



HAL
open science

Les organoïdes chez les animaux de compagnie et de production : état des lieux et perspectives

Lucas de Giudici

► **To cite this version:**

Lucas de Giudici. Les organoïdes chez les animaux de compagnie et de production : état des lieux et perspectives. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04415394

HAL Id: dumas-04415394

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04415394v1>

Submitted on 24 Jan 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

LES ORGANOÏDES CHEZ LES ANIMAUX DE COMPAGNIE ET DE PRODUCTION : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 13 décembre 2023

par

Lucas, Jacques DE GIUDICI

sous la direction de

Delphine LE ROUX

JURY

Président du jury :	M. Grégory JOUVION	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Laurent TIRET	Professeur à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version décembre 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP	1
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC	2
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP	3
Mme	Bencheikroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC	4
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP	5
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC	6
M	Boulouts	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP	7
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC	8
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP	9
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP	10
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC	11
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP	12
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP	13
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC	14
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP	15
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP	16
M	Eliot	Marc	Professeur	DSBP	17
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC	18
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP	19
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC	20
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP	21
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC	22
Mme	Grimard-Bailif	Bénédicte	Professeur	DPASP	23
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP	24
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP	25
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP	26
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP	27
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP	28
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC	29
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Professeur	DEPEC	30
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP	31
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP	32
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP	33
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP	34
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP	35
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP	36
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP	37
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC	38
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC	39

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP	1
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP	2
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	3
Mme	Bertoni	Lella	Maître de conférences	DEPEC	5
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC	7
Mme	Chevalier	Lucie	Maître de conférences	DSBP	8
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC	9
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP	10
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	11
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP	12
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP	13
Mme	De Paula Reis	Aline	Maître de conférences	DPASP	14
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP	15
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP	16
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP	17
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP	18
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP	19
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP	20
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	21
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	22
Mme	Lagrèe	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP	23
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP	24
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP	25
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP	26
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC	27
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP	28
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	29
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	31
Mme	Mespouhes-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	32
Mme	Mimmet	Narjès	Maître de conférences	DPASP	33
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC	34
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC	35
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	36
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP	37
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	38
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangeère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP	39
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP	40
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP	41
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC	42

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. Grégory JOUVION, Professeur à l'EnvA,
sincères remerciements pour avoir accepté la présidence de cette thèse et pour vos corrections.

À Mme Delphine LE ROUX, Maître de conférences à l'EnvA,
merci d'avoir accepté de m'accompagner sur ce vaste sujet.

À M. Laurent TIRET, Professeur à l'EnvA,
merci pour votre aide et votre engouement tout au long de ce travail.

À mes parents,
merci pour tout ce que vous m'avez transmis ainsi que de m'avoir soutenu dans ce projet que je nourris depuis bien longtemps maintenant.

À ma famille,
pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

À mes amis,
merci pour toutes ces rencontres et ces discussions qui ouvrent l'esprit.

À l'ensemble des personnes ayant contribué à ma formation,
merci à tous mes enseignants, professeurs et maîtres de stages de m'avoir donné le goût de la science puis celui de la médecine vétérinaire.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des abréviations.....	6
Introduction	9
Première partie : les organoïdes, un modèle en cours de construction	11
1. Définition d'un organoïde.....	11
A. Cellules souches	12
B. Environnement cellulaire.....	12
2. Protocole de conception des organoïdes.....	13
A. Les cellules souches pour la conception d'organoïde	14
B. L'environnement de culture des organoïdes	15
a. Le Matrigel®	15
b. Les structures tridimensionnelles innovantes pour la culture des organoïdes	17
c. L'entretien des organoïdes in vitro	18
3. Les organoïdes : un bon modèle ?	19
A. Les organoïdes de l'appareil digestif	19
a. Les organoïdes du tube digestif	19
i. Les organoïdes oesophagiens.....	19
ii. Les organoïdes stomacaux.....	20
iii. Les organoïdes de l'intestin grêle.....	24
iv. Les organoïdes de caecum, colon et rectum.....	31
b. Les organoïdes des glandes digestives annexes.....	34
i. Les organoïdes de glande salivaire.....	34
ii. Les organoïdes de pancréas exocrine.....	34
iii. Les organoïdes hépatiques.....	36
B. Les organoïdes de l'appareil hémato-lymphopoïétique	37
a. Les organoïdes de l'appareil cardio-vasculaire	37
b. Les organoïdes des organes lymphoïdes et hématopoïétiques	37
C. Les organoïdes de l'appareil urinaire	38
a. Les organoïdes rénaux	38
b. Les organoïdes de l'uretère	38
c. Les organoïdes vésicaux	38
D. Les organoïdes de l'appareil reproducteur	39
a. Les organoïdes de l'appareil reproducteur mâle	39
i. Les organoïdes de testicule.....	39
ii. Les organoïdes des conduits spermatiques.....	40
iii. Les organoïdes des glandes annexes de l'appareil reproducteur mâle.....	41
b. Les organoïdes de l'appareil reproducteur femelle	41
i. Les organoïdes d'ovaire.....	41
ii. Les organoïdes des conduits de l'appareil reproducteur femelle.....	41
iii. Les organoïdes de l'utérus et du vagin.....	42
iv. Les organoïdes de mamelle.....	43
E. Les organoïdes de l'appareil respiratoire	44
a. Les organoïdes de trachée	44
b. Les organoïdes de bronche et bronchiole.....	45
c. Les organoïdes pulmonaires.....	45
F. Les organoïdes du système nerveux	46
G. Les organoïdes du système endocriné	46
a. Les organoïdes thyroïdiens.....	46
Seconde partie : les apports offerts par l'utilisation des organoïdes et les perspectives qu'elle permet d'entrevoir	49

1. Les organoïdes dans le champ de la physiologie	49
A. Les organoïde dans le champ de la science de la nutrition.....	49
B. Les organoïdes dans le champ de l'immunologie.....	52
C. Les organoïdes dans le champ de la biochimie.....	53
2. Les organoïdes dans le champ de la pathologie.....	55
A. Les organoïdes dans le champ des maladies infectieuses	55
B. Les organoïdes dans le champ des maladies non infectieuses	57
C. Les organoïdes dans l'étude de toxiques	57
3. Les organoïdes dans le champ de la thérapeutique	58
A. Organoïdes et médecine régénérative.....	58
B. Organoïdes et thérapies anticancéreuses	59
C. Organoïdes et industrie du médicament.....	60
4. Les limites de la culture cellulaire d'organoïdes.....	61
Conclusion.....	65
Liste des références bibliographiques	67
Annexe 1	77

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : schéma de comparaison entre organoïde et sphéroïde, d'après Sakalem <i>et al.</i> (2021).....	11
<u>Figure 2</u> : microenvironnement cellulaire, d'après Kozlowski <i>et al.</i> (2021).....	13
<u>Figure 3</u> : schéma et photo légendés d'un blastocyste, d'après Cohen et Elder (2007).....	14
<u>Figure 4</u> : schéma légendé d'un organoïde au sein de son environnement de culture, d'après Rossi <i>et al.</i> (2018).....	15
<u>Figure 5</u> : images en microscopie électronique du gel reconstitué et d'une véritable membrane basale, d'après Kleinman <i>et al.</i> (1986).....	16
<u>Figure 6</u> : analyse des protéines présentes dans le Matrigel® et le Matrigel® GFR en fonction de leur rôle, leur localisation cellulaire normale ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles elles interviennent, d'après Hughes <i>et al.</i> , 2010).....	17
<u>Figure 7</u> : comparaison entre le Matrigel® (à gauche) et des hydrogels synthétiques (à droite), d'après Aisenbrey et Murphy (2020).....	18
<u>Figure 8</u> : mise en culture de glandes sous-muqueuses œsophagiennes a permis la production de sphéroïdes image de microscopie à fond clair, d'après von Furstenberg <i>et al.</i> (2017).....	20
<u>Figure 9</u> : schéma de la production d'organoïdes gastriques et intestinaux pour l'étude des interactions hôte-pathogène, d'après Smith <i>et al.</i> (2021).....	21
<u>Figure 10</u> : caractérisation des organoïdes abomasaux de mouton par immunofluorescence au microscope confocal à sept jours de culture, d'après Smith <i>et al.</i> (2021).....	21
<u>Figure 11</u> : modélisation d'une infestation parasitaire et d'une infection bactérienne d'estomac de mouton, d'après Smith <i>et al.</i> (2021).....	22
<u>Figure 12</u> : infestation d'abomasum bovin et d'organoïdes abomasaux bovins et par <i>O. ostertagi</i> après 24 h, d'après Faber <i>et al.</i> (2022).....	23
<u>Figure 13</u> : schéma des différents types de cellules épithéliales dans l'intestin grêle, d'après Kardia <i>et al.</i> (2020).....	24
<u>Figure 14</u> : comparaison entre entéroïde, sphéroïde et intestin de porc, d'après Khalil <i>et al.</i> (2016).....	25
<u>Figure 15</u> : mise en évidence de l'infection et de l'infestation de différents pathogènes au sein d'entéroïdes de porc.....	27
<u>Figure 16</u> : mise en évidence de différents pathogènes au sein d'organoïdes intestinaux de bovin et d'ovin par immunofluorescence.....	29
<u>Figure 17</u> : organoïdes intestinaux de chien et de chat.....	30

<u>Figure 18</u> : entéroïdes équins, d'après Stewart <i>et al.</i> (2018).....	31
<u>Figure 19</u> : polarisation des organoïdes de cæcum de lapin mis en culture avec différents milieux de cultures (2Ki ou L-WRN).....	32
<u>Figure 20</u> : images de microscopie sur fond clair de colonoïdes de chat. Echelle 100 µm. D'après Tekes <i>et al.</i> (2020).....	33
<u>Figure 21</u> : organoïdes rectaux chez le porc, d'après Adegbola <i>et al.</i> (2017).....	33
<u>Figure 22</u> : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes de pancréas, d'après Zdyrski <i>et al.</i> (2022).....	34
<u>Figure 23</u> : images de microscopie à fond clair de fragment des voies biliaires et des organoïdes hépatiques canins en croissance, d'après Nantasanti <i>et al.</i> (2015).....	35
<u>Figure 24</u> : mise en évidence de structures vasculaires au sein d'organoïdes testiculaires de porc, d'après Cham <i>et al.</i> (2021).....	37
<u>Figure 25</u> : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes de rein, d'après Zdyrski <i>et al.</i> (2022).....	38
<u>Figure 26</u> : composition cellulaire des organoïdes vésicaux (OV), d'après Elbadawy <i>et al.</i> (2022).....	39
<u>Figure 27</u> : images de microscopie sur fond clair des changements et différences morphologiques dans la réorganisation cellulaire au sein des organoïdes de testicules de bovin, d'après Cortez <i>et al.</i> (2022).....	40
<u>Figure 28</u> : coloration à l'hémalun-éosine d'une tumeur prostatique et d'un organoïde issu de celle-ci et image d'immunofluorescence du marqueur épithélial de la cadhérine-E d'après Usui <i>et al.</i> (2017).....	41
<u>Figure 29</u> : images de microscopie électronique à transmission d'organoïdes d'oviducte de jument cryopreservés puis remis en culture, d'après Thompson <i>et al.</i> (2022b).....	42
<u>Figure 30</u> : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes d'utérus, d'après Zdyrski <i>et al.</i> (2022).....	43
<u>Figure 31</u> : images de microscopie sur fond clair d'une mammosphère en formation par auto-organisation, d'après Finot <i>et al.</i> (2021).....	44
<u>Figure 32</u> : images de microscopie sur fond clair des organoïdes mis en culture au sein d'extrait de membrane basale de type 2, d'après Quah <i>et al.</i> (2023).....	45
<u>Figure 33</u> : culture tridimensionnelle de cellules isolées dans du Matrigel®, d'après Lee <i>et al.</i> (2018).....	46
<u>Figure 34</u> : évolution des organoïdes issus de FTC au cours du temps, d'après Tièche (2019)....	47
<u>Figure 35</u> : le glutamate est nécessaire pour l'expansion de cellules souches intestinal <i>ex vivo</i> , d'après Zhu <i>et al.</i> (2019).....	50

<u>Figure 36</u> : effets de l'adjonction de rétinol ou d'acide rétinoïque dans le milieu de culture d'organoïdes intestinaux de porc, d'après Wang <i>et al.</i> (2020).....	51
Figure 37 : cholestérol total et libre au sein d'organoïdes hépatiques de porc, d'après Zhang <i>et al.</i> (2020).....	52
<u>Figure 38</u> : taille et nombre des organoïdes mis en culture avec des ligands du TLR 2 (P3CSK4 (P3C) et <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5), d'après Pierzchalska <i>et al.</i> (2017).....	53
<u>Figure 39</u> : photo de microscopie à fond clair à différents délai de mise en culture d'entéroïdes de porc mis en culture à partir de cellules issues de tissus ischémiés plus au moins longtemps, d'après Stieler Stewart <i>et al.</i> (2018).....	54
<u>Figure 40</u> : schéma du montage afin d'obtenir des organoïdes (ici remplacés en deux dimensions) avec un gradient en dioxygène, d'après Fofanova <i>et al.</i> (2019).....	55
<u>Figure 41</u> : immunofluorescence de protéines de <i>T. gondii</i> au sein d'organoïdes de souris, d'après Martorelli Di Genova <i>et al.</i> (2019).....	56
<u>Figure 42</u> : effet d'une exposition au cuivre sur des organoïdes hépatiques canins issus de foie sain, de foie porteur d'une anomalie génétique rendant le gène COMMD1 inactif ayant ou non subi une mutagenèse dirigée afin de restaurer le gène déficient, d'après Nantasanti <i>et al.</i> (2015).....	57
<u>Figure 43</u> : effets des différentes molécules anti-cancéreuses sur des organoïdes prostatiques tumoraux issus de prélèvement urinaire, d'après Usui <i>et al.</i> (2017).....	60
<u>Figure 44</u> : schéma des différentes limites que rencontrent les organoïdes (en bleu) et des moyens qui pourraient permettre de les dépasser (en vert), d'après Lau <i>et al.</i> (2020).....	62

Liste des abréviations

Akt	Protéine kinase B	LH	Hormone lutéinisante
ALAT	Alanine aminotransférase	LPS	Lipopolysaccharide
ALD1H1	Aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1	MEC	Matrice extra-cellulaire
ARN	Acide ribonucléique	mTOR	Inhibiteur de la cible de la rapamycine chez les mammifères
ARNm	Acide ribonucléique messenger	mTORC1	Complexe 1 des mammifères ciblant la rapamycine
ASAT	Aspartate aminotransférase	MUC2	Mucine 2
ATP	Adénosine triphosphate	<i>MYO5B</i>	Gène codant pour la protéine Vb
<i>BHLHA15</i>	Gène codant pour la protéine basique 15 hélice-boucle-hélice de classe A	NGN3	Neurogénine 3
BHV-2	Herpès virus bovin de type 2	OLFM4	Olfactoméline 4
BMP	Protéine de morphogénèse des os	P3CSK4	N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysine
CgA	Chromogranine A	PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
CK5	Cytokératine-5	PDCoV	Delta coronavirus porcin
CK7	Cytokératine-7	PEDV	Virus de la diarrhée épidémique porcine
COMMD1	Gène du domaine contenant 1 du métabolisme du cuivre	PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
COX-2	Cyclo-oxygénase 2	PTEN	Gène suppresseur de tumeur de l'homologue de la phosphatase et tensine
Ctrl	Contrôle	RHDV	Virus de la diarrhée hémorragique du lapin
D6D	Delta-6-désaturase	ROR γ	Récepteur orphelin associé à l'acide rétinoïque γ
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	SOX17	Facteur de transcription SOX-17
EGF	Facteur de croissance épidermique	SOX9	Facteur de transcription SOX-9

EHS	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>	SPP1	Phosphoprotéine sécrtée 1
EpCAM	Molécule d'adhésion cellulaire épithéliale	TAP	Transporteur associé au traitement des antigènes
FC	Facteur de croissance	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
FTC	Carcinome des cellules folliculaires	TRF	Restriction alimentaire
GFR	Teneur réduite en facteur de croissance	TROP2	Troponine 2
HNF1 β	Facteur 1 β nucléaire des hépatocytes	UPK3A	Uroplakine-3A
IFN	Interferon	Wnt	<i>Wingless-Int1</i>
LGR5	Récepteur 5 couplé à la protéine G contenant des répétitions riches en leucine	α SMA	Actine α des muscles lisses (=ACTA2)

Introduction

Les organoïdes, considérés comme des mini-organes *in vitro* tridimensionnels issus de cellules souches ou progénitrices, sont en plein développement depuis leur mise au point à la fin des années 2000 et ont même été désignés comme méthode de l'année 2017 par la revue scientifique *Nature methods*. Ce type de culture cellulaire permet de se rapprocher, plus que les cultures bidimensionnelles, de la structure et de la fonction de tissus *in vivo*, tout en ne nécessitant qu'un prélèvement de quelques cellules souches ou progénitrices chez des individus maintenus vivants. Cela contribue donc à l'adhésion au principe des trois R visant à remplacer le plus possible l'usage des animaux en expérimentation, à réduire au strict nécessaire leur nombre et à raffiner les protocoles sur les animaux au bénéfice de leur bien-être. La méthode innovante des organoïdes a très vite gagné le champ de la recherche en médecine humaine et vétérinaire. À l'heure actuelle, de nombreux types d'organoïdes ont été développés, que ce soit afin de modéliser un organe sain (rein, foie, poumon, thyroïde...) une affection telle qu'un cancer ou une maladie génétique. Malgré l'ampleur des recherches sur les organoïdes, leur utilisation est récente et leur pertinence qui nécessitera d'être éprouvée, notamment dans leur rôle de modélisation.

Cette thèse a pour but de recenser les organoïdes développés chez nos animaux de compagnie (chien, chat, lapin, cheval) et de production (bovin, caprin, ovin, poulet) et de décrire les avancées permises ou qu'ils permettront. Dans une première partie, nous recenserons les différents organoïdes développés chez les animaux de compagnie et de production et leur pertinence en tant que modèle. Dans une seconde partie, nous mettrons en lumière les avancées auxquelles les organoïdes ont contribué par champ de recherche, puis évoquerons les perspectives entrevues pour ce modèle et les limites à dépasser afin d'accompagner l'essor prévisible de cette méthode.

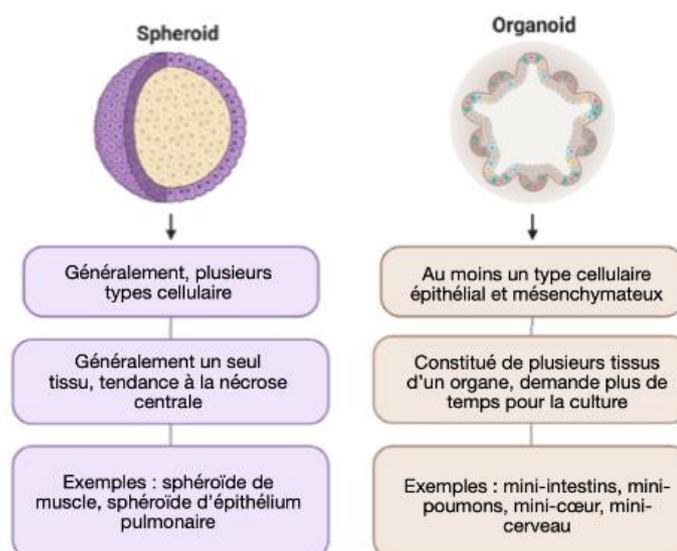
Première partie : les organoïdes, un modèle en cours de construction

Les premiers organoïdes ont été conçus en 2009 par l'équipe de Sato *et al.* (2009). Il s'agit donc d'une méthode récente dont la validation en tant que modèle doit encore souvent être démontrée. Par ailleurs, tous les organes n'ont pas encore fait l'objet d'une production d'organoïde. Cette première partie a donc pour objectif de donner une définition claire de ce qu'est un organoïde puis de lister les organes qui ont fait l'objet de création d'organoïdes tout en étudiant certaines de leurs caractéristiques qui permettent de souligner leur rôle de modèle.

1. Définition d'un organoïde

Pour le grand public, le terme d'organoïde est souvent simplifié en « mini-organe » bien qu'il réponde à une définition plus précise. Lancaster et Knoblich (2014) définissent les organoïdes comme une culture cellulaire tridimensionnelle formée de cellules spécifiques d'un organe. Ces cultures sont issues de cellules souches ou progénitrices qui s'auto-organisent (par différenciation et dans l'espace) et revêtent la même structure et la même fonction que ledit organe *in vivo*. Cette définition permet de replacer les organoïdes au sein des cultures cellulaires tridimensionnelles, dont ils ne sont qu'une partie. À titre d'exemple, les sphéroïdes sont des agrégats cellulaires tridimensionnels mais non adhérents à leur substrat ; par ailleurs, ils ne possèdent pas la propriété d'auto-organisation. Un schéma de comparaison est disponible en [figure 1](#) (Fennema *et al.*, 2013).

Figure 1 : schéma de comparaison entre organoïde et sphéroïde, d'après Sakalem *et al.* (2021)



A. Cellules souches

La technologie des organoïdes ne peut être dissociée de la découverte et des avancées sur les cellules souches. La première découverte date de 1907 lorsque des chercheurs ont montré qu'une cellule isolée d'éponge siliceuse (du genre *Stylotella*) permettait à elle seule de reconstituer un organisme en entier (Wilson, 1907). Leur découverte chez les mammifères date, quant à elle, de 1961 lorsque deux chercheurs ont montré que des cellules issues de moelle osseuse de souris avaient la capacité de se différencier en de nombreux autres types cellulaires différents. Ces premières cellules sont alors appelées pluripotentes. À l'heure actuelle, une cellule souche peut être définie comme une cellule qui a la capacité de se diviser indéfiniment en culture et qui peut donner naissance à des types cellulaires entièrement différenciés (Liu *et al.*, 2020). Cinq grands types de cellules souches sont reconnus aujourd'hui : les cellules souches embryonnaires issues des blastocystes, les très petites cellules ressemblant aux cellules embryonnaires issues d'îlots de cellules souches chez l'adulte, les cellules souches issues d'un transfert nucléaire, les cellules souches reprogrammées aussi appelées cellules souches induites, et les cellules souches adultes (Bongso et Richards, 2004). Bien que ces cellules puissent se différencier en de multiples types cellulaires, elles ne s'organisent pas d'elles-mêmes en trois dimensions, c'est pourquoi un environnement spécifique est nécessaire pour produire des organoïdes *in vitro*.

B. Environnement cellulaire

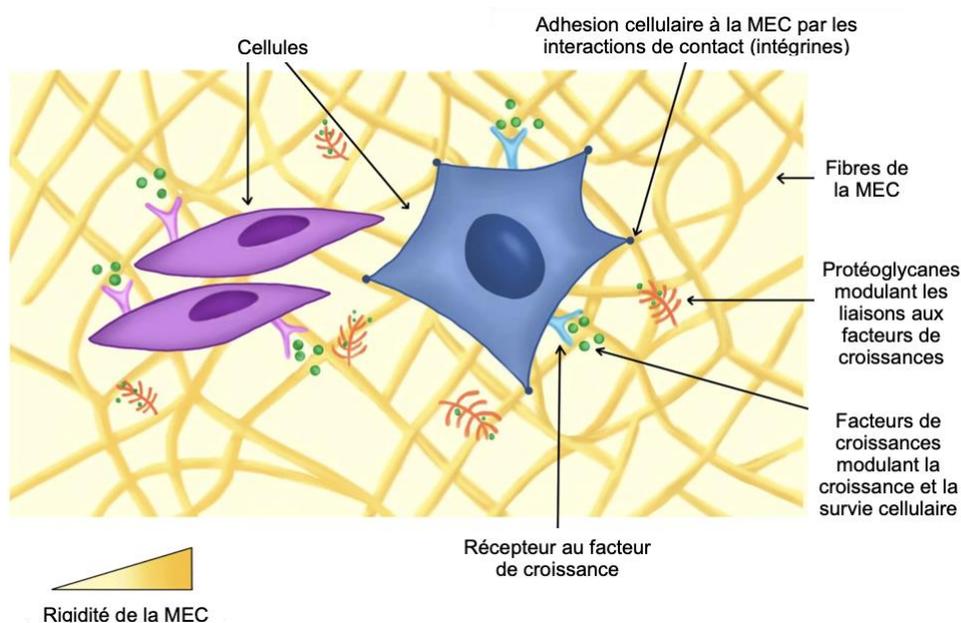
Les cellules souches ne sont qu'un prérequis pour l'obtention d'organoïdes. En effet, les interactions avec la matrice extra-cellulaire ou le milieu de culture sont tout aussi importants. L'environnement cellulaire et acellulaire des cellules souches (notamment adultes) est appelé niche ([figure 2](#)). Celle-ci permet notamment de contrôler le devenir de la cellule souche. Ces interactions peuvent être séparées en interactions de contact et interactions par facteur diffusible (Walker *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les interactions de contact, le récepteur membranaire Notch semble avoir un rôle important dans le devenir des cellules souches. En effet, son activation permettrait d'inhiber la progression d'une cellule dans sa voie de différenciation et de réguler la prolifération cellulaire via d'autres facteurs (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Les ligands (comme Jagged ou Delta1) ou les inhibiteurs (comme Numb) de Notch ont donc une importance capitale dans le destin des cellules.

Par ailleurs, les contacts cellulaires directs sont aussi importants, d'une part pour maintenir les cellules souches au sein de leur niche mais aussi pour transmettre un certain nombre d'informations. Ces contacts cellulaires directs vont par exemple permettre aux cellules d'acquérir une polarité (avec les jonctions serrées, les bêta-caténines ou les E-cadhérines). Des informations sont aussi échangées entre cellules au travers de jonctions *gap*. La matrice extracellulaire (MEC) joue aussi un rôle très important, ne serait-ce que pour concentrer des facteurs diffusibles au sein de ses composants (Walker *et al.*, 2009). Pour rappel, la MEC dispose d'une structure relativement universelle : des fibres de collagène (dont il existe plusieurs types) entre lesquelles sont présentes des glycoprotéines d'adhésion (laminine, tenascine), des protéoglycanes ainsi que les cellules et des facteurs diffusibles (Bosman et Stamenkovic, 2003).

