TGF- β | Superfamille des TGF- β [137] | Régule l'auto-renouvellement et la différenciation des lignées mésenchymateuses. |
| Wnt3a | Active la voie WNT canonique [140] | Facteur de croissance Préserve l'état indifférencié des SC et stimule la prolifération des cellules cryptiques [121, 140] |
| Y-27632 (Dihydrochloride) | inhibiteur de la voie ROCK (<i>Rho-associated protein kinase</i>) [141] | Augmente la survie des SC en limitant l'anoikis. [141] |

Tableau 2. Principaux réactifs, facteurs de croissance, facteurs de différenciation utilisés dans les cultures organoïdes

3. Applications des modèles organoïdes

Les organoïdes possèdent de nombreuses applications en pharmacie et biomédecine (Figure 10). Ils appréhendent les mécanismes physiologiques ou physiopathologiques de maladies humaines telles que les cancers [77,142-148], maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [80-81], maladies infectieuses [149-151], neurodégénératives [18] ou encore des anomalies du développement [72], de façon plus pertinente que ne le permettent les

traditionnelles cultures en 2D. En effet, on retrouve plusieurs types cellulaires au sein d'un même organoïde, contrairement aux cultures *in vitro* classiques qui n'utilisent le plus souvent qu'une seule lignée cellulaire.

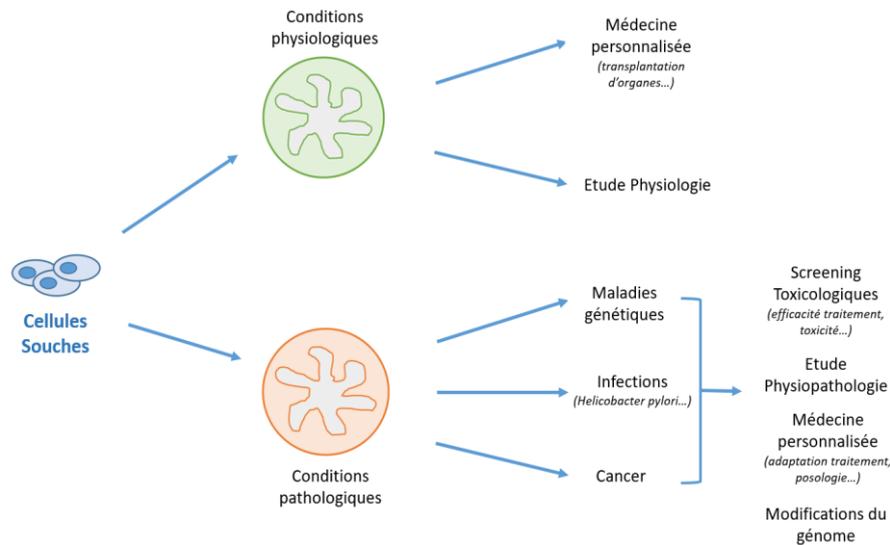


Figure 10. Applications des organoïdes obtenus à partir de cellules souches

Des études sur l'impact du microbiome intestinal dans le développement de MICI reposent sur des co-cultures d'organoïdes intestinaux et de pathogènes [148]. L'intégration des micro-organismes peut se faire directement par microinjection de pathogènes dans la lumière des organoïdes [87,96,152] ou après fragmentation mécanique et réaggrégation des cellules en une structure 3D [107]. Leurs résultats suggèrent que la survie et la prolifération de ces micro-organismes sont modélisables *in vitro* au sein des systèmes organoïdes.

Du fait de sa localisation, le cerveau est un organe difficilement accessible. Le développement et l'évolution des pathologies neuropathiques restent souvent mal définis. Il n'existe pas de traitement curatif pour de nombreuses maladies neurodégénératives telles la SEP, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Les études du développement cérébral et de neuropathologies passent généralement par

l'utilisation de modèles expérimentaux. Les plus courants sont les modèles animaux que nous avons déjà évoqués, l'étude de coupes de cerveaux humains en post-mortem ou les études sur le génome humain [153]. L'utilisation d'organoïdes cérébraux, appelés également cérébroïdes, offre de nouvelles perspectives d'étude de la physiologie et physiopathologie humaine au sein du SNC. Afin de comprendre l'impact d'une infection avec le virus Zika sur l'apparition de microcéphalies, Jason Dang *et al* ont infecté des organoïdes cérébraux dérivés de hESC avec la souche africaine du virus MR766 [154-155]. L'infection a induit une suractivation du récepteur TLR3 qui a entraîné à son tour une dérégulation de gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire. Leurs résultats ont montré des anomalies développementales et une atrophie générale des organoïdes cérébraux consécutive à une augmentation du mécanisme d'apoptose et une atténuation du processus de neurogenèse [156].

Les organoïdes facilitent les recherches sur le génome et maladies génétiques. L'utilisation de cellules génétiquement modifiées grâce à la technologie CRISPR-Cas9 compatible avec les systèmes organoïdes offre de nouvelles perspectives [142]. Ils rendent possible les recherches sur l'impact de la suppression de l'expression de gènes essentiels lors du développement embryonnaire. Ces inhibitions conduisent habituellement à une létalité embryonnaire systématique et ne peuvent donc pas être réalisées en *in vivo* [38]. Des études antérieures ont montré l'utilité des modèles d'organoïdes cérébraux formés à partir d'iPSC dérivées de patients pour modéliser des microcéphalies consécutives à une mutation non-sens hétérogène dans CDK5RAP2 [72,155]. Dans les pathologies monogéniques, les organoïdes pourraient constituer une réserve de cellules disponibles pour des transplantations autologues greffées après modifications génétiques [38].

Du fait en partie de leur relative facilité d'accès et de manipulation technique et génétique, ils favorisent la formation de biobanques pour la recherche biomédicale [157]. Ils sont de bons candidats afin de répondre au manque d'organes disponibles pour des transplantations.

Les systèmes organoïdes ouvrent la voie aux criblages précliniques ou toxicologiques exhaustifs de candidats médicaments et de produits chimiques, avec des résultats plus fiables et biologiquement pertinents que les modèles 2D [156]. Leur utilisation a d'ailleurs déjà permis de tester plusieurs substances antitumorales efficaces.

Ils sont également employés dans le cadre de la médecine personnalisée. Les organoïdes dérivés de cellules de patients (PDO) gardent le profil transcriptionnel et mutationnel de la tumeur d'origine pour un individu donné. Ils étudient la réponse spécifique et le risque de résistance de la tumeur face à un panel de traitements [158]. Il est ainsi possible d'adapter la stratégie thérapeutique (substance utilisée, posologie...) afin d'aboutir à une meilleure prise en charge des patients porteurs de maladies génétiques ou de cancers. Les résultats de recherches, menées sur des PDO de patients atteints de cancer, suggèrent que les organoïdes sont de bons modèles prédictifs de l'efficacité d'un traitement (chimiothérapie, irradiation) en *in vivo* [159].

PARTIE 4 : Intégration du système immunitaire dans les organoïdes

Les systèmes organoïdes permettent de s'affranchir de nombreuses contraintes liées à l'utilisation des modèles 2D et *in vivo*. Néanmoins, au même titre que les modèles 2D, ils ne constituent pas des organismes entiers. Les organoïdes classiques ne possèdent pas de système immunitaire. La recherche avançant, de nouvelles stratégies permettent désormais de constituer des organoïdes immunocompétents.