Les interactions médiées par des facteurs diffusibles sont nombreuses. Une des voies majeures est celle de *Wingless-Int1* (Wnt) qui agit sur des récepteurs couplés aux protéines G et va permettre de moduler la destinée cellulaire mais aussi l'adhésion et les mouvements de la cellule. Un autre facteur diffusible majeur est la protéine de morphogenèse des os (BMP) qui semble favoriser le renouvellement des cellules souches (Noggin qui en est un inhibiteur, favorise plutôt la différenciation). En terme général, tous les facteurs de croissance (FC) peuvent entrer dans cette catégorie de facteurs diffusibles comme le facteur de croissance épithélial (EGF) (Li et Xie, 2005).

Figure 2 : microenvironnement cellulaire, d'après Kozlowski *et al.*, 2021



Chaque niche cellulaire a ses spécificités et diffère d'un tissu à un autre. Cela implique que chaque type d'organoïde fera l'objet d'un protocole qui lui est propre, avec un environnement particulier. La connaissance de chaque niche permet donc d'affiner les protocoles de production d'organoïdes.

2. Protocole de conception des organoïdes

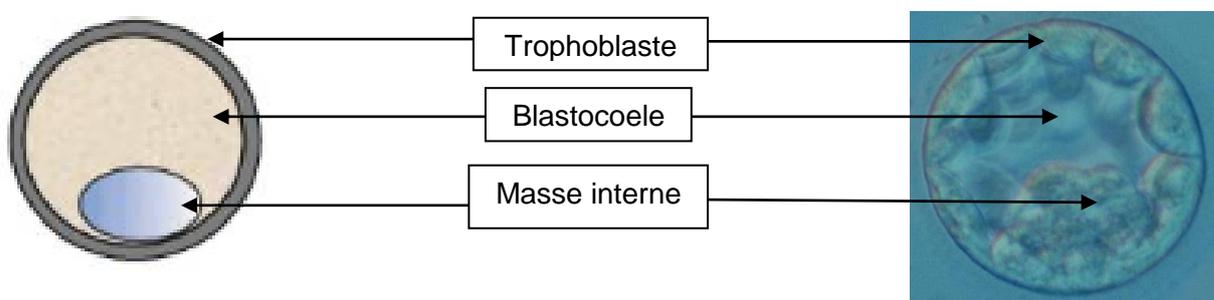
Comme énoncé dans le paragraphe précédent, chaque niche cellulaire est spécifique, ce qui donne lieu à autant de protocoles que de types d'organoïdes, d'espèce animale et de type de cellule utilisé initialement. Dans le monde vétérinaire, les protocoles sont souvent adaptés de ceux développés pour les cellules d'origine humaine ou murine (un exemple de protocole est disponible en annexe 1). Par ailleurs, les protocoles ont constamment évolué depuis dans les années 2010. La partie suivante permet néanmoins de lister les principes communs aux protocoles actuels.

A. Les cellules souches pour la conception d'organoïde

Comme souligné dans la partie sur les cellules souches, il en existe cinq grands types qu'il convient de prélever de façon différente. Les cellules souches embryonnaires sont issues

de la masse cellulaire interne d'un blastocyste (Bongso et Richards, 2004). Le blastocyste est un stade embryonnaire où l'embryon se divise en trophoblaste (qui donnera naissance aux structures extra-embryonnaires) et masse interne (qui donnera principalement naissance à l'embryon *sensu stricto*) comme schématisé en figure 3. Elles peuvent être préservées par culture usuelle (en deux dimensions) avant leur utilisation. Ces cellules ont l'avantage d'être pérennes une fois en culture (elles ne présentent pas d'anomalie chromosomiques après une culture continue). Le désavantage de leur utilisation réside dans leur origine : les blastocystes sont peu disponibles en comparaison à d'autres cellules souches comme les cellules souches adultes.

Figure 3 : schéma et photo légendés d'un blastocyste, d'après (Cohen et Elder, 2007)



Les cellules souches adultes peuvent se retrouver dans différents tissus des organismes mammifères. Les plus connues à l'heure actuelle sont les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse mais beaucoup d'autres ont été identifiées et isolées à ce jour (par exemple dans le cerveau, la peau, les yeux, l'intestin, le muscle squelettique). Cependant, tous les organes ne semblent pas en contenir, à ce titre, le pancréas endocrine ne semble pas pourvu de cellules souches adultes (Bongso et Richards, 2004). L'avantage de l'utilisation de ces cellules est leur disponibilité (qui dépend tout de même de leur localisation ; si une exérèse chirurgicale suffit pour obtenir des cellules souches intestinales, il faut en revanche euthanasier l'animal pour obtenir des cellules souches cérébrales). Le désavantage lié à leur utilisation est la technique d'obtention - qui varie en fonction de la localisation de la cellule.

Les très petites cellules ressemblant aux cellules embryonnaires, n'ont été identifiées que récemment et sont encore sujet à controverse (Liu *et al.*, 2020). Leur rôle est, pour l'heure, mal connu. Ratajczak *et al.* (2019) émettent l'hypothèse qu'elles sont issues des cellules souches embryonnaires qui auraient migré dans les tissus adultes pour agir comme population de réserve. À ce jour, elles ont été isolées de la moelle osseuse et des gonades (Ratajczak *et al.*, 2019). L'avantage de leur utilisation est leur probable pluripotence - comme les cellules souches embryonnaires - tout en étant issues de tissus adultes. L'inconvénient de leur usage est leur méthode de prélèvement ainsi que le manque d'études à leur sujet.

Les cellules souches issues d'un transfert nucléaire sont développées principalement pour le clonage. Ces cellules sont créées en implantant un noyau d'une cellule somatique

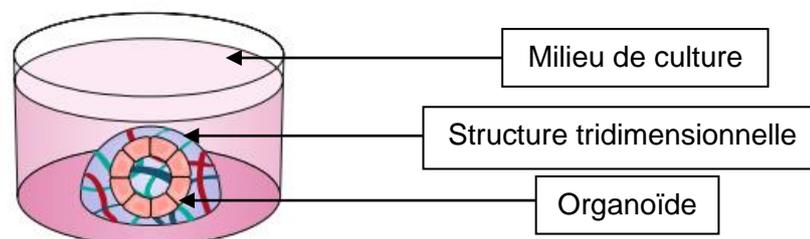
adulte donneuse dans un ovocyte énucléé qui provoque une division cellulaire donnant lieu à la formation d'un blastocyste (Liu *et al.*, 2020). Le principal désavantage de cette méthode réside dans l'utilisation d'une cellule adulte ayant déjà subi plusieurs cycles cellulaires qui entament sa durée de vie et donc celle des cellules-filles à qui elle donnera naissance. L'avantage est que la formation de ces cellules souches ne nécessite qu'un oocyte et une seule cellule différenciée (par exemple un fibroblaste).

Les cellules souches pluripotentes induites sont issues de la reprogrammation cellulaire d'une cellule différenciée. Pour cela des facteurs de transcription et des modulateurs de l'acide ribonucléique (ARN) sont utilisés. L'avantage de l'utilisation de ces cellules réside dans leur disponibilité (cellules adultes donc accessible selon leur localisation). Elles permettent aussi d'aboutir à des cellules proches de ce qui est souhaité en fonction des expérimentations à réaliser (obtenir une cellule souche nerveuse par exemple) (Liu *et al.*, 2020).

B. L'environnement de culture des organoïdes

Les organoïdes sont cultivés grâce à une structure de soutien tridimensionnelle ainsi qu'un certain nombre de facteurs diffusibles afin de recréer *in vitro* une véritable niche (figure 4). C'est pourquoi il est ici discuté de l'environnement et non du seul milieu de culture (rassemblant les facteurs diffusibles).

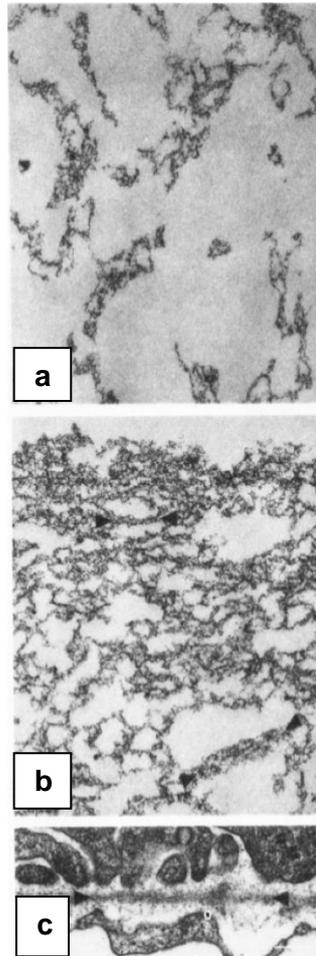
Figure 4 : schéma légendé d'un organoïde au sein de son environnement de culture, d'après Rossi *et al.*, 2018



a. Le Matrigel®

C'est en 1986 que Kleinman *et al.* (1986) s'attachent à extraire la membrane basale de la tumeur murine Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un sarcome. Ce faisant, ils produisent un matériau dont les composants principaux se rapprochent de ceux d'une membrane basale authentique à savoir laminine, collagène de type IV, protéoglycanes, entactine et nidogene et qui gélifie à 37 °C (ce qui est particulièrement utile pour les manipulations en laboratoire). Ce matériau prendra le nom de Matrigel, extrait de EHS, membrane basale reconstituée ou encore cultrex (figure 5).

Figure 5 : images en microscopie électronique du gel reconstitué et d'une véritable membrane basale, d'après Kleinman *et al.* (1986). (a) Gel formé en l'absence de collagène de type IV ou de sulfate d'héparane. Le gel comprend des éléments segmentaires parfois connectés entre eux. (b) Gel formé avec adjonction de collagène de type IV et de sulfate d'héparane. Le bord du gel est en haut de l'image. Le gel comprend un réseau interconnecté d'éléments similaires en dimension à la *lamina densa* de la véritable membrane basale. Ces structures similaires à la *lamina densa* varient en épaisseur. (c) Membrane basale de tubule rénal d'un rat de 100 g. Elle comporte une *lamina lucida* et une *lamina densa*. Des extensions de la lamina densa l'attachent à la membrane cellulaire (têtes de flèches). Échelle : 200 μ m.

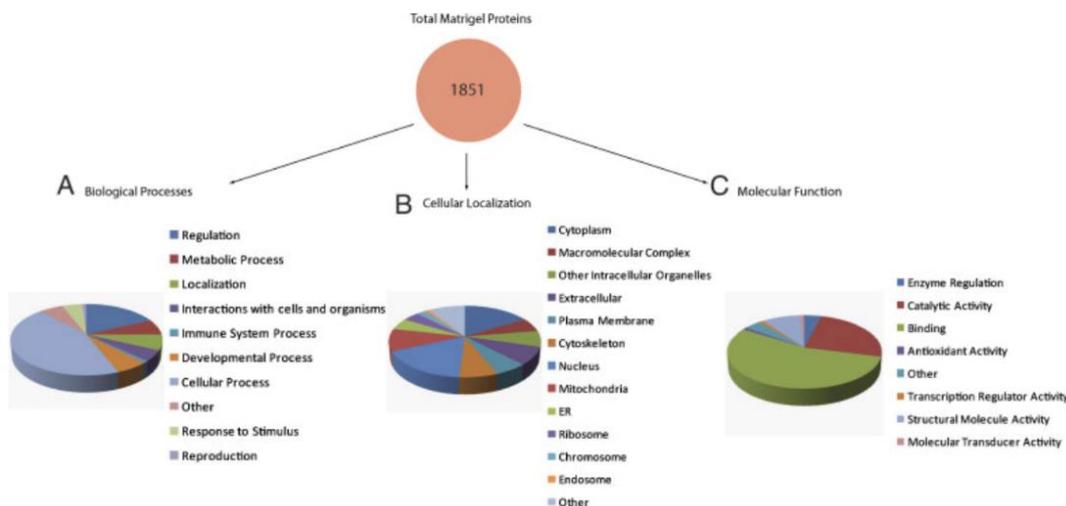


Au sein de l'embryon, les composants de la membrane basale sont les premiers de la matrice extra cellulaire à être synthétisés. En effet, dès le stade deux cellules, les gènes de la laminine sont exprimés (Kleinman et Martin, 2005). Cela souligne donc l'utilité d'un tel matériau pour le support de la culture de cellules souches. Néanmoins, le mécanisme sous-tendant la capacité du Matrigel® à maintenir les cellules en état de multiplication et de pluripotence reste non élucidé aujourd'hui (Hughes *et al.*, 2010).

La découverte de nombreux facteurs de croissances au sein du matériau (épidermiques, fibroblastiques...) a conduit les laboratoires à développer un Matrigel® GFR (*i.e.* avec une teneur réduite en facteurs de croissance). Celui-ci permet de standardiser les protocoles tout en limitant les imprécisions dues à des facteurs de croissances non maîtrisés dans l'environnement de culture.

Bien que la composition du Matrigel® ne soit pas encore totalement définie, des avancées ont été faites dans la compréhension de sa composition (Hughes *et al.*, 2010) (figure 6).

Figure 6 : analyse des protéines présentes dans le Matrigel® et le Matrigel® GFR en fonction de leur fonction, leur localisation cellulaire normale ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles elles interviennent, d'après Hughes *et al.* (2010). Le nombre dans le cercle rouge correspond au nombre total de protéines différentes trouvées dans tous les échantillons.



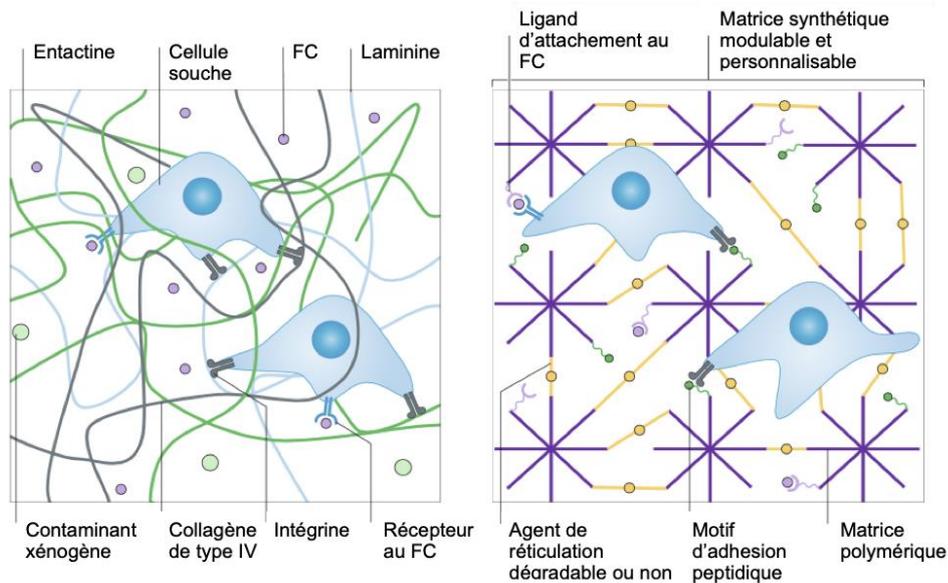
b. Les structures tridimensionnelles innovantes pour la culture des organoïdes

Étant donné la méconnaissance des composants du Matrigel® mais aussi de son comportement physique (Aisenbrey et Murphy, 2020 ; Kozłowski *et al.*, 2021), des équipes se sont penchées sur la confection d'organoïdes à l'aide d'autres matériaux comme des MEC « décellularisées » (c'est-à-dire dépourvue de toute cellule), des hydrogels synthétiques et des protéines recombinantes formant des gels.

Les MEC décellularisées sont issues de tissus prélevés sur des animaux qui sont, ensuite, décellularisés. Celles-ci ont l'avantage d'être adaptées directement aux organoïdes voulus, cela économise des facteurs de croissance et permet de se rapprocher le plus possible de leur niche (elles maintiennent même les différences entre le pôle apical et le pôle basal des cellules). Néanmoins, la disponibilité et la qualité de ces matrices reposent entièrement sur les donneurs et peut varier énormément selon les individus (et notamment selon leur santé), ce qui laisse peu de place au contrôle de celles-ci (Kozłowski *et al.*, 2021). A titre d'exemple, des MEC décellularisées de testicules de porc ont permis la production d'organoïdes de testicules de porc (Vermeulen *et al.*, 2019).

Les hydrogels synthétiques (figure 7) permettent, au contraire des MEC décellularisées, de contrôler leur composition mais aussi leurs comportements physiques. Ces hydrogels nécessitent cependant une adjonction d'agents biochimiques comme des peptides de liaison cellulaire qui doit se faire avec une grande précision (au risque de tuer les cellules) ce qui augmente beaucoup leur prix. Par ailleurs, leur formation ou leur dégradation se fait parfois au prix de composants cytotoxiques, limitant donc leur usage pour des cultures cellulaires fragiles (Kozłowski *et al.*, 2021). Au sein des animaux de compagnie et de production, des essais ont déjà été conduits chez le porc mais ont abouti, pour l'heure à la formation de sphéroïdes de thyroïde plutôt qu'à de réels organoïdes (Yang *et al.*, 2017).

Figure 7 : comparaison entre le Matrigel® (à gauche) et des hydrogels synthétiques (à droite), d'après Aisenbrey et Murphy (2020).



Enfin, il est possible de faire produire à certains micro-organismes des protéines recombinantes capables de former des gels. Cette technique permet un contrôle fin de la composition mais aussi du comportement physique du matériau final (Kozłowski *et al.*, 2021). À titre d'exemple, l'équipe de Jin *et al.* (2013) a créé une matrice à partir d'un polypeptide semblable à l'élastine, au sein duquel étaient incorporés dix-huit acides aminés issus de la laminine- α 1. Ils ont alors montré que des organoïdes initialement cultivés avec du Matrigel® pouvaient continuer de l'être en remplaçant ce dernier par la matrice formée avec leur protéine recombinante. Néanmoins, certains composants de ces matrices à base de protéines recombinantes peuvent être immunogènes (en présentant des épitopes) ce qui peut être un facteur limitant dans l'usage fait des organoïdes (notamment dans le cadre de la médecine régénérative) (Kozłowski *et al.*, 2021).

c. L'entretien des organoïdes *in vitro*

Une fois les cellules placées au sein d'un matériau de culture tridimensionnelle associé à un milieu de culture adapté, les organoïdes se forment en quelques jours. Pour être maintenus ils sont généralement placés dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et à 37 °C, le milieu de culture est changé tous les deux à trois jours. Pour éviter que ceux-ci ne deviennent trop grands (au risque de provoquer une nécrose centrale), ils subissent des « passages ». Ces passages sont en fait le fruit d'une désagrégation chimique et physique puis d'une remise en matériau tridimensionnel et milieu de culture. Il est néanmoins important de se rappeler que ces méthodes varient au cours du temps et selon les organoïdes recherchés.

Par ailleurs, il a été montré que la congélation n'altérerait pas les organoïdes (Faber *et al.*, 2022). Ainsi, il est possible de les conserver pendant de longues durées ce qui permet de réduire le nombre de prélèvements à réaliser pour une même expérience.

3. Les organoïdes : un bon modèle ?

Comme évoqué plus haut, les organoïdes constituent une technologie récente, il convient donc, dans un premier temps, de valider leur qualité de modèle. Cette partie sera donc consacrée à souligner ce qui fait des organoïdes un bon modèle.

A. Les organoïdes de l'appareil digestif

a. Les organoïdes du tube digestif

i. Les organoïdes œsophagiens

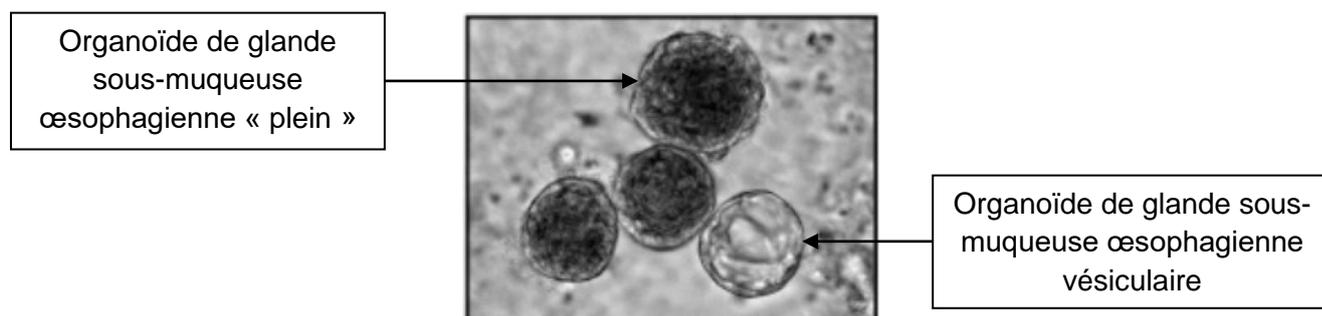
Bien que des organoïdes œsophagiens aient été développés chez l'humain et la souris (Nakagawa *et al.*, 2020), cela n'est, à notre connaissance, pas le cas chez les animaux de compagnie et de production.

Néanmoins, une équipe de chercheurs s'est penchée sur les glandes sous-muqueuses œsophagiennes porcines dans un but translationnel vers l'humain (von Furstenberg *et al.*, 2017). Les canaux de ces glandes sont constitués d'un épithélium squameux parfois prismatique et cilié. Au sein de l'espèce humaine, une lésion œsophagienne peut aboutir à la formation d'un épithélium de Barrett (épithélium prismatique proche de celui des intestins) connu pour son association avec l'adénocarcinome œsophagien. Une implication des glandes sous-muqueuses dans la formation de cet épithélium est suspectée. Le modèle murin ne disposant pas de glandes sous-muqueuses œsophagiennes, cette équipe s'est penchée sur le modèle porcin.

Une fois les cellules de ces glandes mises en milieu de culture tridimensionnel, elles ont montré une capacité de formation de sphéroïde ([figure 8](#)) dont les taux de renouvellement après passage et le marqueur de prolifération (par cytométrie de flux avec un analogue de la thymidine fluorescent) font fortement suspecter la présence de cellules souches. C'est pourquoi il est probable que les sphéroïdes formés soient, en fait, de véritables organoïdes. De plus, l'expression de gènes attribués aux cellules souches (gène codant pour le facteur de transcription 9 de la boîte de la région Y déterminant le sexe (SOX9), olfactomedine 4 (OLFM4), gène codant pour la protéine basique 15 hélice-boucle-hélice de classe A (BHLHA15)) est retrouvée, ce qui laisse à penser que celles-ci sont bien présentes au sein de ces sphéroïdes.

Les organoïdes formés montrent deux morphologies distinctes : d'une part une forme vésiculaire et d'autre part, des organoïdes « pleins ». Les premiers montrent la présence d'un marqueur des cellules des canaux des glandes (protéine p63) en cytométrie de flux alors que les seconds montrent la présence d'un marqueur de l'épithélium squameux et de Barrett (cytokératine-7 (CK7)).

Figure 8 : la mise en culture de glandes sous-muqueuses œsophagiennes a permis la production de sphéroïdes image de microscopie à fond clair, d'après von Furstenberg *et al.* (2017).



L'analyse sur puce à ADN a, de surcroît, permis de montrer que les organoïdes exprimaient davantage de marqueurs de l'épithélium de Barrett que l'épithélium squameux.

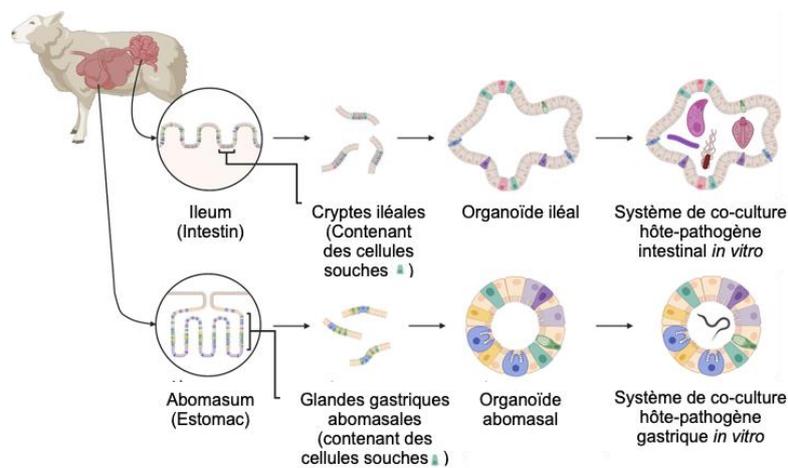
Notons que la première génération d'organoïdes a pu se développer sans adjonction du facteur de croissance épithélial (EGF). Cela est probablement dû au fait que les glandes sous-muqueuses produisent ce facteur d'elles-mêmes. Cependant, ce facteur a dû être ajouté après le premier passage. En étudiant la formation des organoïdes en fonction de la concentration en EGF du milieu, les chercheurs ont pu montrer qu'une concentration de 2,5 ng/mL (concentration physiologique retrouvée dans les sécrétions œsophagiennes) donnait le même résultat qu'une concentration de 50 ng/mL (utilisée pour les organoïdes intestinaux initialement).

Les organoïdes de glandes sous-muqueuses œsophagienne semblent donc sur la voie de devenir un véritable modèle expérimental, notamment pour l'étude des lésions œsophagiennes chez le porc et, *a fortiori*, une aide pour leur étude chez l'humain.

ii. Les organoïdes stomacaux

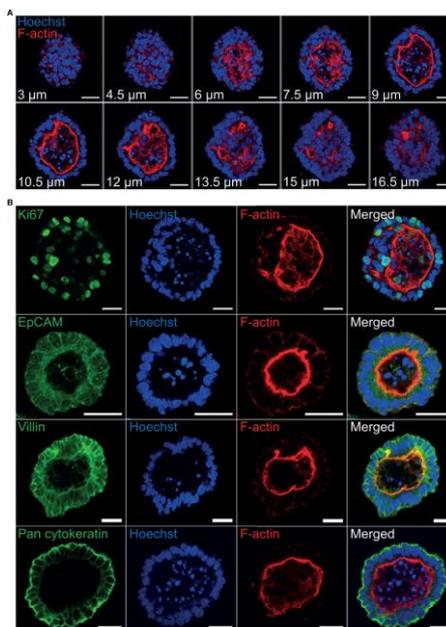
À ce jour et à notre connaissance, seules deux équipes de chercheurs ont montré la possibilité de réaliser des organoïdes d'estomac à partir de cellules souches d'animaux de compagnie et de production. En effet, Smith *et al.* (2021) ont prélevé des cellules souches dans les cryptes stomacales d'abomasum d'ovins afin de produire des organoïdes (figure 9).