1. Co-cultures d'organoïdes et de cellules immunitaires

Une des stratégies d'intégration du système immunitaire consiste à placer en co-culture des organoïdes avec des cellules immunitaires (LB, NK, LT cytotoxiques, LT auxiliaires, etc.) (Figure 11). Il est également possible d'intégrer des molécules médiatrices de la réponse immunitaire comme des cytokines ou les molécules du complément [14]. Cette méthode peut être appliquée à de nombreux organoïdes. Elle est par exemple envisagée pour étudier les pathologies inflammatoires du rein [76].

Il est possible « d'activer » les cellules en co-culture, en ajoutant dans le milieu des molécules immunogènes, comme des lipopolysaccharides (LPS), ligands du TLR4. Cette liaison va induire une inflammation tissulaire. Les co-cultures récapitulent ainsi mieux l'environnement inflammatoire persistant observé dans les maladies inflammatoires, comme les MICI.

Du fait d'une induction de la différenciation et en présence de cytokines pro-inflammatoires, le nombre de cellules souches intestinales (CSI) diminue dans les co-cultures d'organoïdes et de LT helper 2 pré-activés. Inversement, en présence d'IL-10, qui a pour fonction de diminuer la réaction inflammatoire, le

nombre de CSI a tendance à augmenter. D'autres interleukines (ex: IL-13, IL-33, IL-4) semblent également influencer la différenciation des cellules de gobelet et de la tuft dans les organoïdes intestinaux murins [14].

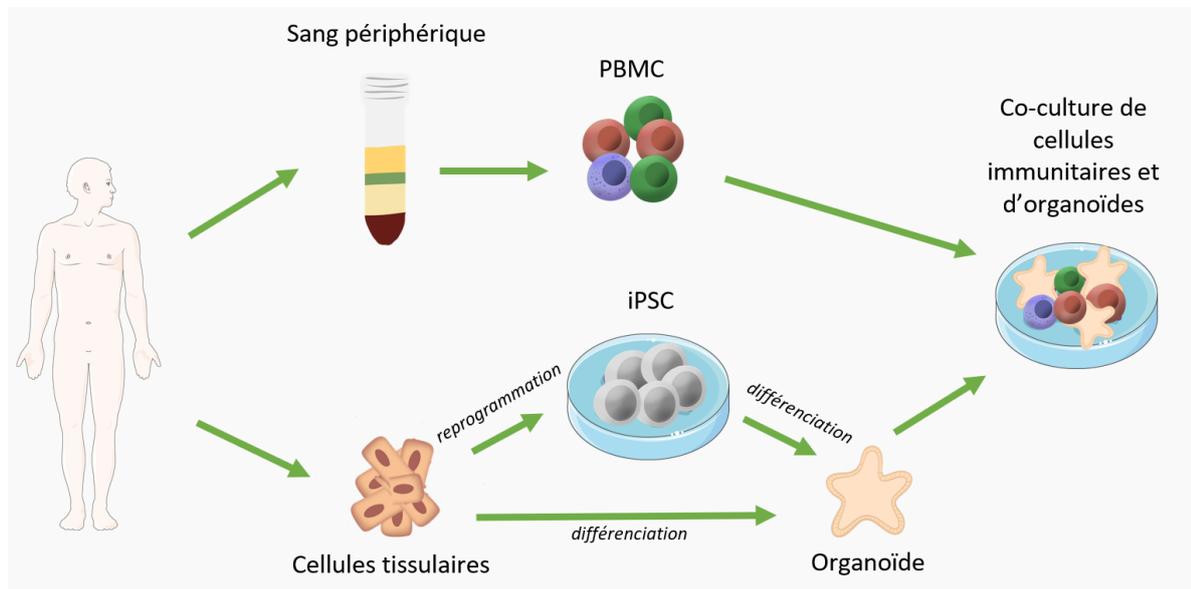


Figure 11. Système de co-cultures autologues

C3a est une molécule de la cascade du complément jouant un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire. Elle intervient dans le développement de l'inflammation et dans les processus de réparation des lésions dans les organes. Des organoïdes intestinaux murins ont démontré que par le biais d'une interaction avec C3aR1, l'ajout de C3a dans le milieu de culture permet d'améliorer l'expansion des SC ainsi que la formation d'organoïdes. Ces résultats suggèrent que le complément intervient dans la régénération intestinale [160]. D'autres expériences sur les modèles organoïdes mettent en exergue l'action des cytokines et de la cascade du complément sur le développement des cellules épithéliales. Ces recherches soulignent ainsi l'intérêt d'intégrer ces composantes dans les cultures *in vitro* afin de pouvoir mieux récapituler les mécanismes se déroulant *in vivo*.

1.1. Co-cultures de cellules immunitaires et de micro-organismes

Des études se sont déjà intéressées aux interactions entre les épithéliums et les micro-organismes pathogènes dans le cadre d'infections virales (ex : virus Zika), bactériennes (ex: *Helicobacter pylori*) [150] ou parasitaires (ex : *Cryptosporidium*) [87]. Mais les modèles étaient dépourvus de système immunitaire, acteur pourtant central dans la gestion des pathogènes. Les résultats obtenus ne sont donc pas directement transposables à l'humain. L'utilisation des co-cultures rend désormais possible l'étude de l'interaction tripartite entre les micro-organismes pathogènes, ou faisant partie du microbiome, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires [96,161].

1.2. Co-cultures de cellules immunitaires et cancéreuses

Les co-cultures de cellules immunitaires et de cellules cancéreuses reflètent plus fidèlement le microenvironnement tumoral [145-146,162-163]. Il existe deux approches principales pour constituer ces PDO.

L'approche holistique comprend l'ensemble de l'environnement tumoral soit les cellules immunitaires, les cellules cancéreuses, les cellules stromales (ex : fibroblastes), etc. Elle permet de mieux refléter les mécanismes se déroulant *in vivo*. La présence des cellules stromales augmente par ailleurs la durée de vie en culture des cellules immunitaires [163].

L'approche réductionniste, quant à elle, isole dans un premier temps les cellules immunitaires d'un patient (ex : PBMC à partir du sang) avant de les placer avec des organoïdes tumoraux préalablement formés. Elle étudie les interactions spécifiques entre les cellules [14]. Elle permet des études plus

longues que l'approche holistique. En 2018, Dijkstra *et al.* ont établi une co-culture d'organoïdes tumoraux autologues avec des LT issus de PBMC afin d'induire et d'analyser la réponse des LT spécifiques de la tumeur [146]. Leurs résultats suggèrent que ce modèle permet d'enrichir les cultures avec des cellules T réactifs à la tumeur à partir du sang périphérique de patients atteints d'un cancer colorectal ou d'un cancer du poumon non à petites cellules. De plus, ces LT avaient la capacité d'éliminer les cellules tumorales au sein des organoïdes. Cette approche permet d'évaluer la réaction des cellules T face aux cellules cancéreuses pour un patient donné et montrent que les cellules immunitaires en co-cultures conservent leurs fonctions.

L'association entre un PDO et des cellules immunitaires autologues permet de mieux prédire le développement futur *in vivo* d'une tumeur chez un patient donné. L'incorporation de cellules lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), associée à la présence de cellules tumorales, reproduit les mécanismes de suppression immunitaire induite par les tumeurs par contact direct [163]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) améliorent la différenciation des modèles organoïdes intestinaux. En effet, les organoïdes conservent un profil immature davantage représentatif des tissus fœtaux. L'intégration de cellules immunitaires grâce aux co-cultures procure une niche de croissance plus réaliste et aboutit à la formation d'organoïdes plus matures. STAT3-activating interleukin-2 (IL-2), sécrétée par les cellules immunitaires, a d'ailleurs démontré un rôle clé dans la maturation d'organoïdes intestinaux dérivés de PSC humaines [164].