Figure 9 : schéma de la production d'organoïdes gastriques et intestinaux pour l'étude des interactions hôte-pathogène, d'après Smith *et al.* (2021). Les cellules souches ovines isolées depuis les cryptes iléales et les glandes gastriques peuvent être mises en culture tridimensionnelle pour produire des organoïdes spécifiques des tissus initiaux. Les organoïdes gastriques et intestinaux peuvent alors être associés à des pathogènes afin de modéliser les interactions hôte pathogène au sein d'un modèle de culture *in vitro* respectant la physiologie et la biologie des tissus.



Les organoïdes issus de leur expérience ont une morphologie sphérique avec une lumière centrale. L'immunofluorescence montre l'existence d'une organisation polarisée (comme dans le tissu originel) ainsi que la présence de nombreux marqueurs des cellules épithéliales comme la villine, la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM) ou la pan-cytokératine (figure 10).

Figure 10 : caractérisation des organoïdes abomasaux de mouton par immunofluorescence au microscope confocal à sept jours de culture, d'après Smith *et al.* (2021). (A) Images d'un organoïde abomasal avec un espace luminal fermé et une bordure en brosse en face interne exprimant l'actine F. En rouge : l'actine F, en bleu Hoechst (noyaux). (B) Images d'organoïdes abomasaux testés pour la prolifération cellulaire (Ki67) et les marqueurs de cellules épithéliales (EpCAM, villine, pan-cytokératine) tous représentés en vert. En rouge l'actine F, en bleu Hoechst. Echelle : 10 µm.

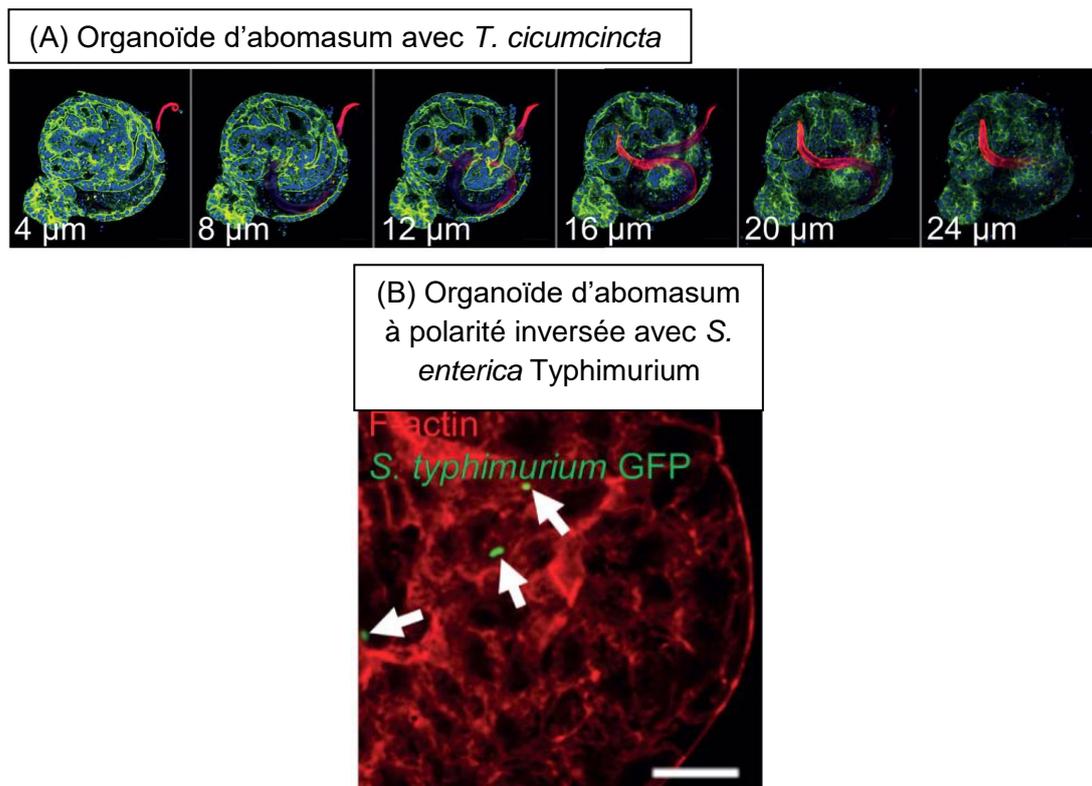


L'étude du transcriptome des tissus originels et des organoïdes montre qu'ils sont différents. Néanmoins, le nombre de passage n'influe pas sur celui-ci, les organoïdes ont donc un transcriptome stable. Il existe, par ailleurs, des catégories de gènes spécifiques communs aux organoïdes et aux tissus abomasaux. Certains gènes sont, par ailleurs, absents des organoïdes iléaux comme abomasaux et présents au sein des tissus. Ceux-ci ont été identifiés comme des gènes liés à l'immunité. Cela peut être expliqué par la présence de cellules immunitaires dans les tissus mais pas dans les organoïdes (puisque seules les cellules souches gastro-intestinales sont sélectionnées pour leur formation).

Par ailleurs, cette équipe a mis au point un protocole afin d'inverser l'organisation polaire des organoïdes dans le but d'avoir un meilleur accès au pôle apical des cellules.

Afin de montrer que ces organoïdes pouvaient être un modèle convenable dans le domaine de l'inféctiologie, ceux-ci ont été exposés à des larves L3 de *Teladorsagia circumcincta* - nématode parasitant l'estomac des petits ruminants - et à *Salmonella enterica* Typhimurium qui ont montré dans les deux cas, que l'infestation et l'infection étaient possibles (figure 11).

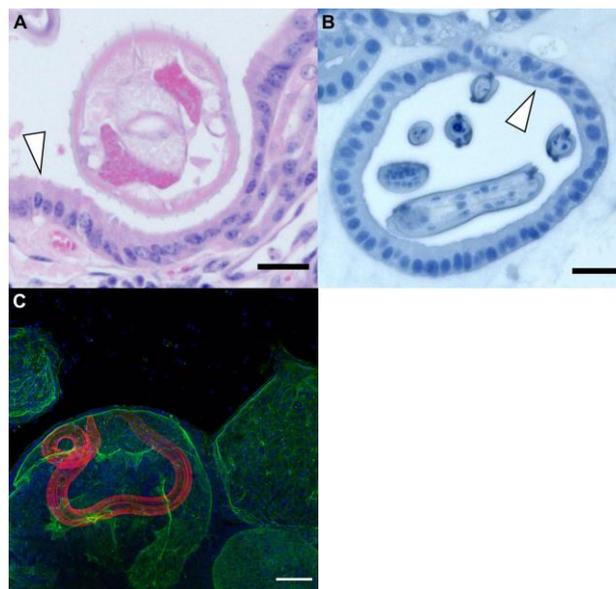
Figure 11 : modélisation d'une infestation parasitaire et d'une infection bactérienne d'estomac de mouton, d'après Smith *et al.* (2021). (A) chronographie d'images d'immunofluorescence d'une infestation par *T. circumcincta* avec en bleu les noyaux, en vert l'actine-F et en rouge les larves L3 de *T. circumcincta*. (B) immunofluorescence d'un organoïde d'abomasum de mouton à polarité inversée infecté par *S. Typhimurium* avec en rouge l'actine-F et en vert la bactérie, l'échelle est de 10 μm .



Les organoïdes gastriques d'ovins montrent donc une organisation et une diversité cellulaire proche des tissus originels et montrent même une sensibilité à l'infection par des pathogènes. Ceux-ci semblent donc être un modèle accessible et plutôt robuste pour l'étude des interactions hôtes-pathogène.

Une étude similaire a été conduite chez les bovins (Faber *et al.*, 2022). Les organoïdes produits montrent une morphologie cystique avec une lumière centrale avec parfois des bourgeonnements qui partagent cette lumière. Les analyses immunohistochimiques montrent également la présence de marqueurs spécifiques de l'abomasum bovin (EpCAM et pan-cytokératine). L'organisation polarisée est également attestée par la mise en évidence de l'actine-F du côté luminal des organoïdes. La prolifération cellulaire est, quant à elle, soulignée par la présence abondante du marqueur Ki67. L'histologie montre, par ailleurs, la présence d'une glycocalyx ou d'une fine couche de mucus en face luminale des organoïdes ainsi que la présence de multiples types cellulaires. L'analyse du transcriptome de ces organoïdes montre une grande similarité avec le tissu originel. Ces organoïdes montrent également une capacité à être infesté par un nématode (*Ostertagia ostertagi*) (figure 12). Cette infestation provoque, par ailleurs, des changements morphologiques. Les organoïdes infestés augmentent très rapidement (en 30 à 60 min après infestation) en taille (doublent de taille), ce qui n'est pas le cas avec des parasites tués par la chaleur. Des modifications à l'échelle cellulaire sont aussi observées (noyaux plus espacés, perte de l'orientation du marqueur de l'actine F).

Figure 12 : infestation d'abomasum bovin et d'organoïdes abomasaux bovins et par *O. ostertagi* après 24 h, d'après Faber *et al.* (2022). (A) Coloration à l'hémalum-éosine d'une coupe de glande gastrique bovine 21 j après l'infection par le parasite, la tête de flèche indique le pôle apical de l'épithélium, l'échelle est de 25 µm. (B) Coloration à l'hémalum-éosine d'une coupe d'organoïde abomasal bovin avec une larve du parasite, la tête de flèche indique le pôle apical de l'épithélium de l'organoïde, l'échelle est de 25 µm. (C) Image d'immunofluorescence d'un organoïde abomasal bovin avec une unique larve du parasite, en bleu les noyaux, en vert le F-actine et en rouge le vers, échelle : 50 µm.

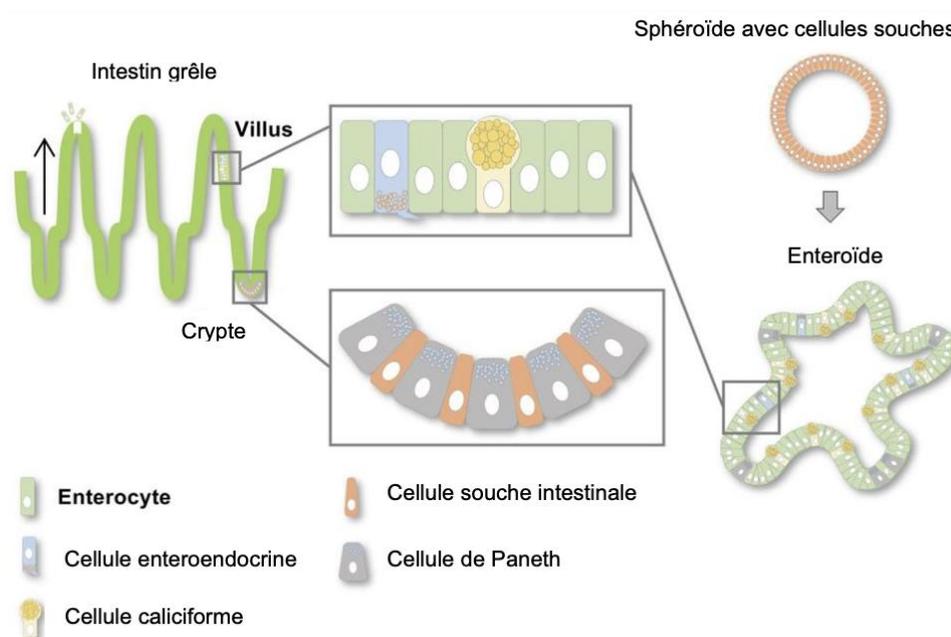


Les organoïdes d'abomasum d'ovin et de bovin montrent une grande similarité tant sur le plan morphologique que sur le plan du transcriptome avec le tissu originel. Leur utilisation comme modèle dans le cadre de la parasitologie ou de la bactériologie est, par ailleurs, très encourageant. Des études supplémentaires concernant la préservation de la fonction du tissu en leur sein restent à être conduites afin d'élargir leur utilisation dans d'autres champs de recherche.

iii. Les organoïdes de l'intestin grêle

L'intestin grêle est sûrement l'organe qui a le plus bénéficié d'études en relation avec les organoïdes chez les animaux de compagnie et de production. L'antériorité de la découverte des organoïdes de l'intestin grêle (encore appelés entéroïdes) par Sato *et al.* (2009) en 2009 en est sûrement l'une des causes. La [figure 13](#) rappelle la composition cellulaire et la structure de l'intestin grêle en la comparant avec celle des organoïdes

Figure 13 : schéma des différents types de cellules épithéliales dans l'intestin grêle, d'après Kardia *et al.* (2020).

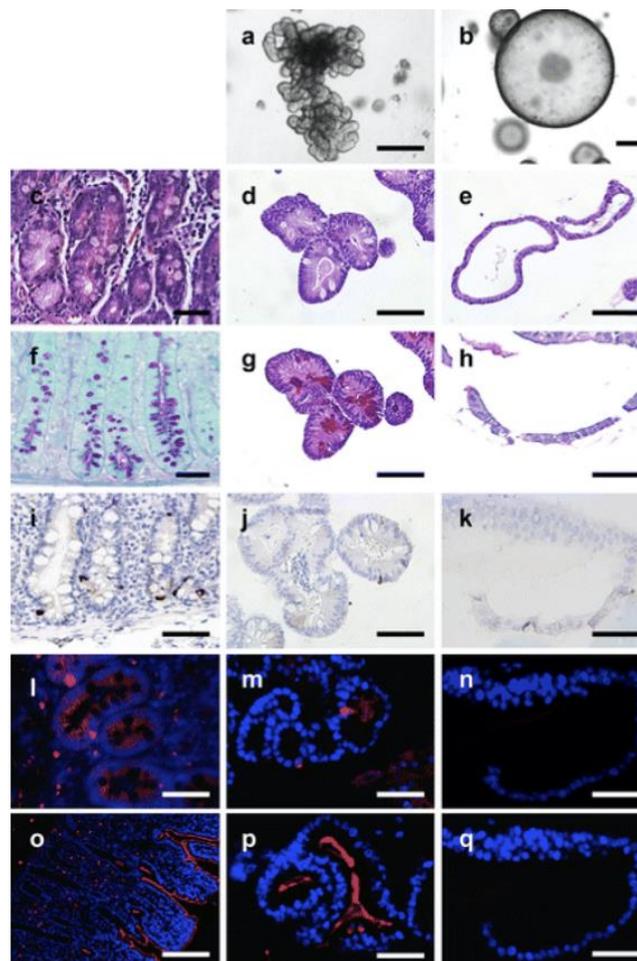


De toutes les espèces étudiées dans la présente thèse, c'est sûrement chez le porc que la technologie des entéroïdes s'est le plus développée. Les équipes de Gonzalez *et al.* (2013) et Khalil *et al.* (2016) démontrent la grande similarité histologique des entéroïdes de porc avec le tissu intestinal duquel il est issu. Que ce soit en terme de morphologie avec une organisation en crypte qu'en terme de composition cellulaire en montrant la présence de cellules progénitrices, de cellules caliciformes, de cellules enteroendocrines, d'entérocytes et même de cellules de Paneth pour l'équipe de Khalil *et al.* (2016). Cette

équipe confirme, par ailleurs, la présence d'une bordure en brosse et l'organisation polaire des entéroïdes tout comme celle de Derricott *et al.* (2019). Les seules cellules manquantes sont celles de l'immunité. Ainsi, les entéroïdes semblent beaucoup se rapprocher du tissu originel d'un point de vu histologique (figure 14).

Figure 14 : comparaison entre entéroïde, sphéroïde et intestin de porc, d'après Khalil *et al.*

(2016). Caractérisation des entéroïdes de porc (colonne du milieu), de sphéroïdes de porc (colonne de droite) en comparaison à du jéjunum porcin (colonne de gauche) : par microscopie sur fond clair (première ligne), après coloration à l'hémalun-éosine (deuxième ligne), après coloration à l'acide périodique de Schiff (troisième ligne), par immunofluorescence de la chromogranine A (quatrième ligne), par immunofluorescence de la lysozyme (cinquième ligne) et par immunofluorescence du CD10 (sixième ligne). Sur les deux dernières lignes, les noyaux sont colorés avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les barres d'échelle sont de 200 µm pour la première ligne, 50 µm pour le reste des lignes.



L'équipe de Khalil *et al.* (2016) confirme la composition cellulaire des organoïdes porcins notamment à l'aide de marqueurs transcriptomiques. Ce transcriptome est plus largement étudié par van der Hee *et al.* (2020) qui montre que celui des entéroïdes est plus proche du tissu originel que celui de la lignée cellulaire jéjunale porcine IPEC-J2. Par ailleurs, ils démontrent la stabilité de ce transcriptome dans le temps (après 17 passages). Une grande partie de la différence entre le transcriptome des entéroïdes et celui du tissu originel s'explique par l'absence de cellules immunitaires et donc de leur expression génétique. La transcriptomique confirme donc l'analyse histologique et immunohistologique.

Les entéroïdes semblent donc être un modèle *in vitro* convenable et stable du tissu intestinal chez l'espèce porcine.

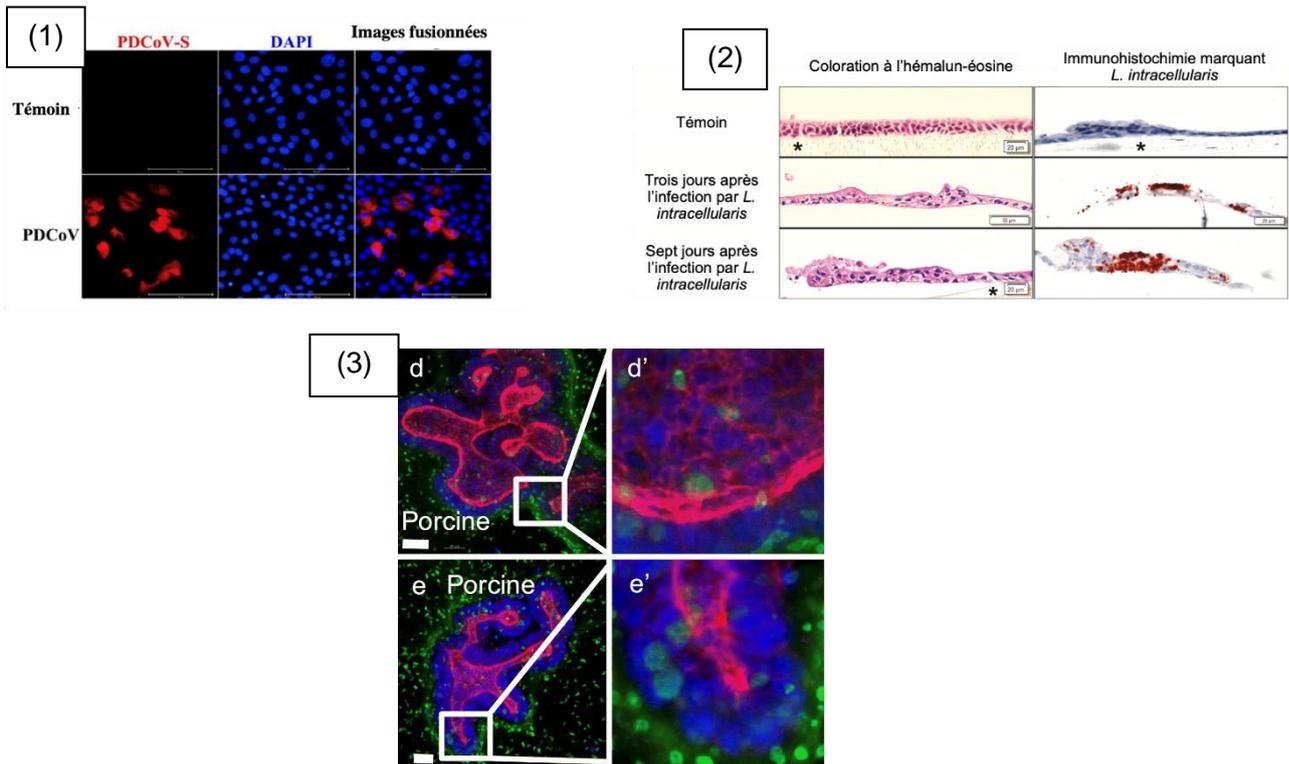
Une fois ce constat établi, plusieurs équipes ont cherché à montrer que ces organoïdes pouvaient servir de modèle en infectiologie. Dans ce cadre, avoir accès facilement au pôle apical des organoïdes est capital puisque c'est bien souvent par cette face que l'infection a lieu *in vivo*. C'est pourquoi un certain nombre d'équipes ont développé des techniques pour inverser la polarité des entéroïdes (Yang Li *et al.*, 2020) ou encore de les replacer en deux dimensions (van der Hee *et al.*, 2018, 2020). L'équipe de Luo *et al.* (2020) a donc montré sur un modèle d'entéroïdes en 2D que leur infection par le delta coronavirus responsable de diarrhée chez le porc (PDCoV), était possible ([figure 15](#)). De plus, ils montrent que cette infection a davantage lieu dans les cellules exprimant SOX9 et Villine-1 et que des modifications transcriptionnelles ont alors lieu, surtout sur des gènes liés à l'immunité des muqueuses, des gènes antiviraux mais aussi ceux exprimés par les cellules souches. L'équipe de Yin *et al.* (2020) montre avec le même virus, qu'il infectait préférentiellement les organoïdes jéjunaux et iléaux par rapport aux organoïdes duodénaux ou coliques, ce qui correspond à ce qui est connu actuellement *in vivo*. Un autre coronavirus a aussi été étudié par Li *et al.* (2019), le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) qui montre une infection de différents types cellulaires (entérocytes, cellules souches, cellules caliciformes), une plus grande susceptibilité de l'iléon par rapport au colon et une suppression de la réponse interféron (IFN) ce qui montre, là aussi, des similarités avec les études *in vivo*. De plus, cette équipe étudie la réponse aux IFN- λ 1 et α et montre des résultats similaires à la lignée cellulaire IPEC-J2. L'équipe de Li *et al.* (2020), s'est, quant à elle, penchée sur le virus de la gastro-entérite transmissible porcine et montre que les organoïdes dont la polarité est inversée, sont bien susceptibles au virus, contrairement aux organoïdes normaux. Ces études tendent à montrer non seulement que l'infection des entéroïdes de porc par des virus est possible et proche de ce qui se produit *in vivo* mais aussi que les conséquences physiopathologiques sont les mêmes au niveau cellulaire. Ainsi, les organoïdes sembleraient être de bons modèles dans l'étude des infections virales intestinales, de la réponse de l'épithélium à celles-ci ainsi que pour la recherche d'un traitement.

Toujours en infectiologie et dès 2016, une équipe se penche sur l'effet d'un contact du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives sur la localisation du *toll-like receptor* (TLR) 4 au sein d'entéroïdes de porc (Koltes et Gabler, 2016). Ils montrent alors que ce récepteur participant à l'immunité innée, était davantage internalisé dans les endosomes des entéroïdes ayant été au contact du LPS que des entéroïdes naïfs. Depuis, d'autres études tournées vers la bactériologie ont été conduites. Derricott *et al.* (2019) ont montré que les entéroïdes de porc étaient susceptibles à *Salmonella enterica* Typhimurium. Ces mêmes entéroïdes semblent très prometteurs quant à l'étude de l'infection par *Lawsonia intracellularis* (agent de diarrhée porcine) (Resende *et al.*, 2020). En effet, des organoïdes replacés en culture bidimensionnelle se sont montrés capables d'être infectés par le pathogène, ce dernier étant retrouvé dans le cytoplasme cellulaire par immunohistochimie ([figure 15](#)).

Enfin, un pas dans la parasitologie a été réalisé par l'équipe de Derricott *et al.* (2019) qui montre que les entéroïdes porcins sont aussi susceptibles à l'infestation par *Toxoplasma gondii* ([figure 15](#)).

Figure 15 : mise en évidence de l'infection et de l'infestation de différents pathogènes au sein d'entéroïdes de porc.

(1) Détection du PDCoV au sein d'organoïdes iléaux de porc par immunofluorescence. Les organoïdes replacés en culture bidimensionnelle ont été infectés avec le virus à une multiplicité d'infection de 2 sur 24 h puis fixés dans du paraformaldehyde à 4 % puis la présence du virus est soulignée avec l'utilisation d'un anticorps monoclonal murin dirigé contre la protéine S du virus (en rouge). D'après Yin *et al.* (2020). (2) Coupes transversales de cultures bidimensionnelles d'entéroïdes de porcs infectés ou non par *L. intracellularis*, d'après Resende *et al.* (2020). (3) Immunofluorescence d'entéroïdes porcins infectés à une dose de 1.10^6 de *T. gondii*. L'antigène de surface 1 du parasite (vert), l'actine-F (rouge) et les noyaux (bleu) sont montrés. L'image d et son agrandissement montrent les parasites présents dans la zone luminale. Les images e et e' montrent les parasites en rosette soulignant que leur réplication a lieu. L'échelle est de 20 μ m. D'après Derricott *et al.* (2019).