1.3. Co-cultures de cérébroïdes et de microglie

Le cerveau humain présente un haut degré de complexité, car il contient

différentes populations neurales, des astrocytes, des oligodendrocytes, de la microglie et la population de cellules de la barrière hémato-encéphalique [18]. La mise au point de cérébroïdes possédant l'ensemble de ces structures n'est pas chose aisée.

De nouveaux modèles de cérébroïdes arrivent à inclure la microglie reconnue comme étant un acteur majeur dans les pathologies du SNC. Ces systèmes ont déjà permis d'améliorer la compréhension de leurs mécanismes physiopathologiques et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, un modèle cérébroïde a pu identifier les cellules impliquées dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer liée à l'apolipoprotéine E4 (APOE4). Les résultats montrent une surexpression de gènes associés aux réponses immunitaires qui pourraient entraîner une perturbation des fonctions phagocytaires de la microglie associée à une augmentation de l'inflammation cérébrale. Ces mécanismes pourraient expliquer au moins partiellement l'accumulation accrue de bêta-amyloïde ($A\beta$) observée dans la maladie d'Alzheimer [165].

Les travaux d'Abud *et al.* ont permis d'obtenir des microglies induites (iMGL) à partir d'iPSC grâce à un protocole expérimental durant environ 40 jours. L'analyse transcriptomique de ces cellules a montré qu'elles étaient similaires à la microglie humaine et fœtale une fois en culture. Elles étaient capables de sécréter des cytokines, de migrer vers des zones de lésions et de phagocyter certains substrats. Ils ont ensuite placé 5×10^5 iMGL en co-culture avec des organoïdes cérébraux. Leurs résultats leur permettent de conclure que ces iMGL peuvent aider à la compréhension des maladies neurologiques humaines [166].

2. Organoïdes Lymphoïdes

Une autre stratégie, plus difficile à mettre en place, consiste à reconstituer des organoïdes lymphoïdes (rate, thymus, ganglion lymphatique, MO...) comme source directe de cellules immunitaires.

Des organoïdes lymphoïdes ont déjà montré leur capacité fonctionnelle. Des cellules T matures fonctionnelles ont ainsi pu être générées à partir de CSH et de cellules progénitrices au sein d'organoïdes thymiques. Ces cellules CD34+CD3-, CD34 étant un marqueur de CS et CD3 de LT, mises en coculture avec des cellules stromales de la lignée cellulaire MS5-hDLL1 se sont différenciées dans un premier temps en cellules CD34-CD3+ puis en cellules CD8+ à 90%. Les cellules étaient capables de reconnaître et d'éliminer spécifiquement des cellules de carcinome murin après exposition à un Ag de la tumeur [167]. Ceci démontre la faisabilité et l'intérêt de cette approche. Cependant, au-delà de 56 jours, les cultures *in vitro* actuelles d'organoïdes thymiques perdent certaines de leurs fonctions [14]. Une optimisation des protocoles pour le maintien à long terme sera nécessaire pour étudier les pathologies chroniques.

En 2019, Lenti *et al.* publient les résultats de leurs travaux centrés sur la mise au point d'organoïdes de ganglions lymphatiques fonctionnels transplantés *in vivo* [168]. Brièvement, les ganglions lymphatiques sont des tissus lymphoïdes secondaires qui jouent un rôle essentiel dans la filtration de la lymphe et dans la promotion des réponses immunitaires adaptatives. Ils sont découpés en 3 zones : le paracortex, le cortex et la médulla. Ils sont traversés par des canaux et fissures qui drainent le liquide lymphatique et favorisent le contact entre les CPA et les lymphocytes. Les cellules stromales y jouent un rôle essentiel de contrôle et de structuration. La médulla au centre regroupe des macrophages, des

plasmocytes et des LB transitoires. Les cellules B sont principalement retrouvées au niveau du cortex. Attirés par les CPA, ils migrent au travers du paracortex dominé par les LT. Ces derniers, une fois activés par un Ag, rejoignent la zone corticale pour interagir et recruter les LB. Au sein d'un centre germinatif (GC), les LB vont se différencier en centrocytes puis en plasmoblastes ou plasmocytes sécréteurs d'Ac. Les GC sont essentiels à la réponse immunitaire. Ils peuvent apparaître ailleurs que dans les ganglions lymphatiques dans certaines pathologies auto-immunes (ex: SEP, polyarthrite rhumatoïde). Ils sont alors appelés organes lymphoïdes tertiaires [13]. Les auteurs ont réussi à développer des organoïdes lymphoïdes à partir de progéniteurs stromales lymphoïdes et d'une matrice extracellulaire décellularisée. Ils ont ensuite transplanté ces structures chez des souris, dans des régions dépourvues de ganglions lymphatiques après résection chirurgicale. Les organoïdes transplantés ont réussi à s'intégrer à la circulation lymphatique endogène. Près de 70% des structures présentaient une infiltration importante de cellules T et B. Après immunisation, les ganglions lymphatiques synthétiques étaient capables de soutenir une réponse immunitaire antigène-spécifique [168].

Ces recherches font office de preuve de concept et démontrent la faisabilité et l'intérêt de mettre au point ces systèmes. Les organoïdes lymphoïdes pourraient être transplantés chez l'humain afin de remplacer ou réparer des organes lymphoïdes endommagés (ex : lymphadénectomie, lymphodéplétion) [169].

3. Organoïdes et technologie microfluidique

Dans un deuxième temps, il serait possible de "connecter" ces organoïdes lymphoïdes à d'autres types d'organoïdes (tumoroïdes, organoïdes de foie, rein,

poumon etc.) grâce à des réseaux de vascularisation en se servant de la technologie des organes sur puce, ou *organ-on-a-chip* en anglais.

Brièvement, les modèles d'organes sur puce ont posé les bases de l'ingénierie des systèmes de communication inter-organes appliqués aux modèles organoïdes [170]. Ils prennent en compte les propriétés biochimiques et biophysiques du microenvironnement *in vivo* et intègrent des cellules spécialisées. En 2016, Paula G. Miller et Michael L. Shuler mettent au point un complexe constitué de 13 organes formé à partir de 5 lignées cellulaires, un corps-sur-une-puce ou *body-on-a-chip*. Leurs travaux démontrent la faisabilité d'une telle construction, de l'exploitation et de l'entretien d'un système microphysiologique simple capable de mesurer les fonctions cellulaires [171]. Les *organ-on-a-chip* ont l'avantage d'avoir une durée de vie plus longue que les organoïdes mais restent difficiles à mettre en place de par leur complexité de configuration. Leur manque de complexité, du point de vue de leur architecture cellulaire, associé à l'utilisation de lignées cellulaires définies remet cependant en question leur pertinence physiologique.

Ainsi, Natarajan *et al.* ont utilisé la technologie de microfluidique afin de mimer les interactions entre un organe solide et les LT circulants durant les infections au virus de l'hépatite C dans des organoïdes hépatiques [172].

La pandémie du virus SARS-Cov-2 a permis d'éprouver les technologies organoïdes. Elles ont servi à étudier les mécanismes de pathogénicité du virus et les conséquences de l'infection sur l'organisme. Elles ont par ailleurs aidé à identifier le tropisme du virus au niveau neurologique, vasculaire, pulmonaire, reproductif ou digestif. Les organoïdes immunocompétents se sont révélés des supports de choix pour tester rapidement l'efficacité de nouveaux médicaments [173-174]. Ils pourraient s'avérer des outils indispensables pour la recherche de

futurs vaccins et traitements lors de prochaines épidémies.