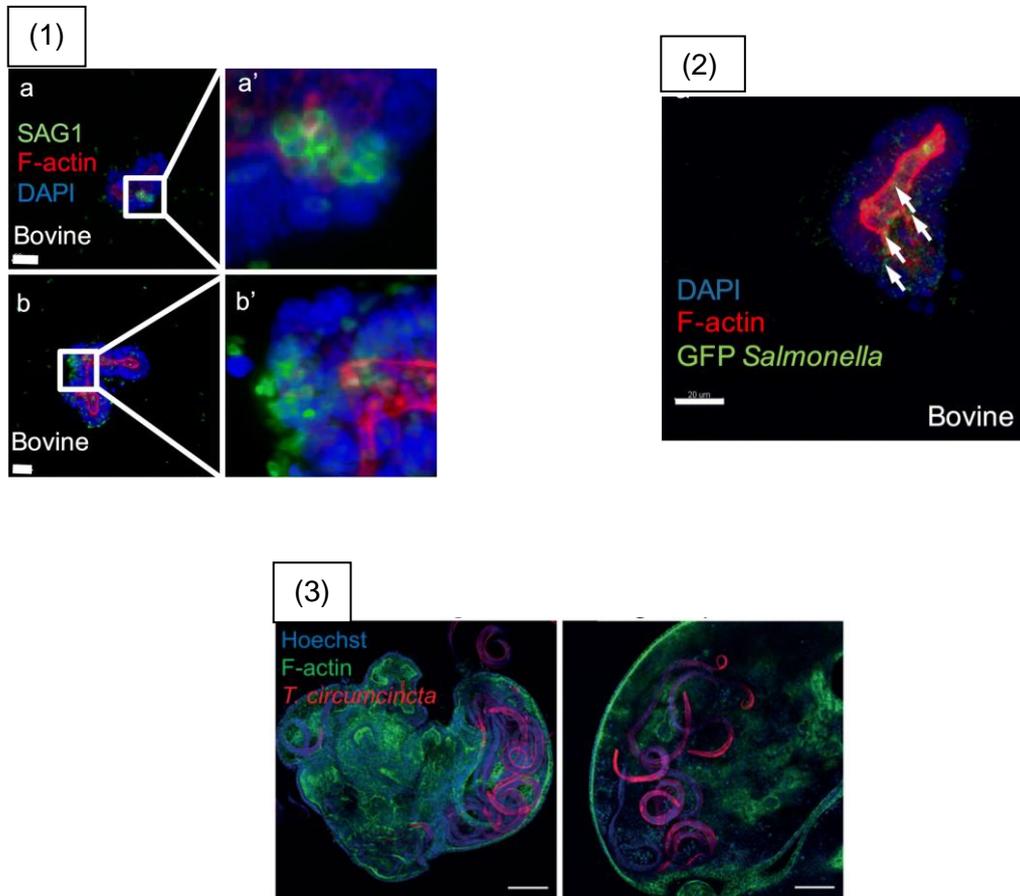


Enfin, après l'infectiologie, les entéroïdes de porc peuvent aussi être des modèles performants en ce qui concerne l'étude de certaines affections. L'équipe de Engevik *et al.* (2020) a produit des porcelets à partir de cellules souches induites transgéniques (ajout d'une substitution dans le gène porcin codant pour la protéine myosine Vb (MYO5B) qui provoque la maladie à inclusion microvillositaire). Cette maladie provoque une diarrhée chez le porc. L'équipe a ensuite produit des organoïdes à partir des individus mutés. Ils ont, alors, comparé les résultats trouvés avec le tissu prélevé *in vivo* à ceux trouvés avec les organoïdes. Ils montrent alors une franche similarité. Les organoïdes mutés montrent par immunomarquage, de la même manière que les tissus vivants, une bordure en brosse peu développée avec une mauvaise localisation du groupe de protéines ezrine, radixine et moésine phosphorylées ainsi que des inclusions subapicales comme *in vivo*. Le canal excréteur de chlore *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) est aussi activé. Les entéroïdes semblent donc aussi être un bon modèle pour étudier les affections intestinales d'origine génétique.

Les organoïdes de poulets montrent également un certain essor dans la littérature. Dès 2012, l'équipe de Pierzchalska *et al.* (2012) réussit à produire des entéroïdes à partir d'intestin d'embryons de poulet. Ces organoïdes prennent la forme de vésicules avec peu de bourgeonnement dont les cellules expriment des marqueurs spécifiques épithéliaux (cytokératine), des entérocytes (villine) et de cellules souches (SOX9). Plus tard, Pierzchalska *et al.* (2019) proposent un nouveau protocole de production d'organoïdes et montre la présence de myofibroblastes autour des organoïdes et de fibroblastes en leur sein. En 2018, l'équipe de Li *et al.* (2018) réalise des organoïdes issus de tissus intestinaux adultes. Ils réalisent alors un cliché microscopique par transmission montrant très clairement la présence d'une bordure en brosse et une organisation semblable aux cryptes observées *in vivo*. De plus, ils montrent que l'exposition à un inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3 β provoque une modification d'expression des gènes et notamment des gènes liés aux cellules souches, montrant que la fonction de l'organe est respectée. Alors que le protocole est toujours plus raffiné, Oost *et al.* (2022) montrent très clairement la présence de cellules souches, de cellules enteroendocrines, de cellules caliciformes à mucus ainsi que d'ultrastructures comme les jonctions serrées ou les filaments d'actine. Les équipes de Pierzchalska *et al.* (2017) et d'Acharya *et al.* (2020) permettent d'assoir la composition cellulaire des organoïdes intestinaux de poulet en démontrant la présence d'entérocytes, de cellules caliciformes, de cellules *enterochromaffin-like*, de cellules *Paneth-like* et de myofibroblastes. La composition cellulaire des organoïdes intestinaux de poulet semble donc se rapprocher de celle du tissu *in vivo* mais des études sur leur fonction doivent encore être menées pour les ériger comme modèle fiable.

Chez les autres espèces de rente (bovin, mouton) les études sont plus éparpillées. Powell et Behnke (2017) montrent dès 2017 que la formation d'entéroïdes de bovin et de mouton est possible, avec une structure crypte-villus. Deux autres équipes se penchent davantage sur les bovins et décrivent plus finement les organoïdes produits (Derricott *et al.*, 2019 ; Hamilton *et al.*, 2018). Ils confirment la morphologie organisée en cryptes et villi avec une organisation polarisée et une bordure en brosse. Une analyse du transcriptome des organoïdes montre, par ailleurs, qu'il est stable au fur et mesure des passages. L'équipe de Derricott *et al.* (2019) montre de plus, que les entéroïdes bovins sont sensibles à l'infection par *T. gondii* et *S. enterica* Typhimurium (figure 16). De plus Smith *et al.* (2021) et Faber *et al.* (2022) montrent également la possibilité d'utiliser les organoïdes d'iléum de bovin et d'ovin comme modèle en infectiologie en montrant que les premiers peuvent être infestés par *O. ostertagi* et les seconds par *T. circumcincta* et infectés par *S. Typhimurium* (figure 16). Les entéroïdes de ruminants montrent donc des similarités dans leur architecture et leur composition cellulaire avec les tissus *in vivo* ainsi qu'une capacité à être infectés par des agents pathogènes.

Figure 16 : mise en évidence de différents pathogènes au sein d'organoïdes intestinaux de bovin et d'ovin par immunofluorescence. (1) Immunofluorescence d'entéroïdes bovin infectés à une dose de 1.10^6 de *T. gondii*. L'antigène de surface 1 du parasite (vert), l'actine-F (rouge) et les noyaux (bleu) sont montrés. L'image a et son agrandissement a' montrent les parasites présents dans la zone luminale. Les images b et b' montrent les parasites en rosette soulignant que leur réplication a lieu. L'échelle est de 20 μ m. D'après Derricott *et al.* (2019). (2) Immunofluorescence d'entéroïdes bovins après 45 min de mise en culture avec 1.10^7 *S. Typhimurium* (flèches blanches), échelle 30 μ m. La bactérie est montrée en vert, les noyaux en bleu et la surface apicale en rouge. D'après Derricott *et al.* (2019). (3) Immunofluorescence d'une infestation par *T. circumcincta* d'organoïdes iléaux de moutons, les noyaux sont montrés en bleu, le pôle apical en vert et le parasite en rouge, échelle 10 μ m, d'après Smith *et al.* (2021).

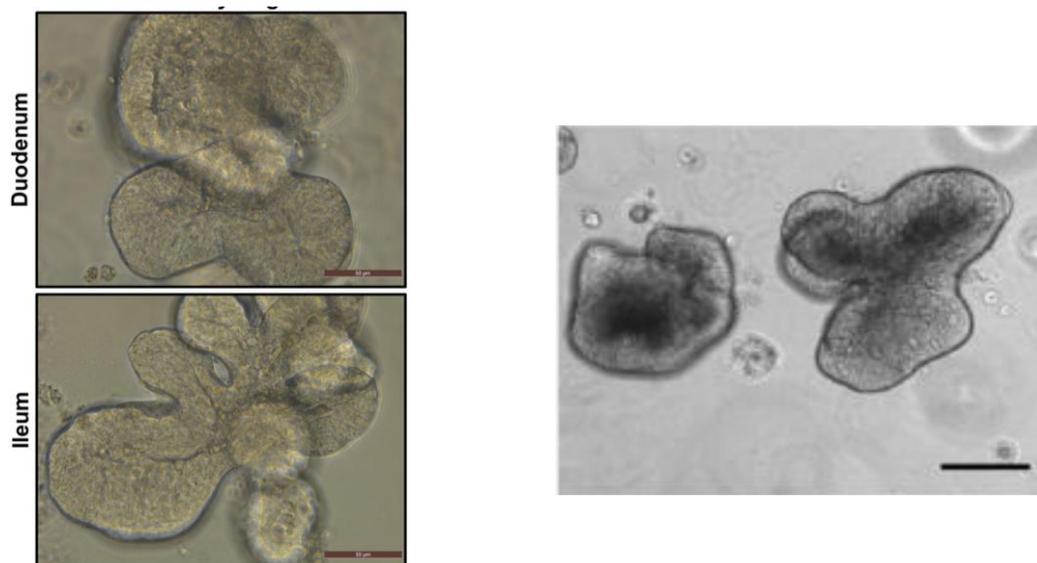


Chez le lapin, il faut attendre 2021 pour qu'une équipe se penche sur la formation d'entéroïdes. Kardia *et al.* (2021) établissent un protocole et développent des organoïdes intestinaux. Ils montrent que les sphéroïdes peuvent évoluer en organoïdes au détriment de leurs cellules souches tout en gagnant une diversité de types cellulaires (entérocytes, cellules caliciformes à mucus, cellules enteroendocrines). De plus, cette équipe montre que le passage des sphéroïdes en 2D permet d'obtenir une diversité cellulaire similaire. La population cellulaire des organoïdes produits se rapproche de celle des tissus *in vivo*. Il convient néanmoins de conduire davantage d'études pour ériger ces organoïdes en véritable modèle.

Il existe, pour l'heure, relativement peu d'études chez les carnivores domestiques. Un premier groupe de chercheurs montre en 2017 que les protocoles en cours à l'époque permettent de produire des organoïdes intestinaux de chien et de chat (Powell et Behnke, 2017). La morphologie des organoïdes de chien est davantage étudiée par l'équipe de

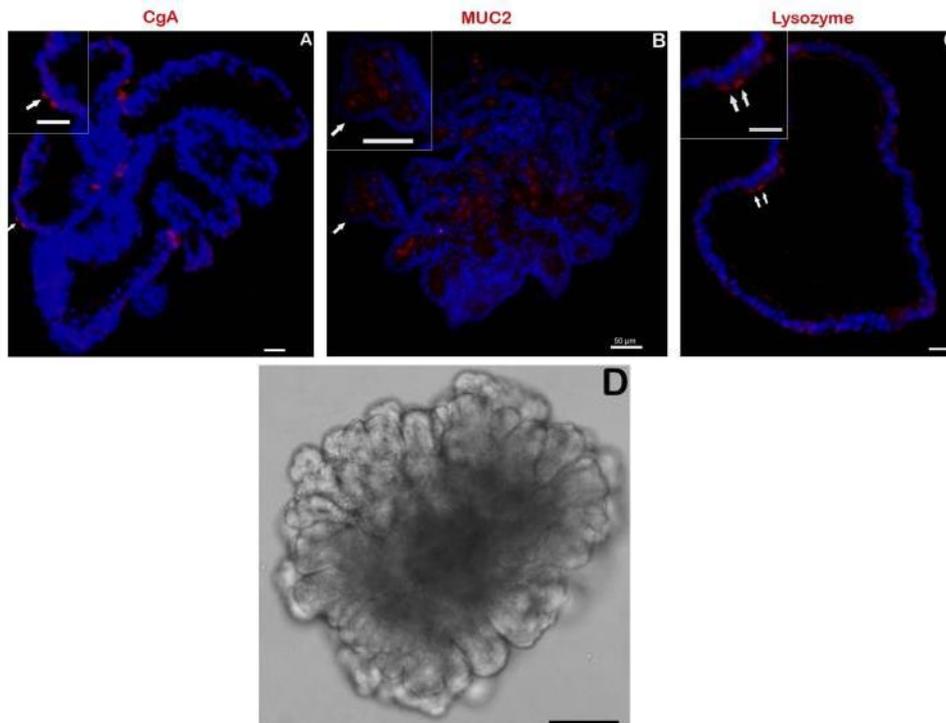
Chandra *et al.* (2019) qui montrent un développement en structure crypte-villus (figure 17). L'exploitation de la microscopie électronique à transmission a permis d'identifier des cellules épithéliales, des cellules caliciformes à mucus, des cellules neuroendocrines ainsi que la présence d'une bordure en brosse sur le pôle apical. De plus, la microscopie confirme la présence de jonctions serrées, de zone d'adhérence et de desmosomes. Les différents types cellulaires décelés en microscopie sont confirmés par immunohistochimie. Par ailleurs, il a été démontré la présence de canaux à chlore CFTR et la capacité d'internalisation d'exosomes. Ainsi, les organoïdes de chien semblent bien modéliser la diversité cellulaire de l'épithélium digestif et semble aussi fonctionnellement s'en rapprocher. Chez le chat (figure 17), Tekes *et al.* (2020) montrent la présence de cellules souches, de cellules caliciformes, d'entérocytes, de cellules enteroendocrines et de cellules de Paneth grâce à l'immunofluorescence. Au sein de l'espèce féline, bien que la diversité cellulaire des intestins semble respectée dans les organoïdes, il manque de tests fonctionnels afin de décrire de façon plus complète ce modèle.

Figure 17 : organoïdes intestinaux de chien et de chat. A gauche, images de microscopie à fond clair d'entéroïdes de duodénum et d'iléum de chien de 5-7 jours, échelle 50 µm, d'après Chandra *et al.* (2019). A droite, images de microscopie sur fond clair d'entéroïdes d'iléum de chat de 12 jours, échelle 100 µm, d'après Tekes *et al.* (2020).



Chez le cheval, l'équipe de Stewart *et al.* (2018) montre la présence d'entérocytes, de cellules caliciformes à mucus, neuroendocrines et de Paneth par immunohistochimie ainsi que des cellules souches par immunofluorescence (figure 18). Les entéroïdes équin semblent donc partager la même diversité cellulaire que l'épithélium *in vivo*.

Figure 18 : entéroïdes équins, d'après Stewart *et al.* (2018). (A) Image d'immunofluorescence du marqueur spécifiques des cellules entéroendocrines (chromogranine-A (CgA) en rouge), noyaux en bleu, échelle 20 μm . (B) Image d'immunofluorescence du marqueur spécifiques des cellules à mucus (mucine 2 (MUC2) en rouge), noyaux en bleu, échelle 50 μm . (C) Image d'immunofluorescence du marqueur spécifiques des cellules de Paneth (lysozyme, en rouge), noyaux en bleu, échelle 20 μm . (D) Images en microscopie sur fond clair d'un entéroïde équin après trois jours de culture, échelle 100 μm .



Les études conduites dans le champ des entéroïdes soulignent donc leurs similitudes avec le tissu intestinal *in vivo*. Structuellement, ces derniers ont une organisation en crypte et villus et une diversité cellulaire très proche (bien qu'uniquement épithéliale). Certaines de ces études laissent à penser que ces entéroïdes sont aussi très proches fonctionnellement des tissus *in vivo*, ce qui est très encourageant pour leur utilisation comme modèle à bien des égards (physiologie, toxicologie, infectiologie...) et ce qui permettrait, par la même, une réduction du besoin d'animaux de laboratoire.

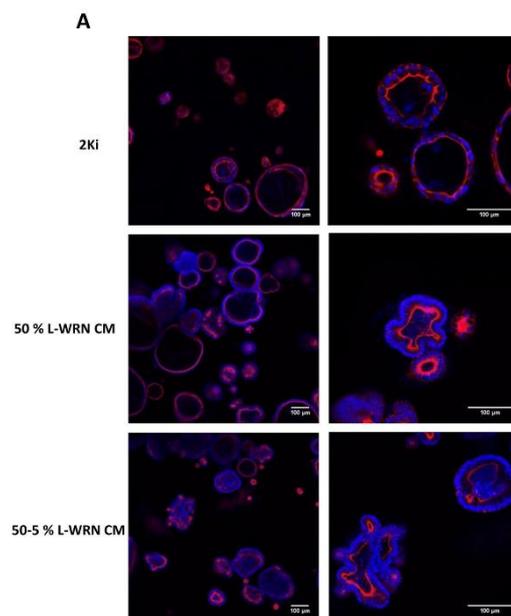
iv. Les organoïdes de caecum, colon et rectum

Au sein des espèces de compagnie et de production étudiées dans ce travail, seul le lapin a bénéficié d'organoïdes de caecum (figure 19). L'équipe de Mussard *et al.* (2020) propose différents milieux de culture qui aboutissent à différentes morphologies d'organoïdes caecaux (appelés caecaloides). Les organoïdes en forme de sphère sont qualifiés d'immatures car ils semblent posséder une plus grande part de cellules souches alors que ceux avec des replis et bourgeonnements possèdent une diversité cellulaire plus importante avec moins de cellules souches. L'équipe de Beaumont *et al.* (2020) s'intéresse aux interactions des organoïdes avec le microbiote intestinal. En mettant en contact des organoïdes de caecum de lapin avec le surnageant stérilisé d'extrait de caecum de lapins

nourris avec soit de la nourriture uniquement liquide, ou soit uniquement solide, ils montrent que les changements opérés au sein des caecaloïdes sont similaires à ceux observés *in vivo*. Néanmoins, quelques modifications de l'expression génétique présentes *in vivo* n'étaient pas présentes chez ces caecaloïdes. Les auteurs émettent l'hypothèse de l'absence d'un facteur influençant celles-ci dans le surnageant. Les organoïdes de caecum de lapin semblent donc proches structurellement des tissus *in vivo* mais des études plus complètes restent à conduire quant à leurs similarités fonctionnelles.

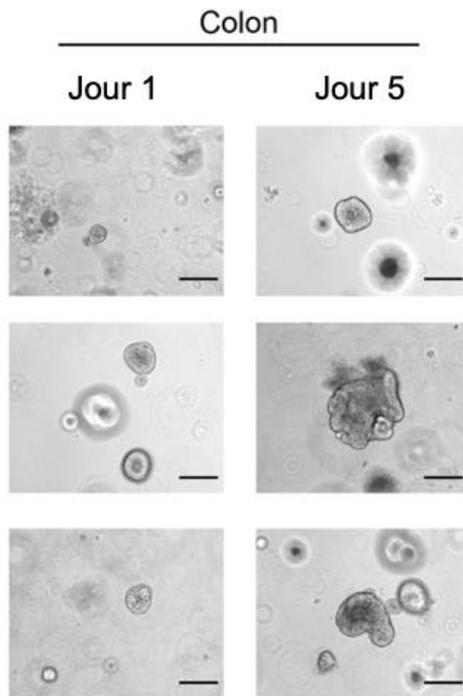
Figure 19 : polarisation des organoïdes de caecum de lapin mis en culture avec différents milieux de cultures (2Ki ou L-WRN). Images d'immunofluorescence montrant l'actine (rouge) et les noyaux (bleus).

D'après Mussard *et al.* (2020).



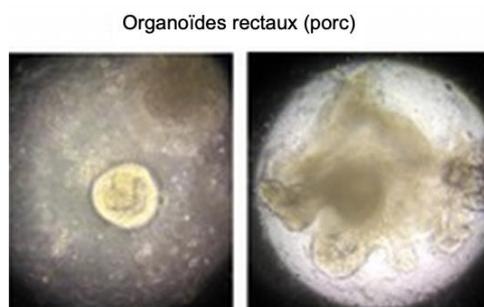
Pour ce qui est du colon, les organoïdes formés se nomment colonoïdes ([figure 20](#)). L'équipe de Töpfer *et al.* (2019) propose un protocole chez le bovin et montre la présence de cellules souches, de cellules enteroendocrines, de cellules à mucus et de cellules épithéliales du colon. Chez le chat, Tekes *et al.* (2020) montrent la présence des mêmes cellules.

Figure 20 : images de microscopie sur fond clair de colonoïdes de chat. Echelle 100 µm.
D'après Tekes *et al.* (2020).



Enfin, l'équipe Adegbola *et al.* (2017) s'est penchée sur la toute fin du tube digestif chez le porc et a réussi à développer des organoïdes de rectum ([figure 21](#)) mais a échoué à réaliser une culture tridimensionnelle de la zone de transition ano-rectale et de l'anus.

Figure 21 : organoïdes rectaux chez le porc, d'après Adegbola *et al.* (2017).



Les organoïdes du gros intestin sont encore peu développés en médecine vétérinaire. Néanmoins, ils montrent des résultats très encourageant, notamment chez les espèces avec un caecum et un colon développés (comme le lapin).

b. Les organoïdes des glandes digestives annexes

i. Les organoïdes de glande salivaire

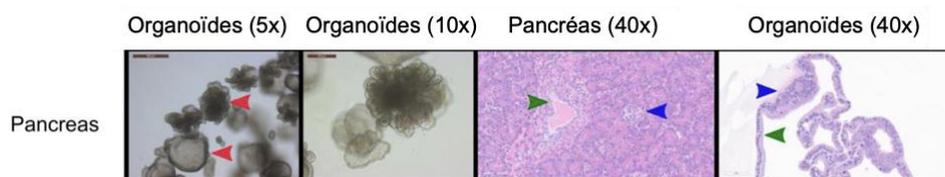
Bien que des organoïdes de glandes salivaires aient été produits chez la souris et l'humain (Yoon *et al.*, 2022), ce n'est, pour l'instant, pas le cas chez les espèces étudiées dans ce travail. Néanmoins, ces organoïdes sont porteurs d'un grand espoir dans le cadre de la médecine régénérative et dans l'étude des tumeurs des glandes salivaires.

ii. Les organoïdes de pancréas exocrine

Pereira (2020) montre la possibilité de produire des organoïdes ductaux du pancréas canin (figure 22) et montre la présence de marqueurs de cellules progénitrices pancréatiques (récepteur 5 couplé à la protéine G contenant des répétitions riches en leucine (LGR5), SOX9, aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1 (ALDH1H1) et neurogénine 3 (NGN3)). Zdyrski *et al.* (2022) annoncent, dans un manuscrit non validé par les pairs, avoir produit également des organoïdes de pancréas, de morphologie similaire à Pereira (2020), c'est-à-dire cystiques ou en forme de fleurette. Par ailleurs, ils ajoutent une analyse histologique qui rapproche les cellules de cellules ductales, ce qui est confirmé par la présence d'un marqueur des cellules épithéliales pancréatiques (cytokératine 7). Ils identifient aussi les marqueurs des cellules progénitrices pancréatiques (protéine NKX6-1). Ils ajoutent que les organoïdes ne produisent ni insuline, ni glucagon (comme le sous-entend déjà Pereira (2020)), le milieu de culture semble donc très sélectif du pancréas exocrine.

Figure 22 : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes de pancréas, d'après Zdyrski *et al.* (2022).

Les têtes de flèche rouges correspondent une morphologie spécifique de l'organoïde pancréatique alors que les têtes de flèches bleues et vertes montrent des similarités histologiques entre le tissu initial et les organoïdes. L'échelle est de 500 µm pour le grossissement 5x, 200 µm pour le grossissement 10x et 60 µm pour les grossissements 40x.



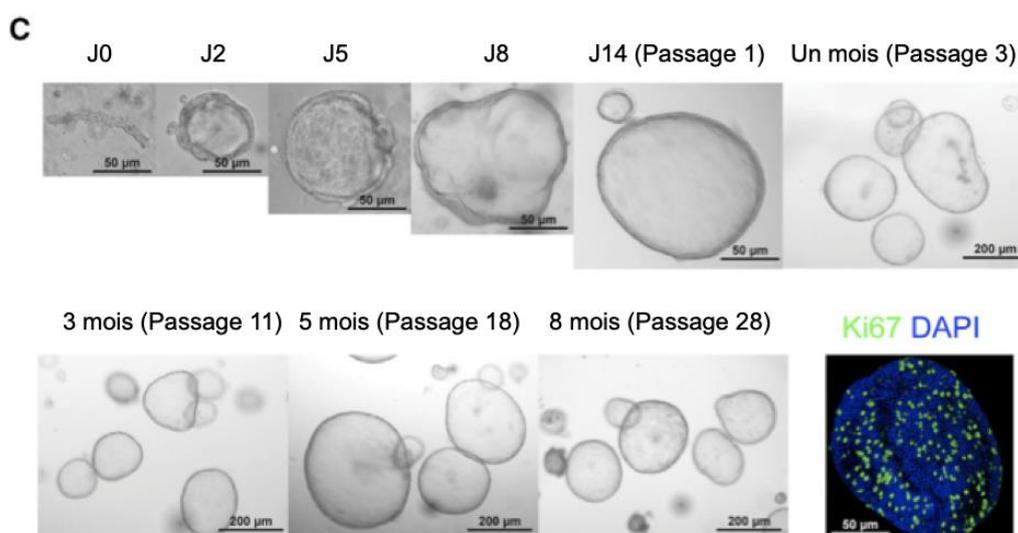
Il est, par ailleurs, important de noter que depuis 2021 un consensus a été établi concernant la classification des organoïdes pancréatiques, hépatiques et biliaires (Marsee *et al.*, 2021). Celui-ci a pour vocation de simplifier la terminologie les concernant et donc de faciliter leur étude.

Les organoïdes pancréatiques sont donc encore peu développés chez les animaux de compagnie et de production et se limitent aux chiens.

iii. Les organoïdes hépatiques

Dès 2014, l'équipe de Schotanus *et al.* (2014) informe avoir développé des organoïdes hépatiques de chien. Un an plus tard, l'équipe de Nantasanti *et al.* (2015) identifie que seules les cellules des voies biliaires sont encore viables après une semaine de culture avec leur milieu d'expansion. Les organoïdes formés ont une morphologie cystique (figure 23). L'immunohistochimie montre la présence de marqueurs des cellules souches et des cholangiocytes (SOX9, cytokératines 7 et 19 et facteur 1 β nucléaire des hépatocytes (HNF1 β)). Après changement de milieu de culture afin de différencier les organoïdes, ceux-ci produisent les enzymes aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT) et de l'albumine. Par ailleurs, le cytochrome p450 (impliqué dans la fonction de métabolisation du foie) semble actif ce qui indique qu'une partie de la fonction du foie est préservée. Par ailleurs, cette équipe montre qu'un organoïde de foie isolé d'un sujet canin muté de manière autosomale pour le gène du domaine contenant 1 du métabolisme cuprique (COMMD1) le rendant inactif et induisant une anomalie de stockage du cuivre, provoque aussi une augmentation du stockage du cuivre dans les organoïdes. L'équipe de Kruitwagen *et al.* (2017) reprend le même milieu et l'utilise sur le chat. Ils montrent que les organoïdes formés sont stables génétiquement à travers les passages et ont la même morphologie, composition cellulaire et expression génétique que ceux du chien. Néanmoins une différenciation complète n'a pas encore été observée. Les organoïdes de chat stockent davantage les lipides sous forme d'inclusion cytoplasmiques. Par ailleurs, des agents extérieurs (etomoxir, L-carnitine) modulent le métabolisme lipidique. Les organoïdes hépatiques de carnivores domestiques sont donc très prometteurs car ils semblent fonctionnellement proches de l'organe et permettent même modéliser des maladies génétiques (comme celle citée plus haut).

Figure 23 : images de microscopie à fond clair de fragment des voies biliaires et des organoïdes hépatiques canins en croissance d'après Nantasanti *et al.* (2015). L'image en bas à droite correspond à l'immunofluorescence des marqueurs Ki67 (prolifération, en vert) et DAPI (noyaux, en bleu).



Très récemment, des organoïdes de foie de lapin ont été développés par Kardia *et al.* (2022) en utilisant un milieu de culture utilisé pour les organoïdes hépatiques humains. L'équipe révèle que des marqueurs des cholangiocytes (cytokératine-19), des cellules épithéliales (CD44) et des hépatocytes matures (albumine) sont bien exprimés au sein des organoïdes hépatiques. Ces hépatocytes sont ensuite mis en contact avec les virus de la diarrhée hémorragique du lapin (RHDV1 et 2). La réplication des virus est alors observée ce qui ajoute un nouveau mode de culture et de réplication de ces types de virus.

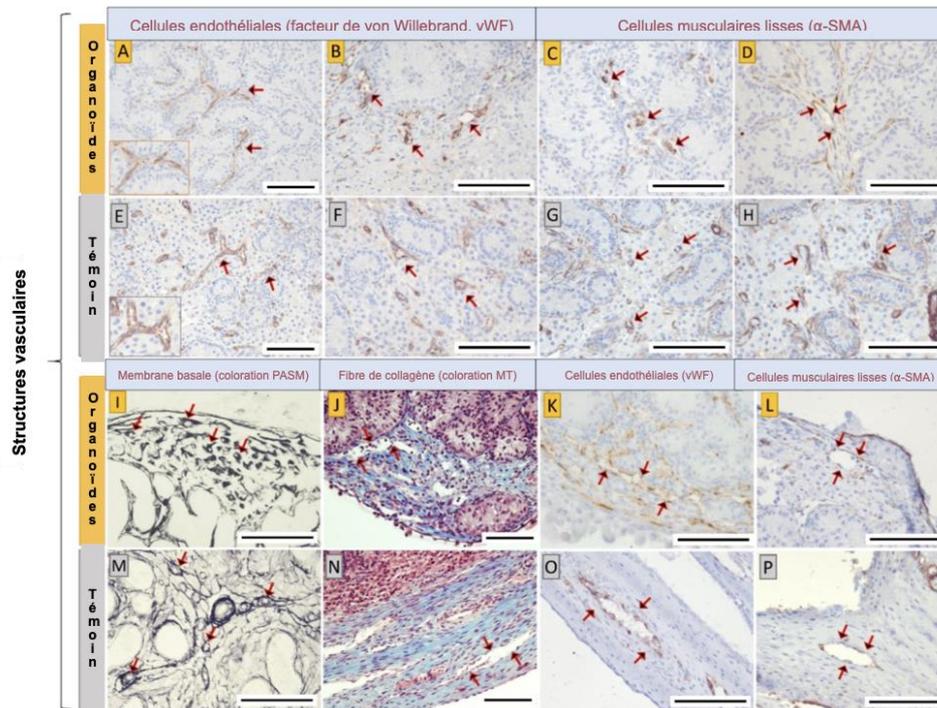
Les organoïdes hépatiques des carnivores domestiques sont en plein essor et montrent à la fois des similarités morphologiques avec une diversité cellulaire semblable au foie mais aussi une fonction hépatique au moins en partie préservée (avec la présence des enzymes ALAT et ASAT ainsi que du cytochrome p450). Ces études montrent la voie pour le développement d'organoïdes hépatiques dans d'autres espèces.

B. Les organoïdes de l'appareil hémato-lymphopoiétique

a. Les organoïdes de l'appareil cardio-vasculaire

Il n'existe, pour l'heure, aucune étude décrivant l'élaboration d'organoïdes de cœur ou de vaisseaux sanguins et lymphatiques chez les animaux étudiés dans la présente thèse, bien que des essais prometteurs aient été conduits chez l'humain (Wimmer *et al.*, 2019). L'équipe de Cham *et al.* (2021) a, néanmoins, identifié des ébauches vasculaires au sein d'organoïdes testiculaires de porc ([figure 24](#)).

Figure 24 : mise en évidence de structures vasculaires au sein d'organoïdes testiculaires de porc, d'après Cham *et al.* (2021). Coloration spécifique et immunohistochimie pour les cellules endothéliales (facteur de von Willebrand) et musculaires lisses (actine α des muscles lisses, α -SMA) dans le but de détecter les structures vasculaires au sein des organoïdes testiculaires et les testicules intacts de porcelets d'une semaine (témoin). (A, B) Structures microvasculaires dans l'interstitium inter-tubulaire au sein des organoïdes, structures échafaudées par des cellules vasculaires endothéliales. L'encart en (A) montre des ramifications des structures microvasculaires parfois observées dans l'interstitium. (C, D, I) Structures microvasculaires contenant des cellules musculaires lisses (C, D) et une membrane basale perivasculaire (I). (J-L) Des structures ressemblant aux sinusoides ont été observées dans la capsule périphérique des organoïdes, structures qui étaient aussi supportées par des cellules vasculaires endothéliales (K) et musculaires lisses (L). (E-H, M-P) Images de testicules intacts avec les colorations et l'immunohistochimie correspondantes. Coloration PASM : acide Periodique-Schiff-methanamine, coloration MT : coloration trichrome de Masson. Échelle : 100 μ m.



b. Les organoïdes des organes lymphoïdes et hématopoïétiques

Des avancées importantes ont lieu chez l'humain et la souris concernant les organoïdes thymiques (Tajima *et al.*, 2016) ou encore les tissus hématopoïétiques (Lara-Gonzalez *et al.*, 2023), notamment dans les champs de la médecine régénérative mais aussi de la physiologie. Ces avancées seront vraisemblablement d'une aide précieuse pour le développement de tels organoïdes chez les animaux de compagnie et de production.

C. Les organoïdes de l'appareil urinaire

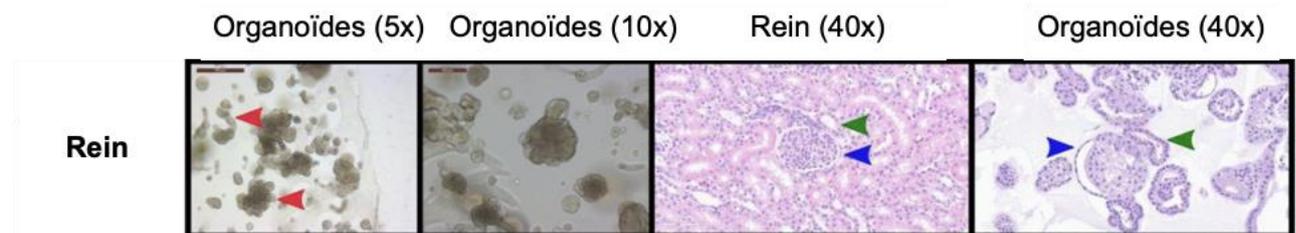
a. Les organoïdes rénaux

L'équipe de Chen *et al.* (2019) a isolé une culture de cellules pluripotentes rénales de chien avant de les faire pousser dans un milieu de culture tridimensionnel. Cela a donné naissance à des organoïdes tubulaires. La nature de ces organoïdes n'est, néanmoins, pas

étudiée dans cette publication. Zdyrski *et al.* (2022) montrent, dans leur article, des images d'organoïdes rénaux de chien. Ceux-ci évolueraient sous deux phénotypes différents des organoïdes tubulaires comme décrits par Chen *et al.* (2019) et des organoïdes en masse (figure 25). La coloration hémalun-éosine identifie des structures se rapprochant de ce qui est retrouvé dans l'organe *in vivo* (glomérule, capsule de Bowman et tubules collecteurs). Les organoïdes et leur tissu primaire partagent 14 735 gènes (contre seulement 1 277 gènes présents uniquement chez les organoïdes et 2 512 uniquement chez le tissu primaire). D'un point de vue cellulaire, l'immunofluorescence ne montre la présence que des cellules des tubules distaux.

Ainsi, si certaines structures sont bien présentes au sein des organoïdes rénaux canins, la diversité cellulaire ne semble pas être au rendez-vous. Il conviendrait donc d'attendre des publications supplémentaires afin de statuer sur leur qualité de modèle de l'organe.

Figure 25 : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes de rein, d'après Zdyrski *et al.* (2022). Les têtes de flèche rouges correspondent une morphologie spécifique de l'organoïde rénal alors que les têtes de flèches bleues et vertes montrent des similarités histologiques entre le tissu initial et les organoïdes. L'échelle est de 500 µm pour le grossissement 5x, 200 µm pour le grossissement 10x et 60 µm pour les grossissements 40x.



b. Les organoïdes de l'uretère

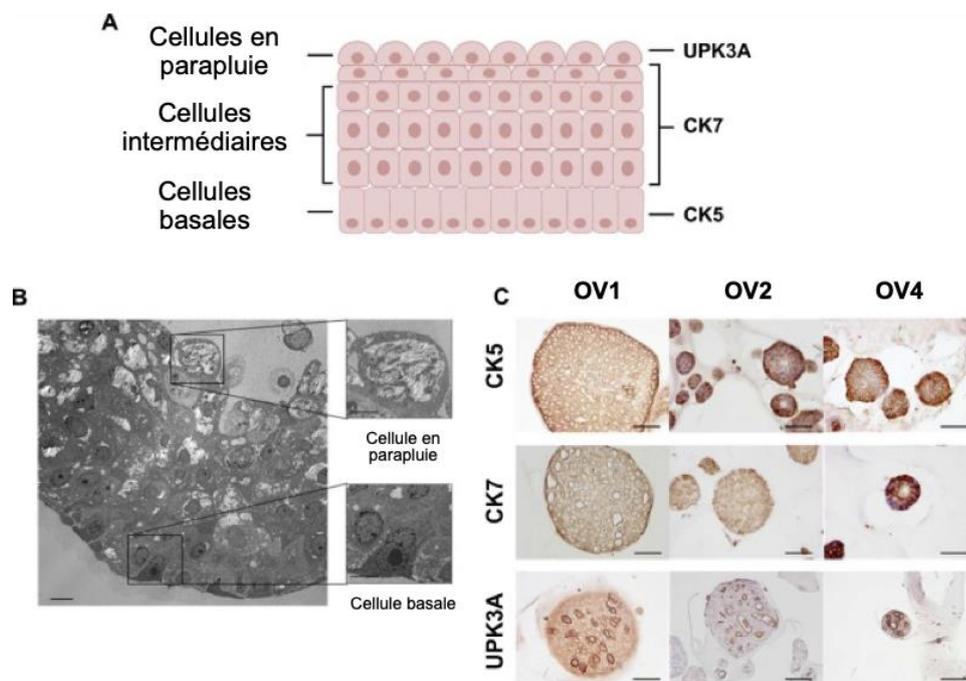
Des progrès sont en cours concernant la formation d'organoïdes d'uretère chez l'humain, notamment dans le cadre de la médecine régénérative (Shi *et al.*, 2023). Ceux-ci bénéficieront vraisemblablement à leur développement chez les animaux de compagnie et de production.

c. Les organoïdes vésicaux

En 2019, l'équipe d'Elbadawy *et al.* (2019) a produit des organoïdes de carcinome transitionnel de la vessie à partir de prélèvements urinaires de chiens. Ils montrent alors les similarités histologiques entre les organoïdes formés avec les tumeurs *in vivo*. Ils ont poussé l'étude jusqu'aux tissus normaux et ont pu montrer qu'il était possible de former des organoïdes dont l'organisation est similaire à celle des tissus *in vivo*, notamment en montrant la présence de cellules parapluies et basales au microscope électronique (Elbadawy *et al.*, 2022). La présence des marqueurs des trois types cellulaires vésicaux

(uroplakine-3A (UPK3A) pour les cellules en parapluie, cytokératine-7 (CK7) pour les cellules intermédiaires et cytokératine-5 (CK5) pour les cellules basales) est aussi remarquée ([figure 26](#)). **Les similarités histologiques entre les organoïdes vésicaux et le tissu *in vivo* ouvrent le chemin à d'autres études, notamment fonctionnelles, qui permettraient de faire de ces organoïdes un modèle robuste.**

Figure 26 : composition cellulaire des organoïdes vésicaux (OV), d'après Elbadawy *et al.* (2022). (A) schéma de la structure d'un urothélium, trois couches se superposent : cellules en parapluie, cellules intermédiaires et cellules basales. (B) Ultrastructure d'un organoïde vésical en microscopie électronique à transmission. Les encarts montrent une cellule en parapluie et une cellule basale. Échelles : 10 μm (20 μm pour les encarts). (C) Immunohistochimie marquant les cellules en parapluie (marqueur UPK3A), les cellules intermédiaires (marqueur CK7) et les cellules basales (marqueur CK5) sur trois organoïdes. Échelle : 50 μm .



Le développement des organoïdes vésicaux peut, de plus, ouvrir le champ des recherches pour les organoïdes urétraux qui n'ont pas encore fait l'objet de publication.

D. Les organoïdes de l'appareil reproducteur

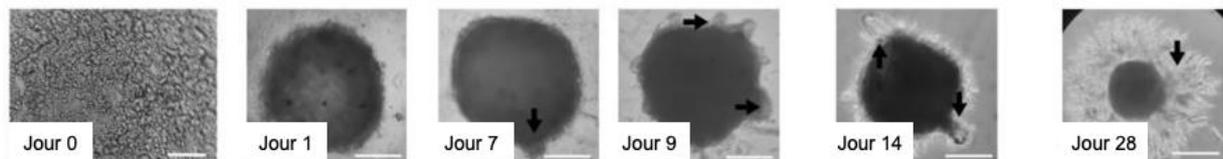
a. Les organoïdes de l'appareil reproducteur mâle

i. Les organoïdes de testicule

Les organoïdes de testicules d'animaux de compagnie et de production ([figure 27](#)) en sont à leurs balbutiements. Quelques tentatives s'énumèrent chez le porc (Vermeulen *et al.*, 2019 ; Cham *et al.*, 2021) et chez le bovin (Cortez *et al.*, 2022). La présence des gonocytes, des cellules de Sertoli, de Leydig et de cellules myoïdes périvitubulaires est notée. Ces études

semblent montrer que l'utilisation de cellules immatures permet d'aboutir à une organisation en tubes séminifères (ce qui n'est pas le cas avec des cellules matures). Ces organoïdes produisent de la testostérone et répondent à des stimulations de l'hormone lutéinisante (LH). **La diversité cellulaire du testicule semble assez bien retrouvée au sein des organoïdes testiculaires et au moins une partie de leur fonction est préservée.**

Figure 27 : images de microscopie sur fond clair des changements et différences morphologiques dans la réorganisation cellulaire au sein des organoïdes de testicules de bovin, d'après Cortez *et al.* (2022). Les flèches indiquent les branches en formation du jour 7 au jour 28 après un traitement à base de FGF-2, BMP-4 et le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF). Échelles : 100 µm pour le jour 0 puis 500 µm pour les jours suivants.



ii. Les organoïdes des conduits spermatiques

Il existe déjà des études montrant la possibilité de produire des organoïdes notamment de l'épididyme chez l'humain et le rat (Patrício *et al.*, 2023), ce qui pourrait avoir un retentissement dans la compréhension de la maturation des spermatozoïdes ainsi que de la contraception. Ces études peuvent aider au développement de ce type d'organoïdes chez les espèces de production et de compagnie.

iii. Les organoïdes des glandes annexes de l'appareil reproducteur mâle

Parmi les glandes annexes de l'appareil reproducteur mâle, seule la prostate a bénéficié d'études concernant les organoïdes. L'équipe de Usui *et al.* (2017) produit des organoïdes à partir de prélèvements urinaires de chiens ayant des tumeurs prostatiques. L'étude histologique montre de fortes similarités avec les tissus originels (figure 28). Le marqueur épithélial (cadhérine-E) est détecté par immunofluorescence. La voie métabolique du récepteur androgène, qui est nécessaire pour l'initiation de la tumeur prostatique chez l'humain mais inhibée chez le chien, est très peu observée dans ses organoïdes. **Ainsi, à la fois la diversité cellulaire et la fonction de la tumeur est conservée (au moins en partie) chez ces organoïdes ce qui peut en faire des modèles utiles pour l'étude des tumeurs prostatiques chez le chien.**

Figure 28 : coloration à l'hémalum-éosine d'une tumeur prostatique et d'un organoïde issu de celle-ci et image d'immunofluorescence du marqueur épithélial de la cadhérine-E d'après Usui *et al.* (2017). Échelle : 50 µm.



b. Les organoïdes de l'appareil reproducteur femelle

i. Les organoïdes d'ovaire

Des avancées considérables sont en train d'être conduites chez la souris notamment avec des organoïdes ovariens capables de produire des gamètes fécondables (Li *et al.*, 2021). Cela est très encourageant pour la recherche au sein de la reproduction (notamment dans les filières de production qui dépendent essentiellement de la reproduction d'animaux).

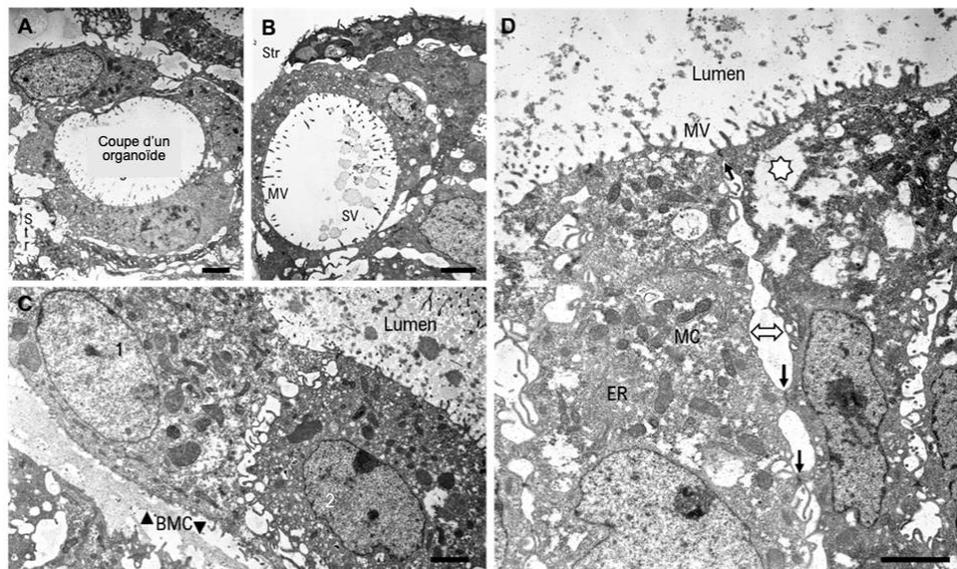
ii. Les organoïdes des conduits de l'appareil reproducteur femelle

Bien que non publiée, une équipe de l'INRAE aurait produit des organoïdes d'oviductes de bovin dès 2021 (Bourdon *et al.*, 2021). Dès 2022, l'équipe de (Thompson *et al.*, 2022b) propose un protocole pour la création d'oviducte de jument qui aboutit à des organoïdes cystiques, avec une polarité, une ciliature au pôle apical et une capacité sécrétoire (figure 29). Ce n'est, ensuite, qu'en 2023 que des équipes élargissent les procédés aux chiens, chats, porcs, bovins et équins (Lawson *et al.*, 2023 ; Thompson *et al.*, 2023). Pour chaque espèce, la morphologie des organoïdes rappelle celle du tissu natif. Les cellules sécrétrices et ciliées étaient présentes pour chaque espèce. Les organoïdes de porc et de cheval ont même montré des cils fonctionnels donnant lieu à un mouvement unidirectionnel et synchronisé. Les autres avaient tout de même des mouvements des cils.

Les organoïdes d'oviductes semblent donc rassembler à la fois des similarités morphologiques et fonctionnelles des tissus originels, ce qui est très encourageant pour leur utilisation dans la modélisation de l'organe concerné.

Figure 29 : images de microscopie électronique à transmission d'organoïdes d'oviducte de jument cryopreservés puis remis en culture, d'après Thompson *et al.* (2022).

(A) Trois cellules épithéliales contiguës au sein d'une structure cystique entourée de plusieurs éléments stromaux (Str). (B) Un autre organoïde avec des microvilli visualisables (MV) à la surface apicale ainsi que des vésicules sécrétrices (SV). (C) Deux types cellulaires morphologiques différents (numérotés 1 et 2) indiquant une probable différenciation fonctionnelle différente. Il est noté la présence d'un matériel amorphe structurellement homogène au pôle basal, laissant penser à l'existence de composés d'une membrane basale (BMC) et de microvilli ainsi que de matériel sécrétoire sur le pôle apical (lumen). (D) Coupe sagittale de cellules épithéliales avec reticulum endoplasmique (ER), mitochondrie (MC). La portion apicale de la cellule de droite montre une vacuolisation cytoplasmique irrégulière (étoile) et une agglutination des organelles provoquant une perturbation du cytosquelette. Ces artefacts peuvent être une conséquence de la cryopréservation (comme l'atteste l'élargissement de l'espace inter-cellulaire marqué par une double flèche). Néanmoins, les jonctions inter-cellulaires (flèches simples), sont préservées. Échelle : 2 µm.

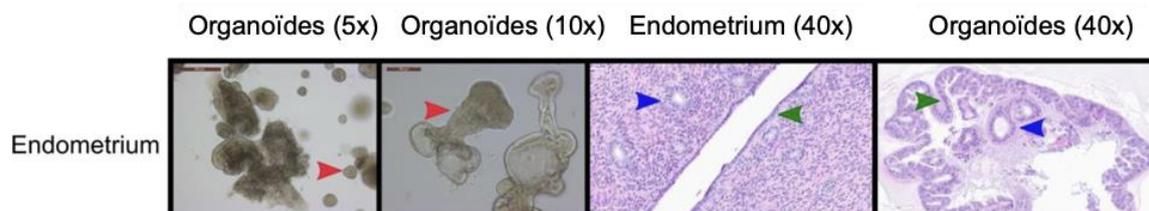


iii. Les organoïdes de l'utérus et du vagin

C'est chez le cheval que les premiers organoïdes endométriaux ont été conçus. Issus de biopsies sur des chevaux domestiques et de Przewalski, ils montrent une morphologie kystique avec un épithélium cylindrique, des noyaux basaux et même des microvilli et un appareil sécrétoire au microscope électronique à transmission (Thompson, 2020). La réponse des organoïdes à différentes hormones (estradiol, progestagène et ocytocine) a été testée et se rapproche bien souvent des réponses tissulaires connues à ce jour (à quelques exceptions près qui peuvent s'expliquer par un manque de rétrocontrôle extrinsèque). Dans la continuité de ces expériences, des tests de cryopréservation de ces organoïdes ont été réalisés et ont montré que celle-ci n'avait pas d'influence sur leur viabilité ni sur leur intégrité structurelle et sur leur activité sécrétoire. Néanmoins, à la fois le milieu de culture et le nombre de passage après décongélation a un impact sur la croissance de ceux-ci (Thompson *et al.*, 2022).

Récemment, des organoïdes d'endomètre canins ont été conçus (figure 30) et exprimaient des gènes spécifiquement utérins (facteur de transcription 17 du facteur déterminant du testicule (SOX17) notamment). Contrairement aux organoïdes endométriaux équins ou humains, ils avaient des structures tubulaires. L'histologie montre la présence de cellules épithéliales et glandulaires. Ces organoïdes montraient 14 280 gènes en commun avec leurs tissus primaires (Zdyrski *et al.*, 2022).

Figure 30 : microscopie sur fond clair et histologie (hémalun-éosine) des organoïdes d'utérus, d'après Zdyrski *et al.* (2022). Les têtes de flèche rouges correspondent une morphologie spécifique de l'organoïde utérin alors que les têtes de flèches bleues et vertes montrent des similarités histologiques entre le tissu initial et les organoïdes. L'échelle est de 500 μm pour le grossissement 5x, 200 μm pour le grossissement 10x et 60 μm pour les grossissements 40x.