PARTIE 5 : Challenges des modèles organoïdes

L'intégration du système immunitaire permet de prendre en compte les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires, que ce soit en conditions physiologiques ou dans le cadre de pathologies comme les cancers ou les maladies auto-immunes. Nonobstant, aucun modèle expérimental n'étant parfait, les organoïdes présentent plusieurs limites que nous évoquons dans cette dernière partie. Elles sont d'ordre technique et éthique.

1. Limitations techniques

L'autoassemblage des cellules, qui caractérise les systèmes organoïdes, conduit à une grande hétérogénéité des modèles obtenus. Cette variabilité dépend également de la phase de pré-traitement qui interfère avec les signatures immunitaires des échantillons.

Maintenir des cultures d'organoïdes à long terme est un défi de taille. Plus l'architecture en 3D est complexe, plus les cellules localisées au centre peinent à recevoir un apport suffisant en nutriments du fait d'une moins bonne irrigation. Couplé à une évacuation limitée des déchets présents dans les milieux de culture, ces difficultés accroissent le risque de nécrose cellulaire et diminuent la durée de vie des cultures organoïdes [57]. En cas d'utilisation de tissus inflammatoires issus de patients, le nombre d'organoïdes viables obtenus est faible, du fait d'une plus grande mortalité cellulaire et de besoins spécifiques en termes de nutriments ou de conditions de culture.

Les organoïdes dérivés de biopsie peinent à récapituler toute la diversité cellulaire et la complexité du tissu parental. En effet, les cellules prélevées ne représentent qu'un échantillon de la région tissulaire ou de l'organe [14]. Cela

conduit de plus à une hétérogénéité majeure des structures obtenues. Une solution évoquée par plusieurs auteurs serait de prélever des cellules de différentes zones pour arriver à mieux refléter l'environnement du tissu étudié [106].

La manipulation des modèles organoïdes nécessite un personnel compétent et formé aux procédures, capable de définir les conditions nécessaires à la culture de nouveaux tissus (contenants, surface, composition du milieu de culture...). Les protocoles expérimentaux sont complexes et font intervenir de nombreuses étapes de développement dépendantes du type cellulaire utilisé. La standardisation des procédures aboutira très certainement à un bond dans l'utilisation de ces technologies innovantes. Leur utilisation pour le criblage toxicologique à haut débit dépend de la reproductibilité des organoïdes obtenus pour assurer une comparabilité des résultats d'une expérience à l'autre.

Il est pour l'heure difficile de récapituler toute la diversité cellulaire au sein des modèles organoïdes, certaines sous-populations immunitaires n'ayant a priori pas encore été identifiées à ce jour. D'une manière plus générale, les caractéristiques et propriétés des cellules immunitaires, leurs interactions avec les cellules de l'organisme et avec leur environnement ne sont pas clairement définies. Les organoïdes seront sans nul doute des outils intéressants pour en apprendre davantage sur ces mécanismes.

2. Réflexions éthiques et organoïdes

Au même titre que les autres modèles d'expérimentation, les organoïdes soulèvent des questionnements éthiques. Pour terminer cette thèse, nous allons évoquer ces différentes réflexions relatives à leur utilisation.

Les organoïdes sont en accord avec le principe des 3R puisqu'ils

contribuent à réduire, voire à remplacer, les animaux utilisés à des fins expérimentales. Ils offrent une alternative pertinente aux modèles animaux.

En revanche, le débat qui concerne l'utilisation de cellules et de tissus embryonnaires ou fœtaux pour former ces structures organoïdes est un sujet complexe. Il intègre les notions de multiculturalité et de différences religieuses au sein des sociétés. Nous prenons ici deux exemples. La religion, ou philosophie, bouddhiste tolère les recherches sur les embryons humains si elles sont réalisées pour le bien commun. En revanche, l'Église catholique reconnaît l'existence d'un être humain à part entière dès l'instant où un ovocyte est fécondé. En conséquence, elle proscrit formellement l'utilisation de cellules ou tissus dérivés d'embryons et de fœtus [175] y compris pour les technologies organoïdes. Cette difficulté peut être contournée par l'utilisation des iPSC ou d'AdSC.

Mais qu'en est-il du séquençage et de la diffusion du génome des cellules prélevées pour les recherches sur les organoïdes ? La diffusion depuis plus de 60 ans des cellules et du génome d'Henrietta Lacks dans le monde entier, sans l'accord préalable de la patiente ou de sa famille, est une erreur qui doit nous servir de leçon [36]. Les instances et établissements de recherche se doivent de garantir la sécurité des expérimentateurs, des sujets d'étude et des patients. La loi de bioéthique de 2021 n'autorise les dons de corps à des fins d'enseignement médical et de recherche qu'après le recueil du consentement écrit du donneur ou de ses proches le cas échéant. Il ne peut s'obtenir qu'après information de la nature de l'examen, et de son ou de ses objectifs. La diffusion éventuelle des cellules, et donc potentiellement du génome, dans d'autres centres ou instituts de recherche doit être notifiée au donneur, qui décide de donner ou non son accord. Ce consentement est révocable à tout moment [176].

Afin d'établir un climat de confiance avec le grand public, les équipes de

recherche se doivent d'assurer le respect de l'intégrité scientifique dans la communication de leurs résultats. Une meilleure transmission de l'information aux populations pourrait passer au travers d'un travail de vulgarisation des travaux menés.

Enfin, à partir de quand, à partir de quel degré de différenciation, de complexité, quelle taille, considérons-nous qu'un organoïde est un être humain ? En partant de l'hypothèse que les modalités de culture remplissent toutes les conditions requises (enrichissement milieu de culture adéquat, amélioration des techniques de mise au point des systèmes...) serait-il alors possible de recréer *in vitro* un cerveau capable de pensée, de mémoriser ou de ressentir des émotions ? C'est une question à laquelle plusieurs équipes de recherche se sont efforcées de répondre. Les auteurs concluent que, bien que non envisageable à ce jour, au regard des technologies et connaissances actuelles, la possibilité de créer un jour une forme de conscience est une éventualité à ne pas écarter et qu'il est important de réfléchir dès à présent au cadre réglementaire et éthique autour de ces technologies [177-178].

THÈSE SOUTENUE PAR : Mme Marion PRONO

TITRE :

**IMMUNITÉ ET MODÈLES EXPÉRIMENTAUX EN RECHERCHE
PHARMACEUTIQUE : INTÉGRATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE
DANS LES MODÈLES ORGANOÏDES**

CONCLUSION :

De nouvelles structures en trois dimensions, appelées organoïdes, arrivent à mieux récapituler *in vitro*, les processus biologiques observés *in vivo* que ne le permettent les modèles d'étude traditionnels. Ils reproduisent partiellement l'anatomie, la morphologie et les fonctions des organes qu'ils modélisent. Leurs applications diverses améliorent chaque jour un peu plus la compréhension des mécanismes physiologiques et de développement de pathologies comme les cancers, maladies inflammatoires de l'intestin ou neurodégénératives. Ces systèmes sont envisagés comme plateforme de criblages toxicologiques à grande échelle, et à terme comme source d'organes pour des transplantations.

Néanmoins, les organoïdes classiques ne possèdent pas de système immunitaire. Cette composante essentielle de l'organisme intervient pourtant dans de nombreux mécanismes physio- et physiopathologiques. C'est un système complexe dont les interactions avec les autres cellules ne sont pas toujours clairement identifiées.