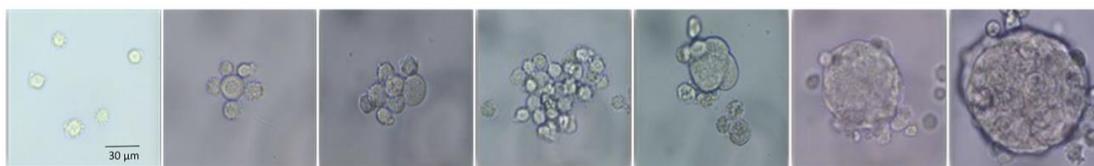


Les organoïdes endométriaux des animaux de compagnie et de production partagent donc une morphologie et une partie du génome et de la fonction de l'endomètre. Cela montre donc la voie pour leur utilisation comme modèle de cet organe.

iv. Les organoïdes de mamelle

Les études concernant la culture tridimensionnelle de cellules mammaires de bovin commencent très tôt. En effet, dès 1998 Talhouk *et al.* (1998) placent des cellules mammaires cryopréservées de bovin au sein de la matrice EHS (qui, pour rappel, est le prédécesseur du Matrigel®). Ils remarquent alors la formation de structure acineuses en trois dimensions. Néanmoins, la microscopie à transmission ne montre pas d'organisation spécifique (notamment une absence de polarité) et pas de lumière centrale. Concernant la synthèse protéique, l'équipe note que cette culture (contrairement à celles produites en collagène ou en 2D) synthétise de la lactoferrine qui est stockée intracellulairement. Cela jette donc les bases des organoïdes mammaires bovins en montrant un début d'organisation tridimensionnelle, même si elle n'est pas encore aboutie (et surtout la préservation de certaines fonctions, comme la synthèse de lactoferrine). Holland *et al.* (2007) montrent, par la suite, que parmi différents milieux que sont le collagène de type I, le collagène de type IV, la laminine et le Matrigel®, seul ce dernier est capable de supporter une culture tridimensionnelle d'organoïdes mammaire à partir de cellules souches mammaires. Ils montrent, par ailleurs, qu'après trois à six jours de culture, les cellules souches se différencient déjà et montrent une polarité. Il est même possible de produire des organoïdes mammaires à partir de lignées cellulaires déjà existantes (Kozłowski *et al.*, 2009). D'un point de vue fonctionnel, Riley *et al.* (2010) montrent que les organoïdes mammaires cultivés sur Matrigel® expriment les gènes des protéines du lait (caséines) et de la biosynthèse des lipides alors qu'ils n'expriment pas ceux de la biosynthèse du lactose. Zhan *et al.* (2017) confirment que les organoïdes expriment trois des quatre caséines (αS1 , β and κ) bien qu'après trente passages, cette synthèse cesse. Les organoïdes mammaires de bovin (*figure 31*) semblent donc plus proches fonctionnellement que les cultures bidimensionnelles.

Figure 31 : images de microscopie sur fond clair d'une mammosphère en formation par auto-organisation, d'après Finot *et al.* (2021).



Contrairement aux bovins, il n'existe que deux études chez le chien qui conçoivent des organoïdes de glande mammaire. Une première en produit à partir de mammosphères, c'est-à-dire de sphéroïdes en suspension, et montre que ceux formés à partir de mammosphères issues de cellules cancéreuses sont plus complexes et plus nombreux que ceux issus de cellules saines (Cocola *et al.*, 2017). Une seconde étude, plus récente, tente de montrer que les organoïdes sont un bon modèle pour l'étude du tissu mammaire sain comme cancéreux (Inglebert *et al.*, 2022). Les structures acineuses étaient conservées dans les organoïdes et une activité sécrétrice était même présente pour les organoïdes issus de tissus sains. Par ailleurs, 14 des 17 organoïdes ont réussi à conserver les biomarqueurs immunohistochimiques de leur tumeur source. Cependant, le nombre de passages altère vraisemblablement l'expression de ces marqueurs, au moins pour ceux des récepteurs aux hormones. La génétique des cellules tumorales est conservée au sein des organoïdes. Les tests des médicaments montrent des résultats proches de ceux déjà connus *in vivo*. De plus, cette étude a montré que les organoïdes pouvaient être modifiés génétiquement dans le but d'étudier les modifications génétiques nécessaires au développement de la tumeur.

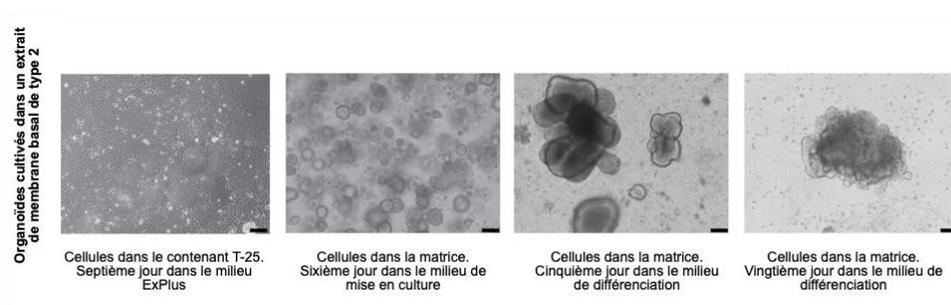
Les organoïdes de la glande mammaire chez les bovins et les chiens montrent qu'ils conservent, au moins en partie, la fonction de la glande originelle. Par ailleurs, ils permettent également d'étudier les affections tumorales de cette glande qui sont nombreuses chez les carnivores domestiques.

E. Les organoïdes de l'appareil respiratoire

a. Les organoïdes de trachée

L'équipe de (Quah *et al.*, 2023) a développé des organoïdes de trachée de bovin ([figure 32](#)) qui montrent une morphologie cystique avec une polarité cellulaire avec des cils fonctionnels sur le pôle apical. Ces organoïdes ont été comparés à un autre modèle de culture : l'interface air-liquide. Bien qu'au niveau transcriptomique ces deux modèles se distinguent clairement l'un de l'autre, leur composition cellulaire s'est avérée grossièrement identiques : dix types cellulaires rassemblés en trois groupes par les chercheurs : cellules basales, cellules ciliées et cellules sécrétrices. Ces organoïdes sont même sensibles à l'infection par l'herpèsvirus bovin de type 2 (BHV-2).

Figure 32 : images de microscopie sur fond clair des organoïdes mis en culture au sein d'extrait de membrane basale de type 2, d'après Quah *et al.* (2023). Échelle : 100 µm.



Les organoïdes de trachée de bovin s'avèrent donc de morphologie et de composition cellulaire proche de celle de l'épithélium trachéal *in vivo*, de plus une partie de sa fonction est préservé (ciliature fonctionnelle, sensibilité au virus BHV-2).

b. Les organoïdes de bronche et bronchiole

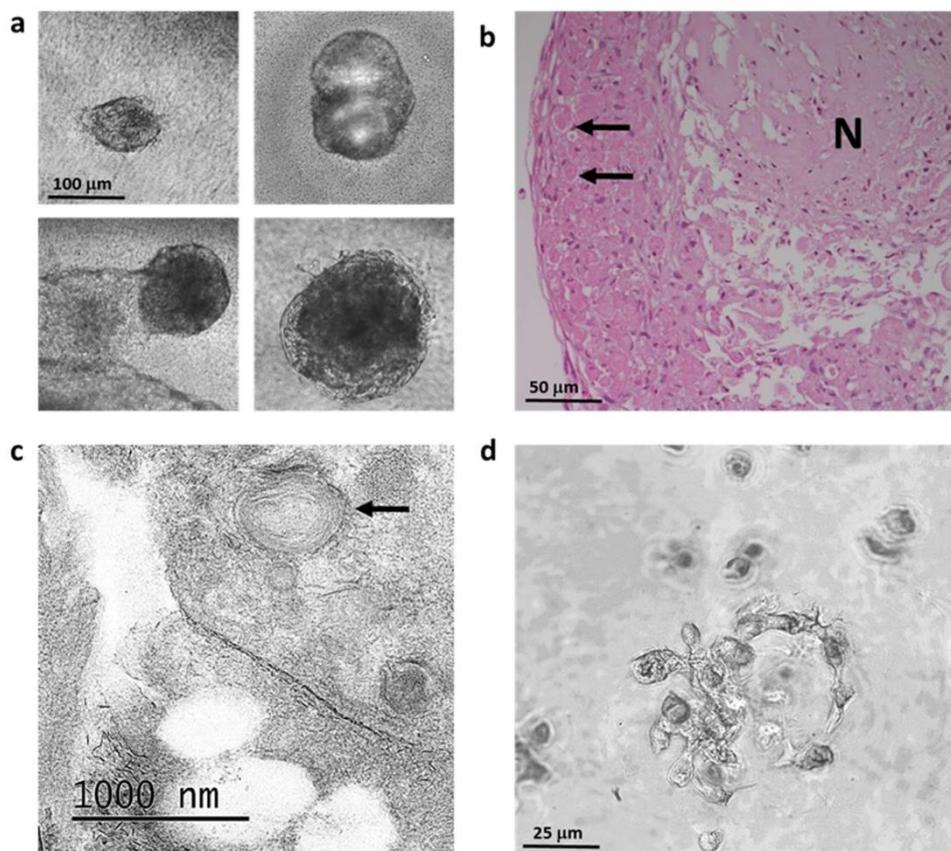
Des travaux sont conduits au sein de l'espèce humaine afin d'obtenir des organoïdes de bronchioles (Hoareau *et al.*, 2021) et ouvrent la voie pour des recherches dans les champs de la pathologie ou encore de la médecine individuelle. Ces recherches gagneraient à s'étendre à la médecine vétérinaire.

c. Les organoïdes pulmonaires

Des organoïdes de poumon ont été développés chez le chien. Ils montrent la présence de cellules alvéolaires de type 2 ainsi que des cellules alvéolaires bronchiques mais l'absence de cellules alvéolaires de type 1 (Zdyrski *et al.*, 2022). Ces organoïdes montrent, par ailleurs, plus de 14 000 gènes en commun avec leur tissu originel.

Des organoïdes de poumon ont aussi été rapportés chez le bovin avec une architecture semblable à celle connue chez ceux de souris ou d'homme (figure 33). Ils montrent aussi la présence de cellules alvéolaires de type II (Lee *et al.*, 2018).

Figure 33 : culture tridimensionnelle de cellules isolées dans du Matrigel[®], d'après Lee *et al.* (2018). (a) Cellule alvéolaire de type II isolée sur des puits Transwell[®] de 12 mm sur du Matrigel[®] et cultivée pendant deux jours puis huit jours à l'interface air-liquide. (b) Coloration hémalum-éosine de coupe d'organoïdes de deux semaines avec du matériel nécrotique (N) et des cellules périphériques vivantes montrant de grandes vésicules sphériques prenant très fortement la coloration, compatibles avec des vésicules contenant du surfactant. (c) Image de microscopie électronique à transmission confirmant la présence de corps lamellaires. (d) Structures annulaires entourant une lumière.



F. Les organoïdes du système nerveux

Aucune étude n'a, pour l'heure, décrit l'élaboration d'organoïdes issus du tissu nerveux chez les animaux étudiés par la présente thèse. Néanmoins, une voie commence à être tracée en s'appuyant notamment sur les découvertes chez les espèces humaine et murine (Pain *et al.*, 2021).

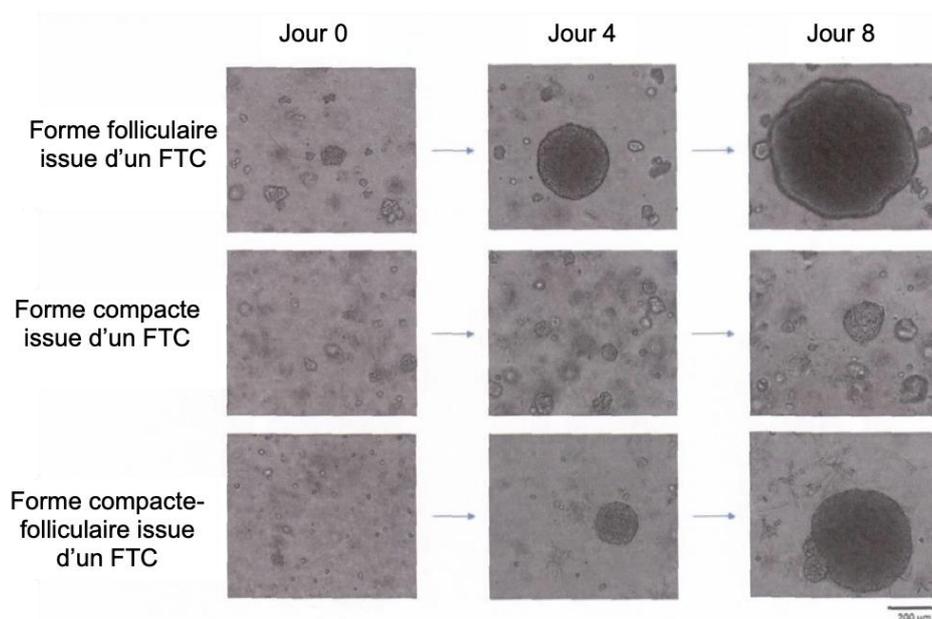
G. Les organoïdes du système endocrine

a. Les organoïdes thyroïdiens

Les organoïdes thyroïdiens sont plutôt récents chez les animaux de compagnie et ne concernent, pour l'heure, que le chien et le chat. Les premiers essais datent de 2019 (Tièche, 2019) (figure 34). Le premier essai avait notamment pour but de montrer que les organoïdes étaient un modèle convenable de la thyroïde mais aussi des différentes tumeurs qui la touchent. Si les organoïdes issus des carcinomes des cellules folliculaires (FTC) de thyroïde montrent bien des similarités histologiques et immunohistochimiques avec les

organes dont ils proviennent, les organoïdes issus de tissus sains et de carcinomes des cellules médullaires nécessitent encore quelques améliorations (Tièche, 2019). Cette étude a été prolongée en 2021 afin de continuer dans la voie de la validation du modèle organoïde pour les carcinomes des cellules folliculaires thyroïdiennes et notamment dans les mécanismes d'absorption de l'iode (Jankovic *et al.*, 2021). Au moins quatre protéines impliquées dans l'absorption thyroïdienne de l'iode (récepteur à la thyrostimuline, symport sodium-iodure, pendrine et peroxidase thyroïdienne) sont bien exprimées au sein des organoïdes. Cette expression était souvent supérieure au tissu initial et les auteurs imaginent trois hypothèses pour l'expliquer : l'absence d'iode dans le milieu de culture des organoïdes augmentant la synthèse de protéines pour l'absorber, les différences intercellulaires (la partie utilisée pour l'histologie immédiatement a été par hasard celle qui produisait le moins de protéines dans les trois cas alors que celle utilisée pour les organoïdes était celle qui en produisait le plus), ou encore que cette disparité d'expression était due à des différences micro-environnementales lors de la fixation par le formaldéhyde, liées à des différences de volume.

Figure 34 : évolution des organoïdes issus de FTC au cours du temps, d'après Tièche (2019).



Plus récemment, des organoïdes de carcinomes des cellules médullaires thyroïdiennes canins ont été réalisés et différents médicaments ont été testés sur ceux-ci (Scheemaeker *et al.*, 2023). Même si cette publication se concentre sur des organoïdes canins, une première communication de l'équipe en 2022 faisait part d'organoïdes d'hyperplasie thyroïdienne félins (Scheemaeker *et al.*, 2022). Pour en revenir aux organoïdes canins, ils montrent des similarités avec le tissu initial (histologique et immunohistologique, avec l'expression du facteur de transcription de la thyroïde 1, de la thyroglobuline, de la calcitonine et du facteur de croissance vasculaire endothélial) mais

étaient différents concernant certains facteurs immunohistochimiques (plus grande expression de vimentine et ki-67 ainsi qu'une expression plus basse de synaptophysine, cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et glycoprotéine P). Trois médicaments ont été testés sur ces organoïdes (meloxicam, carboplatine et phosphate de tocéranibe) mais aucun d'entre eux n'a montré de modification significative de la viabilité cellulaire aux concentrations permises *in vivo*.

Des cultures tridimensionnelles sont expérimentées chez le porc mais se limitent pour l'instant à des sphéroïdes (Yang *et al.*, 2017). Des cellules thyroïdiennes de porc sont encapsulées au sein d'une capsule d'alginate. Leur production de thyroxine est étudiée au cours du temps et montre une production plus importante que les cellules non-encapsulées. Cela est très encourageant notamment pour la médecine régénérative.

Les organoïdes issus de tissus thyroïdiens d'animaux de compagnie sont donc intéressants car ils partagent à la fois des caractères histologiques mais aussi des caractéristiques fonctionnelles qui nourrissent beaucoup d'espoir dans leur utilisation comme modèle à des fins de recherches en physiologie, en endocrinologie, en oncologie mais aussi en médecine régénératives.

Seconde partie : les apports offerts par l'utilisation des organoïdes et les perspectives qu'elle permet d'entrevoir

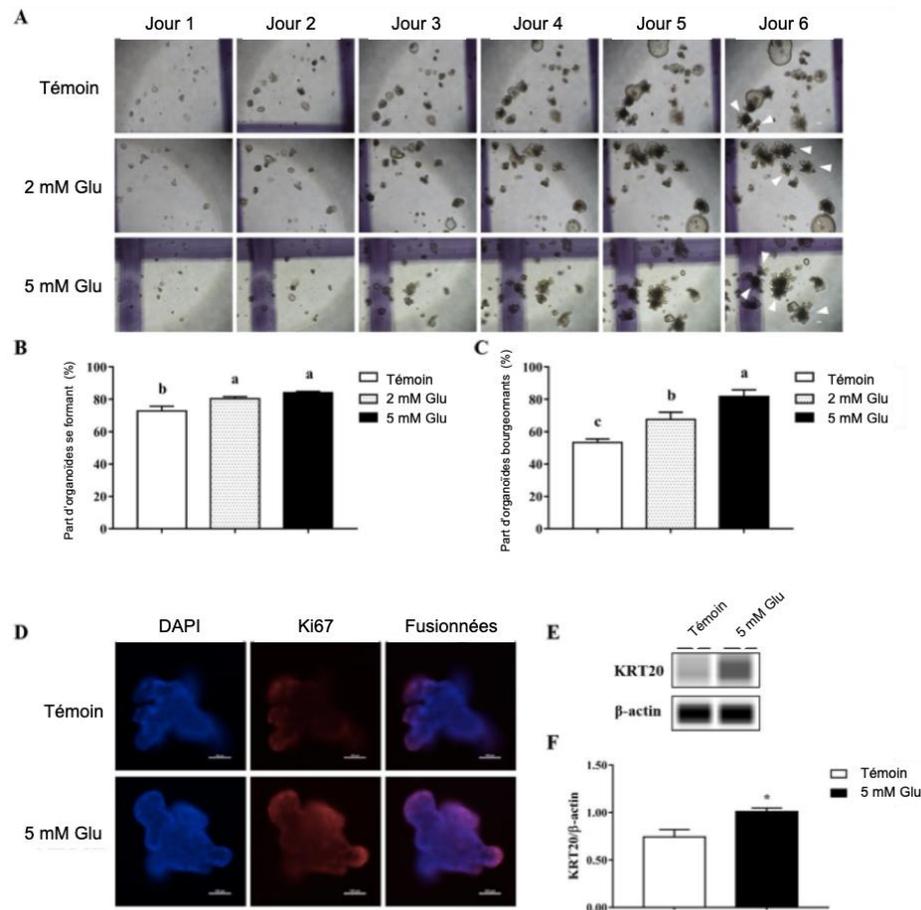
Dans la première partie, les similarités entre les organoïdes et leur tissu originel ont été passé en revue chez les animaux de compagnie et de production. Il a donc été souligné que dans beaucoup de cas, les organoïdes partageaient à la fois une structure mais aussi une fonction commune avec les tissus originels. Ainsi, cette seconde partie sera consacrée aux avancées qui sont et seront potentiellement possibles grâce à l'utilisation de cette méthode de culture cellulaire.

1. Les organoïdes dans le champ de la physiologie

A. Les organoïdes dans le champ de la science de la nutrition

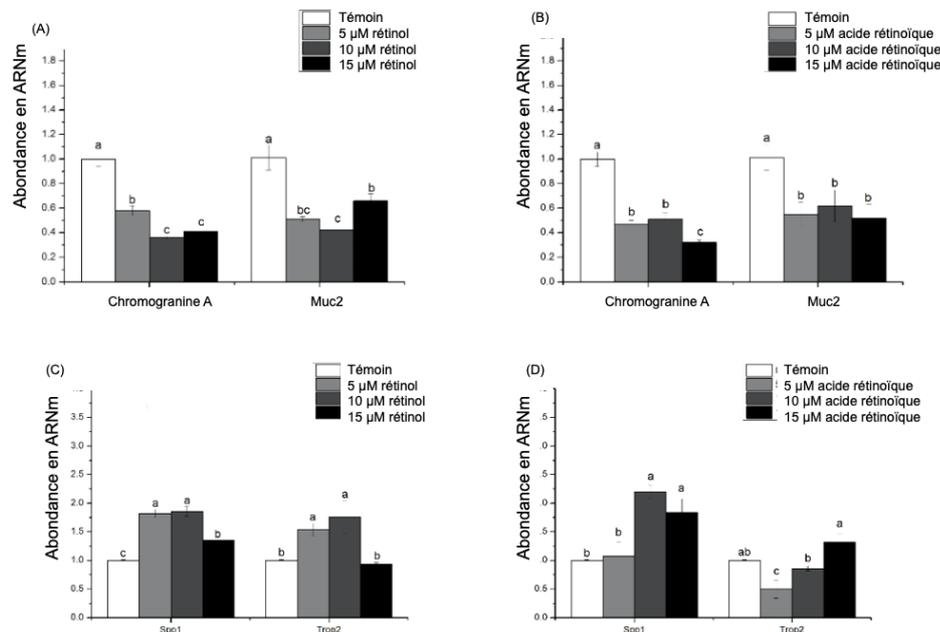
Les organoïdes, notamment de l'appareil digestif, ont montré un certain intérêt dans l'étude de l'impact de l'alimentation sur les organes digestifs. L'équipe de Zhu *et al.* (2019) s'est, par exemple, penchée sur l'adjonction de glutamate dans le milieu de culture des enteroïdes de porc. Le glutamate montre un intérêt croissant dans la diète des porcs comme le soulignent Hou et Wu (2018). Les entéroïdes au contact de cet acide aminé montrent une croissance plus soutenue ainsi qu'une augmentation de marqueurs de prolifération (Ki-67) et de différenciation (gène de la kératine 20 (KRT20)) comme le montre la figure 35. Les chercheurs interprètent cela comme une augmentation de l'activité des cellules souches. L'équipe montre, de surcroît, que cette augmentation d'activité est permise par la voie métabolique du complexe 1 des mammifères ciblant la rapamycine (mTORC1) (voie de régulation cellulaire impliquée notamment dans de nombreux processus pathologiques comme le cancer ou le diabète). Quelques temps plus tard, la même équipe renforce ces constatations en complétant les marqueurs étudiés et en montrant une augmentation de l'abondance en ARN messager (ARNm) au sein des cellules souches, enteroendocrines, de Paneth, à mucus et des enterocytes suite à une exposition au glutamate (Zhu *et al.*, 2020). Par ailleurs, ils tentent de résoudre la voie métabolique impliquant mTORC1 sur des cultures cellulaires standard (IPEC-J2). Néanmoins, ils arrivent à la conclusion que l'inhibition de la voie métabolique impliquant mTORC1 entraîne une baisse dans le bourgeonnement des organoïdes, ce qui traduit selon eux, l'impact de cette voie (et donc, *in fine*, du glutamate) sur le renouvellement des cellules souches.

Figure 35 : le glutamate est nécessaire pour l'expansion de cellules souches intestinal *ex vivo*, d'après Zhu *et al.* (2019). (A-C) Le glutamate a stimulé d'expansion des organoïdes. (A) Croissance des organoïdes, le bourgeonnement est indiqué par les têtes de flèche blanches. Échelle : 100 μ m. (B) Part d'organoïdes en formation. (C) Part des organoïdes en bourgeonnement. (D) Immunofluorescence afin de marquer les noyaux (DAPI, bleu) et la prolifération (Ki67, rouge). Échelle : 100 μ m. (E,F) L'expression de la protéine KRT20 a été analysée au sein des organoïdes par western blot. La bêta-actine agissait comme contrôle. Les résultats sont issus de trois expérimentations indépendantes. Les astérisques indiquent un $p < 0,05$. Pour les diagrammes en barre, des lettres identiques indiquent un $p < 0,05$ alors qu'une même lettre indique un $p > 0,05$.



Un autre complément alimentaire a bénéficié d'une étude sur son impact chez le porc : la vitamine A. Pour rappel, la vitamine A est une appellation qui regroupe plusieurs composés dont le rétinol, le rétinol et l'acide rétinoïque, ce dernier étant la forme connue pour agir en tant que facteur de transcription (Bar-El Dadon et Reifen, 2017). L'équipe de Wang *et al.* (2020) montre que l'exposition à différents niveaux de rétinol et d'acide rétinoïque freine le bourgeonnement des entéroïdes porcins. En explorant davantage, ces chercheurs montrent une diminution de l'expression de certains facteurs de différenciation (CgA et MUC2) au sein des organoïdes exposés tout en augmentant l'expression de marqueurs des cellules souches embryonnaires (phosphoprotéine sécrétée 1 (Spp1) et troponine 2 (Trop2)) comme illustré dans la [figure 36](#), ce qui pourrait expliquer la diminution du bourgeonnement observée à la faveur d'entéroïdes plutôt sphériques. La vitamine A jouerait donc un rôle dans la modulation de la différenciation de l'épithélium intestinal chez le porc, dont il a été déjà connu que l'absence provoquait une différenciation épithéliale incontrôlée.

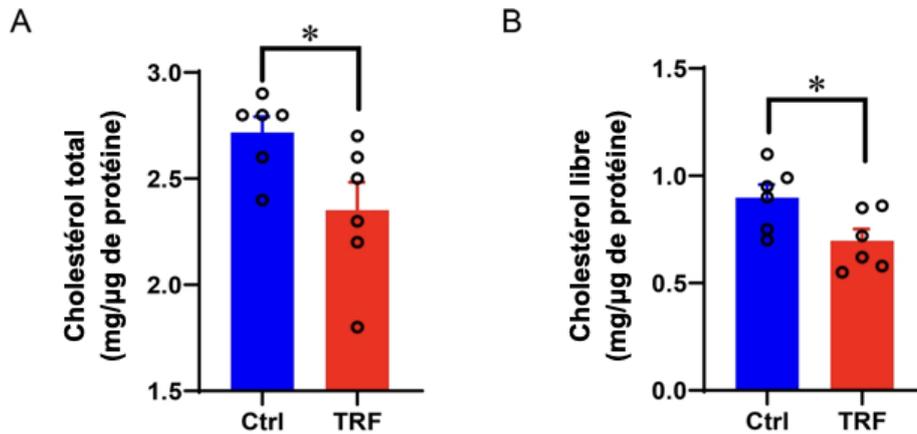
Figure 36 : effets de l'adjonction de rétinol ou d'acide rétinoïque dans le milieu de culture d'organoïdes intestinaux de porc, d'après Wang *et al.* (2020). D'abord sur l'abondance en ARNm de certains facteurs de différenciation (AB) mais aussi sur des marqueurs de cellules souches (C, D). Des lettres différentes indiquent un $p < 0,05$.