Des recherches récentes ont réussi à développer des organoïdes immunocompétents au travers de deux stratégies : grâce à la mise en place de cocultures de cellules immunitaires et d'organoïdes, et par le développement d'organoïdes lymphoïdes, comme source directe de cellules immunitaires, connectés à d'autres modèles organoïdes.

Malgré un engouement certain pour ces systèmes à haut potentiel, l'impossibilité de maintenir des cultures à long terme, couplée à l'hétérogénéité des structures obtenues, altère la reproductibilité et la représentativité des résultats en particulier pour les études de long court. Leur utilisation reste limitée et soumise à des contraintes à la fois techniques et éthiques.

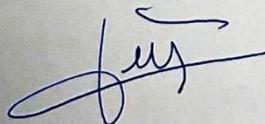
Les organoïdes demeurent malgré tout une technologie innovante pleine de promesses. Ils pourraient se révéler une alternative et un intermédiaire fiable entre les cultures en 2D et les expérimentations *in vivo* chez l'animal ou l'être humain, pour le développement de nouveaux traitements ou dans la lutte contre de futures épidémies.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 16/03/22

**LE DOYEN
DE L'UFR DE PHARMACIE**

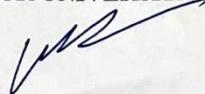
M. le Pr. Michel SÈVE



LE DIRECTEUR DE THESE

M. le Dr Walid Rachidi

LE TUTEUR UNIVERSITAIRE



BIBLIOGRAPHIE

- [1] Universalis E. IMMUNOLOGIE [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité le 18 mai 2021]. Disponible : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/immunologie/>
- [2] Gros F, Fournel S, Liégeois S *et al.* Atlas d'immunologie - De la détection à l'immunothérapie. Malakoff, France : Dunod; 2018.192 p.
- [3] Davis MM, Tato CM, Furman D. Systems immunology: just getting started. *Nat Immunol.* 20 juin 2017;18(7):725-32.
- [4] Organes lymphoïdes primaires et secondaires - Site des ressources d'ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre [Internet]. [cité 16 août 2022]. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/fiches-organes-et-tissus-lymphoïdes/les-organes-lymphoïdes>
- [5] Miller JFAP. The function of the thymus and its impact on modern medicine. *Science.* 31 juill 2020;369(6503):eaba2429.
- [6] Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016 Oct 31;60(3):275-301.
- [7] Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* juin 2016;148(2):125-39.
- [8] Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology.* mars 1995;5(3):85-7.
- [9] Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 2016 Mar 15;44(3):463-475. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.026. PMID: 26982354.
- [10] Owen J, Punt J, Stranford S. Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. 7e édition. Paris: Dunod; 2014. 832 p.
- [11] Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* juin 2020;20(6):375-88.
- [12] Xing Y, Hogquist KA. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* juin 2012;4(6):a006957.
- [13] Giese C, Marx U. Human immunity in vitro - solving immunogenicity and more. *Adv Drug Deliv Rev.* avr 2014;69-70:103-22.
- [14] Bar-Ephraim YE, Kretzschmar K, Clevers H. Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol.* mai 2020;20(5):279-93.
- [15] Tremblay MÈ, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy* [Internet]. 2015 [cité 10 août 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2015.00045>
- [16] Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* 4 févr 2020;30(5):1271-81.
- [17] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* nov 2007;10(11):1387-94.
- [18] Sabogal-Guáqueta AM, Marmolejo-Garza A, de Pádua VP, Eggen B, Boddeke E, Dolga AM. Microglia alterations in neurodegenerative diseases and their modeling with human induced pluripotent stem cell and other platforms. *Progress in Neurobiology.* juill 2020;190:101805.
- [19] Audinat É, Arnoux I. La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *Med Sci (Paris).* févr 2014;30(2):153-9.
- [20] Lecours C, Bordeleau M, Cantin L, Parent M, Paolo TD, Tremblay MÈ. Microglial Implication in Parkinson's Disease: Loss of Beneficial Physiological

- Roles or Gain of Inflammatory Functions? *Front Cell Neurosci.* 30 août 2018;12:282.
- [21] Blank T, Prinz M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia.* janv 2013;61(1):62-70.
- [22] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 30 juin 2020;8(1):103.
- [23] Microbiote intestinal (flore intestinale) · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 25 août 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinal-flore-intestinale/>
- [24] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, *et al.* Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell.* 1 déc 2016;167(6):1469-1480.e12.
- [25] Bodogai M, O'Connell J, Kim K, Kim Y, Moritoh K, Chen C, *et al.* Commensal bacteria contribute to insulin resistance in aging by activating innate B1a cells. *Sci Transl Med.* 14 nov 2018;10(467):eaat4271.
- [26] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* nov 2013;19(11):1423-37.
- [27] Cancer microenvironment - Latest research and news | Nature [Internet]. [cité 19 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/subjects/cancer-microenvironment>
- [28] Développement du médicament · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 19 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/medicament-developpement/>
- [29] Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA.* 3 mars 2020;323(9):844-53.
- [30] Nos missions - Encadrer la mise sur le marché des produits de santé - ANSM [Internet]. [cité 20 mai 2021]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/nos-missions/faciliter-laces-a-linnovation-therapeutique/p/encadrer-la-mise-sur-le-marche-des-produits-de-sante>
- [31] Recherche et développement [Internet]. [cité 20 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>
- [32] Harrison RG. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology.* 1910;9(4):787-846.
- [33] Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, *et al.* Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact.* 2014;13:141. Published 2014 Oct 2. doi:10.1186/s12934-014-0141-0
- [34] REACH en détail | REACH INFO [Internet]. [cité 15 juill 2022]. Disponible sur: https://reach-info.ineris.fr/reach_en_detail
- [35] Isolate Cells from Blood [Internet]. [cité 22 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.stemcell.com/cell-separation/isolate-cells-from-blood>
- [36] Wolinetz CD, Collins FS. Recognition of Research Participants' Need for Autonomy: Remembering the Legacy of Henrietta Lacks. *JAMA.* 15 sept 2020;324(11):1027.
- [37] Brancato V, Oliveira JM, Correlo VM, Reis RL, Kundu SC. Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials.* févr 2020;232:119744.
- [38] Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater.* 2021;6(5):402-420.
- [39] Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology.* 2 janv 2017;216(1):31-40.

- [40] Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med*. 2013;110(3):201-205.
- [41] Universalis E. AVENZOAR [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 28 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/avenzoar/>
- [42] Développement du médicament · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 03 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/medicament-developpement/>
- [43] Utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements français – Enquête statistique 2020 [Internet]. Ministre de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ; 2020. 13p. Disponible : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2022-02/enqu-te-2020-utilisation-des-animaux-des-fins-scientifiques-16892.pdf>
- [44] Méthodes en immunologie. Des principes aux bonnes applications 2e édition - ASSIM [Internet]. [cité 18 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.decitre.fr/livres/methodes-en-immunologie-9782294762161.html>
- [45] Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. oct 2011;164(4):1079-106.
- [46] Convention STE n°123 du Conseil de l'Europe du 18 mars 1986 sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Disponible sur: <https://rm.coe.int/168007a682>
- [47] La réglementation et l'éthique de l'expérimentation animale [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 10 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/recherche-inserm/ethique/utilisation-animaux-fins-recherche/reglementation-et-ethique-experimentation-animale>
- [48] Détails du traité n°123 [Internet]. Portail du Conseil de l'Europe. [cité 10 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>
- [49] Section 6 : Utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques – Articles R214-87 à R214-137 [Internet]. Code rural et de la pêche maritime. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006071367/LEGI_SCTA000027039288/#LEGISCTA000027039291
- [50] Décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Article 1
- [51] Décret n°2017-1411 du 27 septembre 2017 modifiant le code forestier et le code rural et de la pêche maritime. Article 2
- [52] Décret n°2020-274 du 17 mars 2020 modifiant certaines dispositions relatives à la protection des animaux à des fins scientifiques. Article 1
- [53] Kirk RGW. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique. *Sci Technol Human Values*. juill 2018;43(4):622-48.
- [54] Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. mars 2015;54(2):120-32.
- [55] Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim*. 1997 Apr;31(2):116-24.
- [56] O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):453-60.
- [57] Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Oct;21(10):571-584.
- [58] La recherche clinique · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 01 avr 2022]. Disponible sur: _