Des contaminants des aliments sont aussi étudiés comme certaines mycotoxines. L'équipe de Li *et al.* (2019) s'est penchée sur l'adjonction de deoxynivalenol au sein du milieu de culture d'enteroïdes porcins. La présence de cette mycotoxine entraîne une diminution du bourgeonnement des enteroïdes sans modifier leur taux de formation. Néanmoins, elle entraîne aussi une baisse d'expression de marqueurs de cellules souches (Lgr5) et des cellules épithéliales (β -caténine). Il s'agit là d'un pas en avant vers la compréhension du mécanisme lié à cette mycotoxine qui s'avère aussi toxique pour les cellules souches.

Au-delà de ce qui peut être ajouté à la nourriture des porcins, l'équipe de Zhang *et al.* (2020) s'est intéressée aux conséquences d'une restriction alimentaire sur des organoïdes hépatiques de porc. Cette pratique est, en effet, promue comme favorisant le métabolisme lipidique. L'équipe définit deux milieux : un milieu basique qui constitue le régime pauvre (sans protéines, lipides ou facteurs de croissance) et un milieu d'expansion qui constitue le régime riche (contenant notamment des facteurs de croissance). L'application du régime pauvre pendant 14 h en alternance avec le régime riche pendant 10 h n'entraîne pas de surmortalité cellulaire et ne modifie pas la quantité d'adénosine triphosphate (ATP) présente, ni l'expression des gènes clefs de la survie et de la prolifération des hépatocytes au sein des organoïdes. Néanmoins, ce régime montre une baisse du cholestérol total et libre (voir [figure 37](#)) avec une baisse de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol. L'équipe montre, par la suite, que cette baisse de l'anabolisme du cholestérol par cette restriction alimentaire est conduite par une baisse du médiateur récepteur orphelin associé à l'acide rétinoïque γ (ROR γ). Elle va même jusqu'à explorer les modifications induites à l'échelle de l'ADN.

Figure 37 : cholestérol total et libre au sein d'organoïdes hépatiques de porcs, d'après Zhang *et al.* (2020). Ceux n'ayant pas subi de régime spécial sont notés contrôle (Ctrl) et ceux ayant subi la restriction alimentaire (TRF) sont notés TRF. Les astérisques indiquent un $p < 0,05$.



L'effet de la consistance de la nourriture et du microbiote associé, notamment lors de la période du sevrage, a été étudié chez le lapin. L'équipe de Beaumont *et al.* (2020) montre que la présence de surnageant d'extrait caecaux de lapins avec une alimentation solide dans le milieu de culture des d'organoïdes intestinaux de lapin, permettait d'obtenir des modifications dans l'expression de certains gènes comparativement à ceux exposés au surnageant provenant de caecum de lapins avec une alimentation entièrement liquide. Néanmoins, aucune différence dans l'expression des marqueurs des cellules souches, de prolifération et de différenciation. L'équipe de Pierzchalska *et al.* (2017) montrait d'ailleurs plus tôt que la co-culture d'organoïdes intestinaux de poulets avec *Lactobacillus acidophilus* permettait une plus forte croissance des organoïdes montrant un autre rôle que jouait le microbiote intestinal.

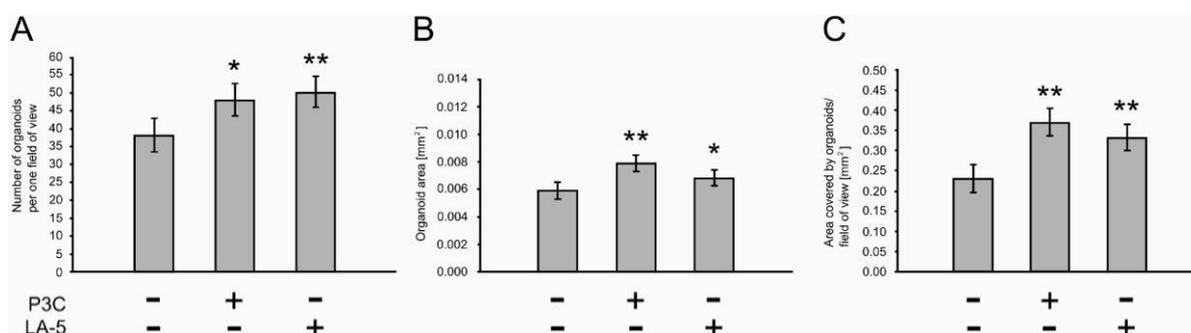
B. Les organoïdes dans le champ de l'immunologie

L'équipe de Li *et al.* (2019) montre que les enteroïdes de porc sont capables de réponse immunitaire innée. En effet, en exposant des enteroïdes de porc aux IFN $\lambda 1$ et α , ceux-ci ont augmenté l'expression d'un certain nombre de gènes lié aux interférons qui s'est avérée protectrice de manière dose-dépendante envers l'infection par le PEDV.

L'équipe de Ferrandis Vila *et al.* (2018) étudie, quant à elle, l'effet de différentes cytokines sur les organoïdes de porc. Alors que chez l'humain et la souris, les interleukines 1β et 4 sont associées à une augmentation de l'expression du gène MUC2, du nombre de cellules à mucus et, *in fine*, des sécrétions de mucus, ces chercheurs montrent que ce n'est pas le cas chez le porc. Cette étude renforce donc ce qui est déjà connu de la différence de rôle des récepteurs aux interleukines selon les espèces (et plus particulièrement de ce qui est déjà connu du récepteur à l'IL4 chez le porc).

L'équipe de Pierzchalska *et al.* (2017) montre que l'immunité innée est présente au sein des organoïdes intestinaux de poulets. Ils montrent, en effet, par immunoblot que les entéroïdes de poulet expriment les TLR 2 et 4. Ils montrent également que cette immunité est effective et peut être activée par l'exposition aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) comme le N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysine (P3CSK4, ligand du TLR 2). Par ailleurs, ils montrent que le microbiote a un impact sur le développement intestinal car les organoïdes cultivés avec le P3CSK4 ou *Lactobacillus acidophilus* (bactérie probiotique) sont plus gros et plus nombreux (figure 38).

Figure 38 : taille et nombre des organoïdes mis en culture avec des ligands du TLR 2 P3CSK4 (P3C) et *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), d'après Pierzchalska *et al.* (2017). Le nombre moyen d'organoïdes par champ (A), l'aire moyenne des organoïdes (B) et l'aire moyenne qu'occupent les organoïdes par champ (C) ont été calculés pour des entéroïdes de poulet mis en culture deux jours avec P3C ou LA-5. Les barres représentent la valeur moyenne \pm écart-type, les différences significatives avec les cultures sans P3C ou LA-5 sont marquées par des astérisques (* si $p < 0,05$ ou ** si $p < 0,01$).



C. Les organoïdes dans le champ de la biochimie

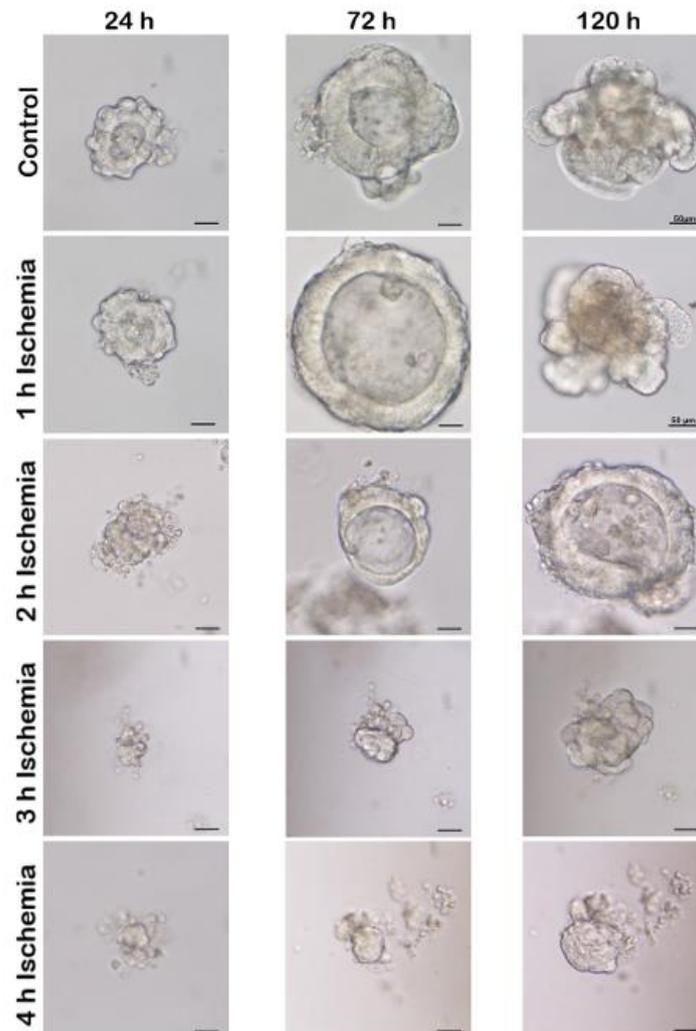
L'équipe d'Acharya *et al.* (2020) étudie les effets de différents types de molécules sur des organoïdes intestinaux de poulet : facteurs de croissance, hormones, vitamines, mycotoxines, endo/entéro-toxines, modulateurs du métabolisme, pesticides et toxiques. Cette équipe montre donc que l'usage des organoïdes permet un certain nombre de criblage de molécules.

Des études plus fondamentales sur la compréhension de certaines voies biochimiques ont montré que des analogues de la méthionine favorisaient la régénération des cellules progénitrices tout en diminuant la différenciation (comparativement à la L-méthionine) mais aussi qu'une déficience en méthionine (mimée par l'adjonction de cycloleucine) défavorisait largement la formation et la taille des organoïdes (Wang *et al.*, 2022).

L'équipe de Stieler Stewart *et al.* (2018) se penche sur la régénération des tissus après des lésions ischémiques. Ils induisent chirurgicalement une ischémie intestinale segmentaire chez des porcs et produisent des organoïdes avec des tissus normaux et des tissus moyennement et sévèrement ischémiés. Ils montrent que les organoïdes formés par

les tissus sévèrement ischémiés sont plus petits, avec moins de bourgeonnement et d'une taille plus petite (figure 39).

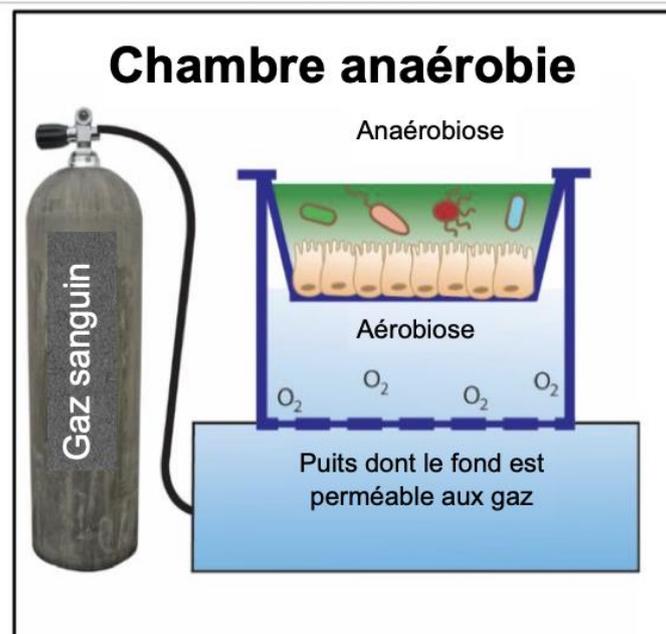
Figure 39 : photo de microscopie à fond clair à différents délai de mise en culture d'entéroïdes de porc mis en culture à partir de cellules issues de tissus ischémiés plus au moins longtemps, d'après Stielor Stewart *et al.* (2018). Alors que pour les organoïdes issus de tissus sains des entérosphères se formaient en 24 à 48 h, ceux formés à partir de tissus sévèrement ischémiés (c'est-à-dire plus de 3 h) survivaient mais étaient beaucoup plus petites. Échelle : 20 µm (sauf indication contraire).



Ainsi, les organoïdes peuvent, être un support pour les études dans le champ de la biochimie. En effet, en rassemblant *in vitro* à la fois la morphologie et la fonction des organes, ils vont vraisemblablement permettre d'étudier plus finement les voies métaboliques. Par ailleurs, ils permettent d'observer des modifications morphologiques en direct dans des endroits où l'accès est normalement compliqué (comme le microbiote au sein du tube digestif). Par exemple, Na et Guan (2022) se penchent sur la physiologie du rumen et indiquent que la flore épimurale du rumen est difficilement accessible à l'étude à cause de sa densité et de sa variabilité en fonction de sa localisation dans l'organe. Les

auteurs indiquent donc que la formation d'organoïdes en co-culture avec la flore microbienne pourrait permettre de rendre accessible son étude. Des modèles chez l'humain avec notamment un gradient en oxygène entre le centre et la périphérie de l'organoïde (figure 40) ouvrent déjà la voie à ce type d'études Fofanova *et al.* (2019).

Figure 40 : schéma du montage afin d'obtenir des organoïdes (ici remplacés en deux dimensions) avec un gradient en dioxygène, d'après Fofanova *et al.* (2019).



De plus, avec le développement des *organoid-on-a-chip* (organoïdes reliés entre eux par des instruments de microfluidique) il va être possible d'étudier des voies métaboliques s'étendant sur différents organes/tissus. Ces avancées sur les animaux vont aussi avoir un impact sur l'humain car beaucoup d'études sont à vocation translationnelle.

2. Les organoïdes dans le champ de la pathologie

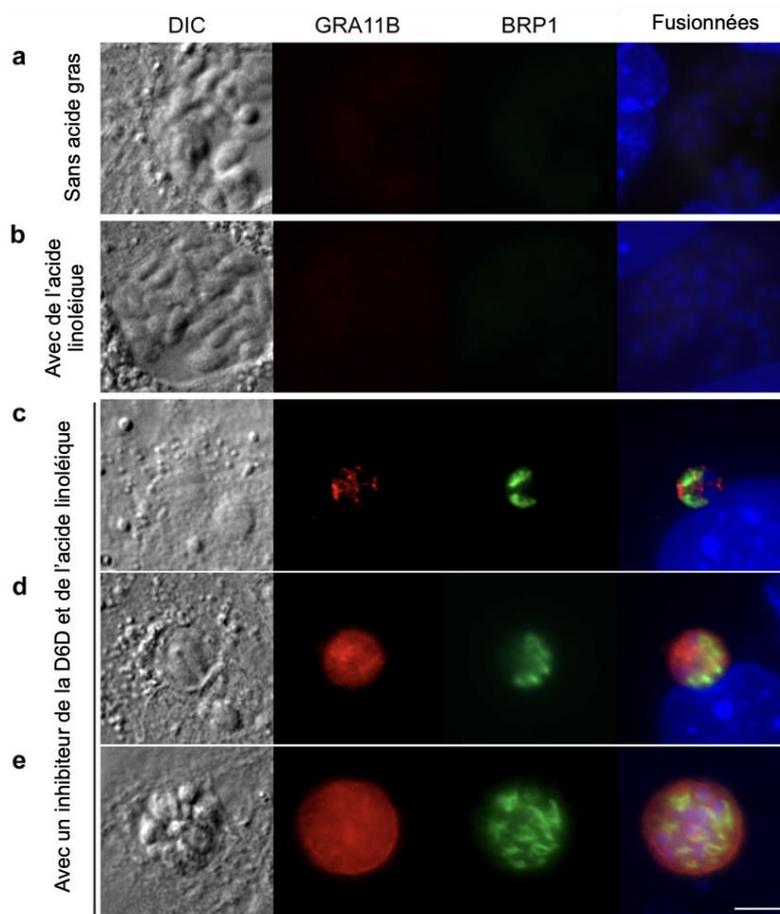
A. Les organoïdes dans le champ des maladies infectieuses

L'équipe de Luo *et al.* (2020) montre que l'infection par le PDCoV se produit bien dans des organoïdes de porc remplacés en deux dimensions. Ils ajoutent que cette infection a lieu préférentiellement dans les cellules possédant les marqueurs SOX9 et villine 1. Cette infection engendre, par ailleurs, des modifications transcriptionnelles notamment dans les gènes liés à l'immunité des muqueuses, antiviraux et marqueurs de cellules souches. L'équipe de Yin *et al.* (2020) montrait, en parallèle, que ce virus infectait préférentiellement les organoïdes jéjunaux et iléaux comparativement à ceux du colon ou du duodénum. Cette équipe démontre que cette différence s'explique par l'expression du récepteur à

l'aminopeptidase N au lieu du récepteur à l'IFN. Les organoïdes se trouvent aussi utiles dans les cultures virales, en effet, Tekes *et al.* (2020) montrent qu'il est possible de cultiver le coronavirus félin sur des organoïdes de chat et Kardia *et al.* (2022) qu'il est possible de faire de même avec un calicivirus chez les lagomorphes. Quah *et al.* (2023) montrent sur leurs organoïdes trachéaux de bovin, qu'une stimulation de la réponse immunitaire innée à l'aide du P3CSK4 (stimulation du TLR 2) a montré une augmentation de l'expression du gène codant pour le transporteur associé à l'apprêtement des antigènes (TAP) ainsi qu'une augmentation de la production d'interleukine-6 (augmentation annulée par l'adjonction de corticoïdes). Néanmoins, cette production n'est pas suffisante pour limiter l'infectiosité du virus.

Concernant la parasitologie, Martorelli Di Genova *et al.* (2019) montrent que le cycle sexué de *T. gondii* nécessitait un taux élevé d'acide linoléique qui était permis par l'absence de delta-6-desaturase (D6D) chez le chat grâce à des organoïdes intestinaux. Ils montrent, en effet, que l'inhibition de la D6D au sein d'organoïdes de souris permettait le cycle sexué du parasite (figure 41). Ainsi, ils ouvrent la voie à une nouvelle compréhension des interactions hôte-pathogène. Par ailleurs, des protocoles harmonisés et concernant plusieurs espèces (humain, souris, porc et poulet) ont été mis sur pied afin d'étudier les infections de *T. gondii* et d'autres protozoaires (Holthaus *et al.*, 2020).

Figure 41 : immunofluorescence de protéines de *T. gondii* au sein d'organoïdes de souris, l'évolution de leur localisation montre que le cycle sexuel est réalisé, d'après Martorelli Di Genova *et al.* (2019). Échelle : 5 µm.



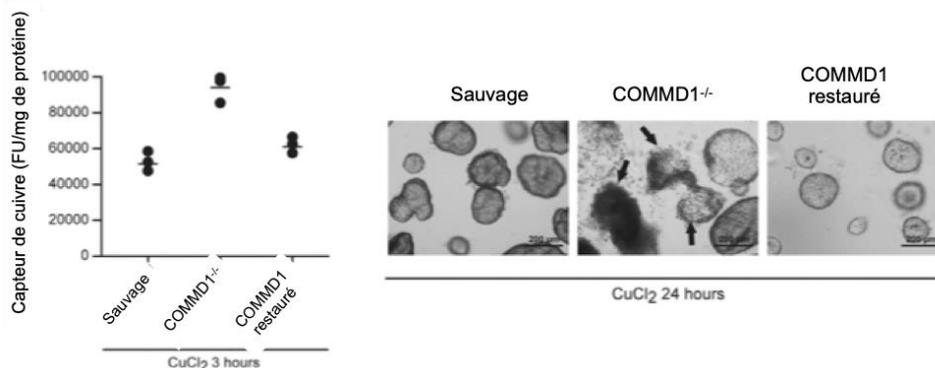
B. Les organoïdes dans le champ des maladies non infectieuses

L'équipe de Van den Bossche *et al.* (2017) montre que l'accumulation de triacylglycérol est la même au sein des organoïdes issus de chiens avec un shunt porto-systémique ou sans shunt. Cela soutient l'hypothèse que l'accumulation de lipides dans le foie lors de shunt porto-systémique n'est pas liée à un défaut primaire de gène mais est plutôt secondaire, possiblement lié à l'ammoniaque présent en plus grand quantité.

Toujours chez le chien, Nantasanti *et al.* (2015) se sont penchés sur une maladie génétique provoquant une anomalie de stockage du cuivre (dont il a déjà été discuté dans la partie concernant les organoïdes de foie), ils ont montré que les organoïdes constituaient un bon modèle de la maladie *in vitro* et qu'une mutagénèse résolvait l'anomalie de stockage au sein des organoïdes (figure 42). En effet, en utilisant un vecteur lentiviral porteur du gène COMMD1 non muté, ils arrivent à rétablir des concentrations en cuivre intra-cellulaires semblables aux organoïdes sans anomalie.

Figure 42 : effet d'une exposition au cuivre sur des organoïdes hépatiques canins issus de foie sain, de foie porteur d'une anomalie génétique rendant le gène COMMD1 inactif ayant ou non subi une mutagenèse dirigée afin de restaurer le gène déficient, d'après Nantasanti *et al.* (2015).

A gauche : mesures du capteur de cuivre montrant que la restauration de COMMD1 permet de retrouver une excrétion de cuivre chez les organoïdes hépatiques de chien. A droite : images de microscopie à fond clair d'organoïdes hépatiques de chien de génotype sauvage, de génotype COMMD1^{-/-} et de génotype muté après une exposition au cuivre de 24 h. Une détérioration des organoïdes COMMD1^{-/-} est clairement notée.



L'équipe d'Elbadawy *et al.* (2022) compare l'expression génétique d'organoïdes de vessies saines et de vessies cancéreuses et montre une différence d'expression dans 227 gènes et notamment les gènes de la transition épithéliale et mésenchymateuse, p53, de l'angiogenèse et dans la voie métabolique de l'homéostasie du cholestérol. Ainsi, les organoïdes peuvent aussi permettre d'explorer les différences d'expression génétique entre des tumeurs et des tissus sains, ce qui peut s'avérer utile dans la recherche des processus de tumorigenèse ou encore dans la compréhension du fonctionnement cellulaire des tumeurs.

C. Les organoïdes dans l'étude de toxiques

L'équipe de Li *et al.* (2019) met déjà un pied dans l'évaluation des conséquences d'un toxique (une mycotoxine) sur l'organisme en prenant le modèle de l'organoïde de porc. En effet, une étude a montré que les contaminations de la nourriture de porcs par des mycotoxines étaient plutôt la règle que l'exception en Espagne (avec jusqu'à 100 % des échantillons contaminés pour certaines mycotoxines) (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2019). Cela pose problème à la fois concernant la filière de production (avec toutes conséquences que peuvent avoir ces toxiques sur les porcs) mais aussi sur la santé publique (à tel point que les mycotoxines figurent parmi les dix plus grands risques publiés par le *Rapid Alert System for Food and Feed*) (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2019).

Un criblage de nombreuses molécules a, par ailleurs, été réalisé par Acharya *et al.* (2020) sur des entéroïdes de poulet (parmi lesquelles le deoxynivalenol, l'entérotoxine ϵ de *S. aureus* et *C. perfringens* ou le LPS de *S. Typhimurium*). Il est donc possible d'observer les effets d'un grand nombre de toxiques sur des organoïdes afin d'en connaître les mécanismes plus finement voire de pouvoir développer des traitements.

L'utilisation des organoïdes comme plateforme pour comprendre les effets des toxiques, a vocation à prendre de l'ampleur comme le montre la multitude d'études qui ont été conduites chez l'humain (Augustyniak *et al.*, 2019).

Il est maintenant clair que les organoïdes peuvent être issus de tissus pathologiques : maladies génétique (Nantasanti *et al.*, 2015), tumorales (Elbadawy *et al.*, 2019) ou même de pathologie générale comme des tissus ischémiés (Stieler Stewart *et al.*, 2018). L'équipe de Lau *et al.* (2020) souligne même que dans le champ de l'oncologie, les organoïdes transplantés sur des souris pour des études *in vivo* s'avèrent être économes financièrement et en termes de temps car il n'est pas nécessaire d'attendre le développement naturel du cancer chez l'individu.

Les organoïdes se sont, de surcroît, avérés être un bon modèle de culture cellulaire *in vitro* dans le champ des pathologies infectieuses. Une groupe de travail a même été créé à l'université d'Utrecht afin de mieux caractériser les entéroïdes de chien qui seraient alors utilisés dans le cadre de l'étude d'affections virales telles que la parvovirose (Meneses *et al.*, 2016). Au-delà du modèle, les organoïdes peuvent s'avérer être de bons supports de cultures pour certains virus comme Kardina *et al.* (2022) l'ont montré avec le calicivirus du lapin. Ramírez-Flores et Knoll (2021) soulignent les avancées qu'ont permis les organoïdes chez l'humain (jusqu'aux avancées sur les pandémies récentes), ce qui laisse peu de place au doute quant à leur futur dans ce champ chez les animaux domestiques et de production.

Au-delà des pathologies vétérinaires, les organoïdes peuvent servir de fondement pour des études translationnelles vers l'humain comme le soulignent Olayanju *et al.* (2019). Ces études sont déjà en train de se développer comme le montre l'étude sur les glandes sous-muqueuses de porc dont il a été discuté au début de ce travail (von Furstenberg *et al.*, 2017).

3. Les organoïdes dans le champ de la thérapeutique

A. Organoïdes et médecine régénérative

Agopian *et al.* (2009) montrent que des allogreffes d'entéroïdes de fœtus de chien vers leur mère sont possibles chez le chien et qu'elles se développent en muqueuse. L'équipe de Kruitwagen *et al.* (2020) va même plus loin en restaurant le gène *COMMD1* (dont la présence d'allèles anormaux provoque des anomalies de stockage du cuivre dans le foie, comme expliqué plus haut) à des organoïdes issus de chiens naturellement mutés pour ce gène afin de réaliser des greffes autologues. Les organoïdes greffés ont montré une survie jusqu'à deux ans sans pour autant résoudre la maladie de l'animal.