- <https://www.inserm.fr/our-research/clinical/la-recherche-clinique/>
- [59] Les essais cliniques (Recherches interventionnelles portant sur un produit de santé) · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 03 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante/>
- [60] Mésusage - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 03 avr 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/glossaire/article/mesusage>
- [61] Loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales
- [62] Jaillon P, Demarez JP. L'histoire de la genèse de la loi Huriet-Sérusclat de décembre 1988 - Loi sur la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales. *Med Sci (Paris)*. 1 mars 2008;24(3):323-7.
- [63] Nos missions - Encadrer les essais cliniques - ANSM [Internet]. [cité 28 mars 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/nos-missions/faciliter-laces-a-linnovation-therapeutique/p/encadrer-les-essais-cliniques>
- [64] Smith E, Cochrane WJ. Cystic organoid teratoma; report of a case. *Can Med Assoc J*. 1946 Aug;55(2):151.
- [65] Duryee WR, Doherty JK. Nuclear and cytoplasmic organoids in the living cell. *Ann N Y Acad Sci*. 1954 Nov 17;58(7):1210-31.
- [66] Pomerat CM, Lefeber CG, Smith M. Quantitative cine analysis of cell organoid activity. *Ann N Y Acad Sci*. 1954 Nov 17;58(7):1311-21.
- [67] Bernhard W, De Harven E. Sur la présence dans certaines cellules de mammifères d'un organite de nature probablement centriolaire: étude au microscope électronique. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1956 Jan 9;242(2):288-90
- [68] Weber FP. Hamartomata and organoid tumours. *Med Press*. 1950 May 31;223(22):512-3.
- [69] Assouad M, Tuchmann L, Oppermann A. [A very rare tumor of the stomach: "dysgenetic organoid cyst"]. *Lyon Chir*. 1960 Nov;56:842-52.
- [70] Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 16 juin 2016;165(7):1586-97.
- [71] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, *et al*. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 14 mai 2009;459(7244):262-5.
- [72] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, *et al*. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. sept 2013;501(7467):373-9.
- [73] Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, *et al*. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*. 19 mai 2016;165(5):1238-54.
- [74] Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, *et al*. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell*. 15 janv 2015;160(0):324-38.
- [75] Ogundipe VML, Groen AH, Hosper N, Nagle PWK, Hess J, Faber H, *et al*. Generation and Differentiation of Adult Tissue-Derived Human Thyroid Organoids. *Stem Cell Reports*. 13 avr 2021;16(4):913-25

- [76] Stein MC, Braun F, Krebs CF, Bunders MJ. Kidney organoid systems for studies of immune-mediated kidney diseases: challenges and opportunities. *Cell Tissue Res.* août 2021;385(2):457-73.
- [77] Torresi J, Tran BM, Christiansen D, Earnest-Silveira L, Schwab RHM, Vincan E. HBV-related hepatocarcinogenesis: the role of signalling pathways and innovative ex vivo research models. *BMC Cancer.* déc 2019;19(1):707.
- [78] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MMA, *et al.* Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell.* 15 janv 2015;160(1-2):299-312.
- [79] Dicarolo M, Teti G, Verna G, Liso M, Cavalcanti E, Sila A, *et al.* Quercetin Exposure Suppresses the Inflammatory Pathway in Intestinal Organoids from Winnie Mice. *IJMS.* 16 nov 2019;20(22):5771.
- [80] Garcia-Carbonell R, Wong J, Kim JY, Close LA, Boland BS, Wong TL, *et al.* Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25 sept 2018;115(39):E9192-200.
- [81] Wong HLX, Qin H yan, Tsang SW, Zuo X, Che S, Chow CFW, *et al.* Early life stress disrupts intestinal homeostasis via NGF-TrkA signaling. *Nat Commun.* déc 2019;10(1):1745.
- [82] Rogoz A, Reis BS, Karssemeijer RA, Mucida D. A 3-D enteroid-based model to study T-cell and epithelial cell interaction. *J Immunol Methods.* juin 2015;421:89-95.
- [83] Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, Yamada C, Eiraku M, Yonemura S, *et al.* Transplantation of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D Retinal Sheets into Retinal Degenerative Mice. *Stem Cell Reports.* 6 mai 2014;2(5):662-74.
- [84] Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc.* janv 2012;7(1):69-79.
- [85] Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, Tsai YH, Nagy MS, Dyal R, *et al.* In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife.* 24 mars 2015;4.
- [86] Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, Hill DR, Overeem AW, Shea LD, *et al.* Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc.* févr 2019;14(2):518-40.
- [87] Heo I, Dutta D, Schaefer DA, Iakobachvili N, Artegiani B, Sachs N, *et al.* Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat Microbiol.* 2018 Jul;3(7):814-823.
- [88] Ringuette Goulet C, Bernard G, Chabaud S, Couture A, Langlois A, Neveu B, *et al.* Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. *Biomaterials.* nov 2017;145:233-41.
- [89] Vasyutin I, Zerihun L, Ivan C, Atala A. Bladder Organoids and Spheroids: Potential Tools for Normal and Diseased Tissue Modelling. *Anticancer Res.* mars 2019;39(3):1105-18.
- [90] Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, *et al.* Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nat Commun.* 11 oct 2018;9(1):4216.
- [91] Wagar LE, Salahudeen A, Constantz CM, Wendel BS, Lyons MM, Mallajosyula V, *et al.* Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. *Nat Med.* janv 2021;27(1):125-35.
- [92] Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, Thieck O, Jackisch S, Toelle B, *et al.* The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun.* 8 déc 2015;6:8989.

- [93] Baert Y, De Kock J, Alves-Lopes JP, Söder O, Stukenborg JB, Goossens E. Primary Human Testicular Cells Self-Organize into Organoids with Testicular Properties. *Stem Cell Reports*. 22 déc 2016;8(1):30-8.
- [94] Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod*. 1 mars 2017;96(3):720-32.
- [95] Turco MY, Gardner L, Kay RG, Hamilton RS, Prater M, Hollinshead MS, et al. Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation. *Nature*. déc 2018;564(7735):263-7.
- [96] Holokai L, Chakrabarti J, Broda T, Chang J, Hawkins JA, Sundaram N, et al. Increased Programmed Death-Ligand 1 is an Early Epithelial Cell Response to *Helicobacter pylori* Infection. *PLoS Pathog*. 2019 Jan 31;15(1):e1007468.
- [97] Li M, Izipisua Belmonte JC. Organoids — Preclinical Models of Human Disease. *N Engl J Med*. 7 févr 2019;380(6):569-79.
- [98] Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*. 1961;14(2):213-22.
- [99] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 6 nov 1998;282(5391):1145-7.
- [100] Culture prolongée (Blastocyste) – CFO [Internet]. [cité 17 juill 2022]. Disponible sur: <https://cfo29.fr/techniques/culture-prolongee-blastocyste/>
- [101] La recherche sur embryon et cellules souches embryonnaires - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 27 juill 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/grands-dossiers/bioethique/le-cadre-juridique-avant-le-projet-de-loi/article/la-recherche-sur-embryon-et-cellules-souches-embryonnaires>
- [102] LOI n° 2021-1017 du 2 août 2021 relative à la bioéthique (1). 2021-1017 août 2, 2021. Article 20.
- [103] Fujii M, Sato T. Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nat Mater*. févr 2021;20(2):156-69.
- [104] Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet*. juill 2019;20(7):377-88.
- [105] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 [Internet]. NobelPrize.org. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/yamanaka/facts/>
- [106] Tran F, Klein C, Arlt A, Imm S, Knappe E, Simmons A, et al. Stem Cells and Organoid Technology in Precision Medicine in Inflammation: Are We There Yet? *Front Immunol*. 21 déc 2020;11:573562.
- [107] Blutt SE, Estes MK. Organoid Models for Infectious Disease. *Annu Rev Med*. 27 janv 2022;73:167-82
- [108] Merker SR, Weitz J, Stange DE. Gastrointestinal organoids: How they gut it out. *Developmental Biology*. 15 déc 2016;420(2):239-50.
- [109] Daoud A, Múnera JO. Generation of human colonic organoids from human pluripotent stem cells. *Methods Cell Biol*. 2020;159:201-27.
- [110] Sato T, Clevers H. SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell*. 18 juin 2015;161(7):1700-1700.e1.
- [111] Múnera JO, Sundaram N, Rankin SA, Hill D, Watson C, Mahe M, et al. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Colonic Organoids via Transient Activation of BMP Signaling. *Cell Stem Cell*. 6 juill 2017;21(1):51-64.e6
- [112] B-27 Supplement: The Standard for Neuronal Cell Culture - FR [Internet]. [cité 4 sept 2022]. Disponible sur:

<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/gibco/gibco-b-27-supplement.html>

[113] Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* oct 2014;9(10):2329-40.

[114] Gu Y, Fu J, Lo PK, Wang S, Wang Q, Chen H. The Effect of B27 Supplement on Promoting In Vitro Propagation of Her2/neu-Transformed Mammary Tumorspheres. *Journal of Biotech Research.* 1 janv 2011;3:7-18.

[115] Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* juin 2001;11(3):272-80.

[116] Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology.* nov 2011;141(5):1762-72.

[117] Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H, Ming G li. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc.* mars 2018;13(3):565-80.

[118] Haramis APG, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJA, et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science.* 12 mars 2004;303(5664):1684-6.

[119] Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, et al. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun.* 6 janv 2017;8(1):13824.

[120] Yin X, Farin HF, van Es JH, Clevers H, Langer R, Karp JM. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods.* janv 2014;11(1):106-12.

[121] Holmberg FE, Seidelin JB, Yin X, Mead BE, Tong Z, Li Y, et al. Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the treatment of inflammatory bowel disease. *EMBO Mol Med.* mai 2017;9(5):558-70.

[122] Rabata A, Fedr R, Soucek K, Hampl A, Koledova Z. 3D Cell Culture Models Demonstrate a Role for FGF and WNT Signaling in Regulation of Lung Epithelial Cell Fate and Morphogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 21 juill 2020;8:574.

[123] Sahu S, Albaugh ME, Martin BK, Patel NL, Riffle L, Mackem S, et al. Growth factor dependency in mammary organoids regulates ductal morphogenesis during organ regeneration. *Sci Rep.* 3 mai 2022;12(1):7200.

[124] Zhang M, Liu Y, Chen YG. Generation of 3D human gastrointestinal organoids: principle and applications. *Cell Regen.* 10 juin 2020;9:6.

[125] Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* mai 2002;3(5):383-94.

[126] Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB. Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene.* 15 janv 2016;576(1 Pt 3):381-4.

[127] Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ, Niu L, et al. Combined small molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol.* 1 juill 2012;30(7):715-20.

[128] Meng Y, Ren Z, Xu F, Zhou X, Song C, Wang VYF, et al. Nicotinamide Promotes Cell Survival and Differentiation as Kinase Inhibitor in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 11 déc 2018;11(6):1347-56.

[129] Urbischek M, Rannikmae H, Foets T, Ravn K, Hyvönen M, de la Roche M. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. *Sci Rep.* 17 avr 2019;9(1):6193.

[130] Pénicilline-streptomycine (5 000 U/ml) [Internet]. [cité 4 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15070063>

- [131] Buchanan FG, DuBois RN. Connecting COX-2 and Wnt in cancer. *Cancer Cell*. janv 2006;9(1):6-8.
- [132] Woods NB, Parker AS, Moraghebi R, Lutz MK, Firth AL, Brennand KJ, et al. Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. juill 2011;29(7):1158-64.
- [133] Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nat Chem Biol*. janv 2006;2(1):29-30.
- [134] Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc*. sept 2009;4(9):1295-304.
- [135] Sato T, Clevers H. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science*. 7 juin 2013;340(6137):1190-4.
- [136] Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 juill 2011;108(28):11452-7.
- [137] Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, et al. Inhibition of transforming growth factor (TGF)- β 1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol*. juill 2002;62(1):58-64.
- [138] Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*. nov 2009;6(11):805-8.
- [139] Brady MV, Vaccarino FM. Role of SHH in Patterning Human Pluripotent Cells towards Ventral Forebrain Fates. *Cells*. 16 avr 2021;10(4):914.
- [140] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 8 juin 2012;149(6):1192-205.
- [141] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. juin 2007;25(6):681-6.
- [142] Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, Mizutani T, Sasaki N, Sasselli V, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*. 13 oct 2017;358(6360):234-8.
- [143] Takahashi N, Hoshi H, Higa A, Hiyama G, Tamura H, Ogawa M, et al. An In Vitro System for Evaluating Molecular Targeted Drugs Using Lung Patient-Derived Tumor Organoids. *Cells*. 20 mai 2019;8(5):481.
- [144] Votanopoulos KI, Mazzocchi A, Sivakumar H, Forsythe S, Aleman J, Levine EA, et al. Appendiceal Cancer Patient-Specific Tumor Organoid Model for Predicting Chemotherapy Efficacy Prior to Initiation of Treatment: A Feasibility Study. *Ann Surg Oncol*. janv 2019;26(1):139-47.
- [145] Yuki K, Cheng N, Nakano M, Kuo CJ. Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends in Immunology*. 1 août 2020;41(8):652-64.
- [146] Courau T, Bonnereau J, Chicoteau J, Bottois H, Remark R, Assante Miranda L, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunotherapy Cancer*. déc 2019;7(1):74.
- [147] Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*. sept 2018;174(6):1586-1598.e12.
- [148] Aboulkheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in Biotechnology*. avr 2018;36(4):358-71.

- [149] Engevik MA, Danhof HA, Chang-Graham AL, Spinler JK, Engevik KA, Hermann B, et al. Human intestinal enteroids as a model of *Clostridioides difficile*-induced enteritis. :51.
- [150] Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Fontana L, Muñoz-Quezada S, Gil A. In vitro cell and tissue models for studying host –microbe interactions: a review. *British Journal of Nutrition*. :8.
- [151] Huang JY, Sweeney EG, Sigal M, Zhang HC, Remington SJ, Cantrell MA, et al. Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium. *Cell Host Microbe*. 12 août 2015;18(2):147-56.
- [152] Williamson IA, Arnold JW, Samsa LA, Gaynor L, DiSalvo M, Cocchiari JL, et al. A High-Throughput Organoid Microinjection Platform to Study Gastrointestinal Microbiota and Luminal Physiology. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6(3):301-19.
- [153] Chukwurah E, Osmundsen A, Davis SW, Lizarraga SB. All Together Now: Modeling the Interaction of Neural With Non-neural Systems Using Organoid Models. *Front Neurosci*. 2019;13:582.
- [154] Shao Q, Herrlinger S, Zhu YN, Yang M, Goodfellow F, Stice SL, et al. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development*. 15 nov 2017;144(22):4114-24.
- [155] Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*. 4 août 2016;19(2):258-65.
- [156] Sakib S, Voigt A, Goldsmith T, Dobrinski I. Three-dimensional testicular organoids as novel in vitro models of testicular biology and toxicology. *Environ Epigenet*. 31 juill 2019;5(3):dvz011.
- [157] van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*. 7 mai 2015;161(4):933-45.
- [158] Buzzelli JN, Ouaret D, Brown G, Allen PD, Muschel RJ. Colorectal cancer liver metastases organoids retain characteristics of original tumor and acquire chemotherapy resistance. *Stem Cell Research*. 1 mars 2018;27:109-20.
- [159] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 23 févr 2018;359(6378):920-6.
- [160] Matsumoto N, Satyam A, Geha M, Lapchak PH, Dalle Lucca JJ, Tsokos MG, et al. C3a Enhances the Formation of Intestinal Organoids through C3aR1. *Front Immunol*. 2017;8:1046.
- [161] Sachs N, Pappaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J*. 15 févr 2019;38(4):e100300.
- [162] Cattaneo CM, Dijkstra KK, Fanchi LF, Kelderman S, Kaing S, van Rooij N, et al. Tumor organoid–T-cell coculture systems. *Nat Protoc*. janv 2020;15(1):15-39.
- [163] Ye W, Luo C, Li C, Huang J, Liu F. Organoids to study immune functions, immunological diseases and immunotherapy. *Cancer Lett*. 1 mai 2020;477:31-40.
- [164] Jung KB, Lee H, Son YS, Lee MO, Kim YD, Oh SJ, et al. Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Nat Commun*. 2 août 2018;9:3039.

- [165] Zhao J, Fu Y, Yamazaki Y, Ren Y, Davis MD, Liu CC, et al. APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nat Commun.* 2 nov 2020;11(1):5540.
- [166] Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, et al. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron.* 19 avr 2017;94(2):278-293.e9.
- [167] Seet CS, He C, Bethune MT, Li S, Chick B, Gschwend EH, et al. Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids. *Nat Methods.* mai 2017;14(5):521-30.
- [168] Lenti E, Bianchessi S, Proulx ST, Palano MT, Genovese L, Raccosta L, et al. Therapeutic Regeneration of Lymphatic and Immune Cell Functions upon Lympho-organoid Transplantation. *Stem Cell Reports.* 11 juin 2019;12(6):1260-8.
- [169] Shou Y, Johnson SC, Quek YJ, Li X, Tay A. Integrative lymph node-mimicking models created with biomaterials and computational tools to study the immune system. *Materials Today Bio.* 1 mars 2022;14:100269.
- [170] Sun W, Luo Z, Lee J, Kim HJ, Lee K, Tebon P, et al. Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling. *Adv Healthcare Mater.* 3 janv 2019;1801363.
- [171] Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnol Bioeng.* oct 2016;113(10):2213-27.
- [172] Natarajan V, Simoneau CR, Erickson AL, Meyers NL, Baron JL, Cooper S, et al. Modelling T-cell immunity against hepatitis C virus with liver organoids in a microfluidic coculture system. *Open Biol.* mars 2022;12(3):210320.
- [173] Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 3 juill 2020;369(6499):50-4.
- [174] Stanifer ML, Kee C, Cortese M, Zumaran CM, Triana S, Mukenhirn M, et al. Critical Role of Type III Interferon in Controlling SARS-CoV-2 Infection in Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Rep.* 7 juill 2020;32(1):107863.
- [175] Cellules souches embryonnaires humaines · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 26 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-embryonnaires-humaines/>
- [176] Article L1261-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 22 août 2022]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000043895775
- [177] Lavazza A, Massimini M. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics.* sept 2018;44(9):606-10.
- [178] Chen HI, Wolf JA, Blue R, Song MM, Moreno JD, Ming G li, et al. Transplantation of Human Brain Organoids: Revisiting the Science and Ethics of Brain Chimeras. *Cell Stem Cell.* oct 2019;25(4):462-72.

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien

« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».



Mme Marion PRONO

IMMUNITÉ ET MODÈLES EXPÉRIMENTAUX
EN RECHERCHE PHARMACEUTIQUE : INTÉGRATION DU
SYSTÈME IMMUNITAIRE DANS LES MODÈLES ORGANOÏDES

RÉSUMÉ :

Le développement de médicaments est un processus complexe qui nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux pour évaluer l'efficacité et la sécurité chez l'homme. Cependant, les principaux modèles expérimentaux utilisés dans la recherche pharmaceutique sont soumis à des contraintes techniques, biologiques et éthiques. De plus, certains d'entre eux ont des difficultés à intégrer le système immunitaire. Cette composante essentielle de l'organisme est impliquée dans la lutte contre les agents pathogènes exogènes ou endogènes mais aussi dans de nombreux autres mécanismes physiologiques. Afin de faciliter la recherche fondamentale sur les pathologies humaines et le développement de traitements, de nouveaux modèles expérimentaux ont été créés : les organoïdes. Ces structures tridimensionnelles sont capables de reproduire l'anatomie et les fonctions de l'organe qu'elles modélisent.

L'objectif de cette thèse consiste à faire le point sur l'état actuel des connaissances sur les modèles expérimentaux utilisés en recherche pharmaceutique et en particulier sur les systèmes organoïdes. Nous passons en revue les différentes stratégies d'intégration du système immunitaire dans ces modèles. Enfin, nous discutons des contraintes techniques et éthiques auxquelles les équipes de recherche et les institutions devront faire face afin de permettre l'utilisation à grande échelle de ces technologies organoïdes prometteuses.

MOTS CLÉS : organoïdes, système immunitaire, modèles 3D, recherche pharmaceutique

SPÉCIALITÉ : Recherche

Mrs. Marion PRONO

IMMUNITY AND EXPERIMENTAL MODELS
IN PHARMACEUTICAL RESEARCH: INTEGRATION OF THE IMMUNE
SYSTEM IN ORGANOID MODELS

ABSTRACT :

Drug development is a complex process that requires the use of experimental models to assess efficiency and safety for human beings. However, the main experimental models used in pharmaceutical research are subject to technical, biological and ethical constraints. In addition, some of them have difficulties in integrating the immune system. This essential component of the organism is involved in the fight against exogenous or endogenous pathogens but also in many other physiological mechanisms. In order to facilitate fundamental research on human pathologies and the development of treatments, new experimental models have been created: organoids. These three-dimensional structures are able to replicate the anatomy and functions of the organ they model.

The objective of this thesis consists of a review for the current state of knowledge on experimental models used in pharmaceutical research and in particular on organoid systems. We review the different strategies for integrating the immune system into these models. Finally, we discuss the technical and ethical constraints that research teams and institutions will have to face in order to allow the large-scale use of these promising organoid technologies.

KEY WORDS: organoids, immune system, 3D models, pharmaceutical research

SPECIALITY: Research