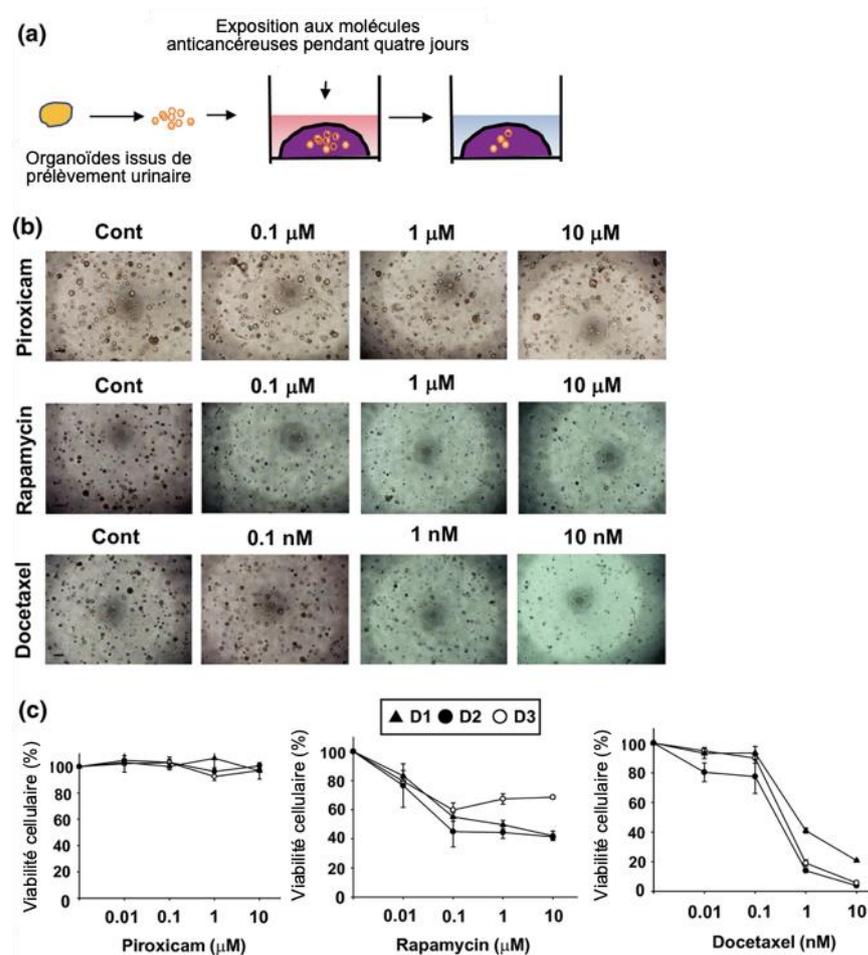
Chez les animaux de production, le porc a été étudié comme modèle translationnel et a permis de montrer que des greffes autologues d'organoïdes de foie étaient possibles (Tsuchida *et al.*, 2020). Cela est encourageant en ce qui concerne toutes les affections hépatiques nécessitant des greffes.

Les organoïdes auront donc vraisemblablement un réel impact sur la médecine régénératrice (Meneses *et al.*, 2016). Chez l'humain des études montrent notamment la voie vers des améliorations pour les diabétiques (Yoshihara *et al.*, 2020).

B. Organoïdes et thérapies anticancéreuses

L'équipe d'Usui *et al.* (2017) teste en premier des thérapies anticancéreuses (molécules et radiothérapie) sur des organoïdes de tumeurs prostatiques canines issus de prélèvements urinaires (figure 43). Ils étudient le piroxicam (anti-inflammatoire non stéroïdien), la rapamycine (inhibiteur de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) qui fait partie de la voie phosphoinositide-3 kinase/protéine kinase B (PI3K/Akt), inhibée par le gène suppresseur de tumeur de l'homologue de la phosphatase et tensine (PTEN)) et le docetaxel (stabilisateur du cytosquelette, prévenant la mitose et favorisant la mort cellulaire par la voie p53 des cellules en division). Une relation dose-dépendante des médicaments anticancéreux est démontrée cependant avec des singularités interindividuelles. Les résistances à la rapamycine s'expliquent par une baisse de la phosphorylation d'Akt chez les organoïdes par rapports aux autres cellules. La résistance d'un organoïde au docetaxel s'explique par la présence en plus grande quantité de beta-III tubuline et une diminution de p53 chez cet organoïde en particulier. La radiothérapie montre de bons résultats, dose-dépendants. Elle montre, par ailleurs, l'avantage d'augmenter son efficacité à l'aide d'autres agents (même sur les organoïdes ayant des résistances à d'autres anticancéreux). Cela montre l'utilité des organoïdes dans le cadre de la médecine individuelle, encore plus ici avec une telle facilité de prélèvement (prélèvement urinaire).

Figure 43 : effets des différentes molécules anti-cancéreuses sur des organoïdes prostatiques tumoraux issus de prélèvement urinaire, d'après Usui *et al.* (2017). (a) Schéma de l'expérience. (b) Microscopie à fond clair des organoïdes en fonction de la dose de molécule. (c) Viabilité cellulaire (%) en fonction de la dose de la molécule et du patient d'où provient les organoïdes.



Deux études ont évalué l'effet de différentes molécules (inhibiteur non sélectif de COX : piroxicam, antimétabolite de la pyrimidine : gemcitabine et agent intercalant de l'ADN : cisplatine) sur la viabilité cellulaire des organoïdes tumoraux de vessie de chien (Elbadawy *et al.*, 2019, 2022). Ces essais ont été conduits sur quatre prélèvements au maximum donc la puissance statistique est faible. Néanmoins, en monothérapie, seul le cisplatine semble avoir un réel effet dose dépendant sur la viabilité cellulaire. En revanche, en bithérapie, la réponse des organoïdes semble être propre à chaque culture. Cela appuie donc l'avantage des organoïdes dans le cadre du choix des thérapies anticancéreuses. Cette équipe a testé d'autres molécules anticancéreuses (vinblastine, mitoxantrone, carboplatine et docyribicine) sur des organoïdes de vessies saines de chien. Ils montrent alors qu'un effet dose-dépendant s'opère pour tous les anticancéreux testés mais que des variations interindividuelles de cet effet sont observables ce qui renforce les résultats obtenus sur les organoïdes issus de vessies tumorales.

C. Organoïdes et industrie du médicament

Comme l'indique Deleu (2008), le médicament vétérinaire est soumis à une exigence proche de celui de la pharmacie humaine tout en ayant des niveaux de bénéfices bien moindre (le marché du médicament vétérinaire représente 4 % de celui du médicament humain). Par ailleurs, le développement de tels médicaments est confronté à un grand nombre d'espèces et d'indications différentes. Les organoïdes peuvent donc répondre à un besoin de modèles supplémentaires et plus complexes que les cultures cellulaires en deux dimensions comme le soulignent Olayanju *et al.* (2019). En effet, les organoïdes sont issus de tissus cibles (malades ou sains selon ce qui est à étudier), ils sont stables génétiquement et potentiellement préservables longtemps *in vitro* (laissant la place à des expérimentations de longue durée et répétables), ils préservent des fonctions perdues en 2D tout en réduisant l'expérimentation animale. Les organoïdes, dans ce contexte, peuvent donc être un nouveau modèle dans la recherche et le criblage de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

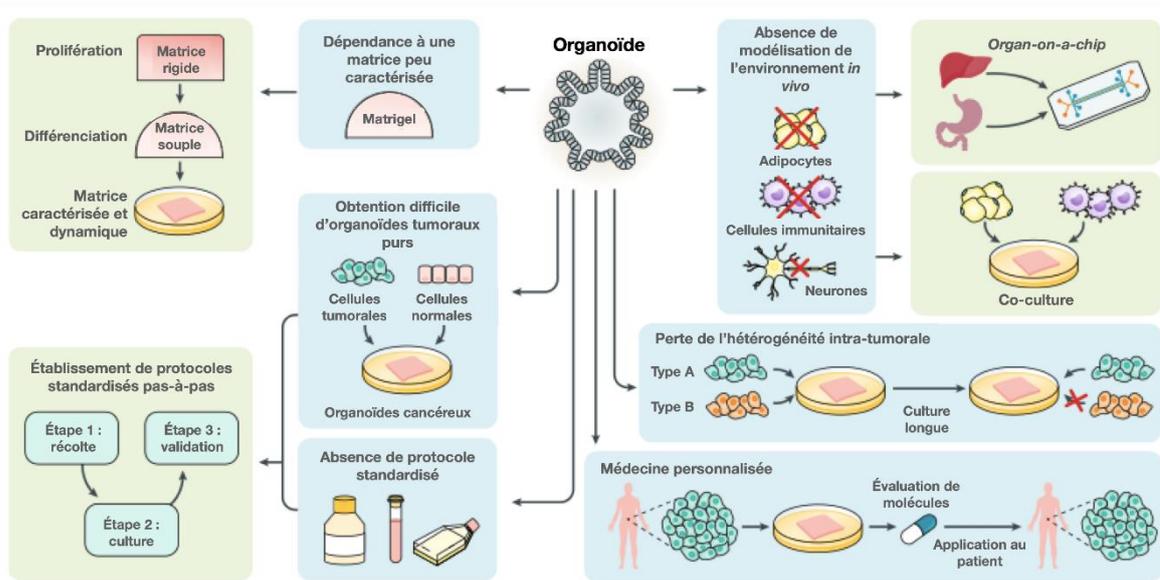
Par ailleurs, les organoïdes participent au développement de la médecine personnalisée. Un individu souffrant d'une pathologie concernant un organe donné pourrait faire l'objet d'un prélèvement afin de produire des organoïdes dudit organe *in vitro*. À ce stade, un certain nombre de traitements pourront alors être opérés sur ces organoïdes afin de déterminer celui le plus efficace chez cet individu en particulier. Dans le domaine de l'oncologie vétérinaire des études se sont déjà dirigées dans cette voie (Usui *et al.*, 2017 ; Elbadawy *et al.*, 2022, 2019) mais les études en médecine humaine sont déjà bien plus avancées à ce sujet (Li *et al.*, 2020).

4. Les limites de la culture cellulaire d'organoïdes

Bien que les organoïdes soient, comme nous avons pu le constater tout au long de ce travail, très prometteurs, ils restent tout de même une méthode récente avec encore beaucoup de limites (Lau *et al.*, 2020 ; Li *et al.*, 2020). La première se trouvant dans leurs protocoles de culture. En effet, comme souligné plus haut dans ce travail, les protocoles sont distincts d'un laboratoire à l'autre, d'une espèce à l'autre et d'un organe à l'autre et chaque équipe tente de changer un facteur de croissance, une température d'incubation, la matrice tridimensionnelle etc. Cela entraîne donc un certain nombre de biais quant à la comparaison de résultats obtenus dans deux laboratoires différents. Une standardisation de ces protocoles ainsi que des matières premières gagnerait à être considérée (cela a déjà été engagé par exemple dans le cadre de l'utilisation d'organoïdes intestinaux dans la recherche sur *T. gondii* (Holthaus *et al.*, 2020)).

Ensuite, les organoïdes ne représentent, à l'heure actuelle, qu'un échantillon de la diversité tissulaire d'un organe. En effet, les valences immunitaires, vasculaires, conjonctives et nerveuses manquent bien souvent à l'appel au sein des organoïdes. De plus, lorsqu'il s'agit d'organoïdes tumoraux, l'échantillonnage des cellules sélectionnées pour les produire entraîne une perte de diversité. Tout cela rend le modèle organoïde d'office parcellaire quant aux interprétations qu'il est possible d'en tirer. Néanmoins, le développement d'organoïdes en co-culture et de la microfluidique qui permet de relier plusieurs organoïdes entre eux, verra sûrement tomber cette limite dans le futur. La figure 44 schématise les différentes limites et leurs potentielles solutions.

Figure 44 : schéma des différentes limites que rencontrent les organoïdes (en bleu) et des moyens qui pourraient permettre de les dépasser (en vert), d'après Lau *et al.* (2020).



Conclusion

Les organoïdes constituent un modèle de culture cellulaire *in vitro* en plein essor chez les animaux de production et de compagnie. La littérature est très prolifique mais s'intéresse principalement, pour l'heure, à la caractérisation du modèle organoïde au sein des différentes espèces et organes. Cette caractérisation prend la forme d'une part, d'une analyse structurelle des organoïdes et comprend, d'autre part, une analyse fonctionnelle, ce qui fait la richesse du modèle. Les organoïdes obtenus à partir de l'intestin sont les mieux caractérisés. Néanmoins, les études conduites chez l'humain et la souris contribueront très certainement à élargir le champ des tissus et des espèces à partir desquels des organoïdes sont formés. En effet, les protocoles de production d'organoïdes chez ces espèces sont bien souvent le fondement de ceux chez d'autres animaux. Le développement d'organoïdes d'espèces de production et de compagnie permettra d'élargir ce modèle de culture plus largement au sein d'autres espèces. Par ailleurs, même s'ils sont encore en cours de caractérisation, les organoïdes permettent déjà de faire progresser un certain nombre de champs de recherche. Le respect de la structure des organes permet une étude plus proche des phénomènes se déroulant *in vivo* notamment en infectiologie ou dans l'étude du microbiote. L'apport d'au moins une partie de la fonction des tissus offre de nouvelles perspectives en physiologie et en pathologie. En médecine humaine, les chercheurs en oncologie se sont déjà emparés de cette technologie, notamment dans le cadre de thérapies de précision où des traitements anticancéreux sont ainsi testés sur des organoïdes issus de tumeurs de patients pour proposer un traitement personnalisé et optimisé. Des enrichissements du modèle sont, de surcroît, en développement. Ainsi, des co-cultures de différents types cellulaires permettent de se rapprocher encore plus des tissus *in vivo* ; des systèmes de microfluidique permettent de relier plusieurs organoïdes entre eux et de pouvoir ainsi mimer des interactions entre différents tissus.

De façon remarquable, ces avancées sont en partie portées par des considérations éthiques. En offrant un modèle possiblement supérieur aux cultures cellulaires standards, les organoïdes permettent de réduire l'utilisation de modèles animaux, sans pour autant les exclure du domaine de la recherche biomédicale. En France, le groupement d'intérêt scientifique FC3R finance des projets dans ce sens et sur leur première campagne en 2023, les organoïdes ont représenté 25 % des projets financés (FC3R, 2023). Ce résultat éclaire l'engouement des scientifiques pour le développement de cet outil complémentaire, bien inséré dans le continuum des modèles sur lesquels ils fondent les travaux de validation de leurs hypothèses.

Liste des références bibliographiques

- ACHARYA, M., ARSI, K., DONOGHUE, A.M., *et al.* (2020) Production and characterization of avian crypt-villus enteroids and the effect of chemicals. *BMC Veterinary Research* vol. 16, n° 1, p. 179. [<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02397-1>]
- ADEGBOLA, S., MOORE, J., SAHNAN, K., *et al.* (2017) P005 Establishing a porcine model to translate anorectal stem cell organoid models to elucidate the aetiology of perianal Crohn's fistulae. *Journal of Crohn's and Colitis* vol. 11, suppl_1, p. S81-S82. [<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx002.131>]
- AGOPIAN, V.G., CHEN, D.C., AVANSINO, J.R., *et al.* (2009) Intestinal stem cell organoid transplantation generates neomucosa in dogs. *Journal of Gastrointestinal Surgery* vol. 13, n° 5, p. 971-982. [<https://doi.org/10.1007/s11605-009-0806-x>]
- AISENBREY, E.A., MURPHY, W.L. (2020) Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews. Materials* vol. 5, n° 7, p. 539-551. [<https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>]
- ARROYO-MANZANARES, N., RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, V., ARENAS-FERNÁNDEZ, P., *et al.* (2019) Occurrence of Mycotoxins in Swine Feeding from Spain. *Toxins* vol. 11, n° 6, p. 342. [<https://doi.org/10.3390/toxins11060342>]
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., RAND, M.D., LAKE, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* vol. 284, n° 5415, p. 770-776. [<https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>]
- BAR-EL DADON, S., REIFEN, R. (2017) Vitamin A and the epigenome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* vol. 57, n° 11, p. 2404-2411. [<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1060940>]
- BEAUMONT, M., PAËS, C., MUSSARD, E., *et al.* (2020) Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* vol. 11, n° 5, p. 1268-1286. [<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747335>]
- BONGSO, A., RICHARDS, M. (2004) History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* vol. 18, n° 6, p. 827-842. [<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.09.002>]
- BOSMAN, F.T., STAMENKOVIC, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology* vol. 200, n° 4, p. 423-428. [<https://doi.org/10.1002/path.1437>]
- BOURDON, G., CADORET, V., CHARPIGNY, G., *et al.* (2021) Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies. *Veterinary Research* vol. 52, n° 1, p. 42. [<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00891-w>]
- CHAM, T.-C., IBTISHAM, F., FAYAZ, M.A., *et al.* (2021) Generation of a Highly Biomimetic Organoid, Including Vasculature, Resembling the Native Immature Testis Tissue. *Cells* vol. 10, n° 7, p. 1696. [<https://doi.org/10.3390/cells10071696>]
- CHANDRA, L., BORCHERDING, D.C., KINGSBURY, D., *et al.* (2019) Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology. *BMC Biology* vol. 17, n° 1, p. 33. [<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0652-6>]
- CHEN, T.-C., NEUPANE, M., CHIEN, S.-J., *et al.* (2019) Characterization of Adult Canine Kidney Epithelial Stem Cells That Give Rise to Dome-Forming Tubular Cells. *Stem*

- Cells and Development* vol. 28, n° 21, p. 1424-1433. [https://doi.org/10.1089/scd.2019.0049]
- COCOLA, C., MOLGORA, S., PISCITELLI, E., *et al.* (2017) FGF2 and EGF Are Required for Self-Renewal and Organoid Formation of Canine Normal and Tumor Breast Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 118, n° 3, p. 570-584. [https://doi.org/10.1002/jcb.25737]
- COHEN, J., ELDER, K. (2007) Human Preimplantation Embryo Selection. Boca Raton, CRC Press.
- CORTEZ, J., LEIVA, B., TORRES, C.G., *et al.* (2022) Generation and Characterization of Bovine Testicular Organoids Derived from Primary Somatic Cell Populations. *Animals* vol. 12, n° 17, p. 2283. [https://doi.org/10.3390/ani12172283]
- DELEU, A. (2008) Les enjeux stratégiques pour l'industrie du médicament vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* vol. 161, n° 1, p. 19-22. [https://doi.org/10.4267/2042/47919]
- DERRICOTT, H., LUU, L., FONG, W.Y., *et al.* (2019) Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell and Tissue Research* vol. 375, n° 2, p. 409-424. [https://doi.org/10.1007/s00441-018-2924-9]
- ELBADAWY, M., FUJISAKA, K., YAMAMOTO, H., *et al.* (2022) Establishment of an experimental model of normal dog bladder organoid using a three-dimensional culture method. *Biomedicine & Pharmacotherapy* vol. 151, p. 113105. [https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113105]
- ELBADAWY, M., USUI, T., MORI, T., *et al.* (2019) Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Science* vol. 110, n° 9, p. 2806-2821. [https://doi.org/10.1111/cas.14118]
- ENGEVIK, A.C., COUTTS, A.W., KAJI, I., *et al.* (2020) Editing Myosin VB Gene to Create Porcine Model of Microvillus Inclusion Disease, With Microvillus-Lined Inclusions and Alterations in Sodium Transporters. *Gastroenterology* vol. 158, n° 8, p. 2236-2249.e9. [https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.034]
- FABER, M.N., SMITH, D., PRICE, D.R.G., *et al.* (2022) Development of Bovine Gastric Organoids as a Novel In Vitro Model to Study Host-Parasite Interactions in Gastrointestinal Nematode Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 12, p. 904606. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.904606]
- FC3R (2023) Lauréats AAP : Remplacement : alternatives aux modèles animaux et produits d'origine animale en recherche. *In FC3R*. [https://www.fc3r.com/remplacement-alternatives-aux-modeles-animaux-2-2022.html] (consulté le 24/10/2023).
- FENNEMA, E., RIVRON, N., ROUWKEMA, J., *et al.* (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* vol. 31, n° 2, p. 108-115. [https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003]
- FERRANDIS VILA, M., TRUDEAU, M.P., HUNG, Y.-T., *et al.* (2018) Dietary fiber sources and non-starch polysaccharide-degrading enzymes modify mucin expression and the immune profile of the swine ileum. *PLoS One* vol. 13, n° 11, p. e0207196. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207196]
- FINOT, L., CHANAT, E., DESSAUGE, F. (2021) Mammary gland 3D cell culture systems in farm animals. *Veterinary Research* vol. 52, n° 1, p. 78. [https://doi.org/10.1186/s13567-021-00947-5]
- FOFANOVA, T., STEWART, C., AUCHTUNG, J., *et al.* (2019) A novel human enteroid-anaerobe co-culture system to study microbial-host interaction under physiological hypoxi. *bioRxiv* [https://doi.org/10.1101/555755]

- GABRIEL, V., ZDYRSKI, C., SAHOO, D.K., *et al.* (2022) Standardization and Maintenance of 3D Canine Hepatic and Intestinal Organoid Cultures for Use in Biomedical Research. *Journal of Visualized Experiments* n° 179. [<https://doi.org/10.3791/63515>]
- GONZALEZ, L.M., WILLIAMSON, I., PIEDRAHITA, J.A., *et al.* (2013) Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PloS One* vol. 8, n° 6, p. e66465. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066465>]
- HAMILTON, C.A., YOUNG, R., JAYARAMAN, S., *et al.* (2018) Development of in vitro enteroids derived from bovine small intestinal crypts. *Veterinary Research* vol. 49, n° 1, p. 54. [<https://doi.org/10.1186/s13567-018-0547-5>]
- HOAREAU, L., ENGELSEN, A.S.T., AANERUD, M., *et al.* (2021) Induction of alveolar and bronchiolar phenotypes in human lung organoids. *Physiological Reports* vol. 9, n° 11, p. e14857. [<https://doi.org/10.14814/phy2.14857>]
- HOLLAND, M.S., STASKO, J.A., HOLLAND, R.E. (2007) Influence of extracellular matrix on bovine mammary gland progenitor cell growth and differentiation. *American Journal of Veterinary Research* vol. 68, n° 5, p. 476-482. [<https://doi.org/10.2460/ajvr.68.5.476>]
- HOLTHAUS, D., DELGADO-BETANCOURT, E., AEBISCHER, T., *et al.* (2020) Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of *Toxoplasma gondii* and Other Protozoan Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10, p. 610368. [<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368>]
- HOU, Y., WU, G. (2018) L-Glutamate nutrition and metabolism in swine. *Amino Acids* vol. 50, n° 11, p. 1497-1510. [<https://doi.org/10.1007/s00726-018-2634-3>]
- HUGHES, C.S., POSTOVIT, L.M., LAJOIE, G.A. (2010) Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* vol. 10, n° 9, p. 1886-1890. [<https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>]
- INGLEBERT, M., DETTWILER, M., HAHN, K., *et al.* (2022) A living biobank of canine mammary tumor organoids as a comparative model for human breast cancer. *Scientific Reports* vol. 12, n° 1, p. 18051. [<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21706-2>]
- JANKOVIC, J., DETTWILER, M., FERNÁNDEZ, M.G., *et al.* (2021) Validation of Immunohistochemistry for Canine Proteins Involved in Thyroid Iodine Uptake and Their Expression in Canine Follicular Cell Thyroid Carcinomas (FTCs) and FTC-Derived Organoids. *Veterinary Pathology* vol. 58, n° 6, p. 1172-1180. [<https://doi.org/10.1177/03009858211018813>]
- JIN, L., FENG, T., SHIH, H.P., *et al.* (2013) Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 110, n° 10, p. 3907-3912. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1301889110>]
- KARDIA, E., FAKHRI, O., PAVY, M., *et al.* (2022) Hepatobiliary organoids derived from leporids support the replication of hepatotropic lagoviruse. bioRxiv [<https://doi.org/10.1101/2022.04.07.487566>]
- KARDIA, E., FRESE, M., SMERTINA, E., *et al.* (2021) Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers. *Scientific Reports* vol. 11, n° 1, p. 5401. [<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w>]
- KARDIA, E., FRESE, M., STRIVE, T., *et al.* (2020) Isolation, culture and maintenance of rabbit intestinal organoids, and organoid-derived cell monolayers. bioRxiv [<https://doi.org/10.1101/2020.07.15.205328>]

- KHALIL, H.A., LEI, N.Y., BRINKLEY, G., *et al.* (2016) A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell and Tissue Research* vol. 365, n° 1, p. 123-134. [https://doi.org/10.1007/s00441-016-2367-0]
- KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R. (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology* vol. 15, n° 5, p. 378-386. [https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004]
- KLEINMAN, H.K., MCGARVEY, M.L., HASSELL, J.R., *et al.* (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* vol. 25, n° 2, p. 312-318. [https://doi.org/10.1021/bi00350a005]
- KOLTES, D.A., GABLER, N.K. (2016) Characterization of porcine intestinal enteroid cultures under a lipopolysaccharide challenge¹. *Journal of Animal Science* vol. 94, suppl_3, p. 335-339. [https://doi.org/10.2527/jas.2015-9793]
- KOZLOWSKI, M., GAJEWSKA, M., MAJEWSKA, A., *et al.* (2009) Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *Journal of Physiology and Pharmacology* vol. 60 Suppl 1, p. 5-14.
- KOZLOWSKI, M.T., CROOK, C.J., KU, H.T. (2021) Towards organoid culture without Matrigel. *Communications Biology* vol. 4, n° 1, p. 1387. [https://doi.org/10.1038/s42003-021-02910-8]
- KRUITWAGEN, H.S., OOSTERHOFF, L.A., VAN WOLFEREN, M.E., *et al.* (2020) Long-Term Survival of Transplanted Autologous Canine Liver Organoids in a COMMD1-Deficient Dog Model of Metabolic Liver Disease. *Cells* vol. 9, n° 2, p. 410. [https://doi.org/10.3390/cells9020410]
- KRUITWAGEN, H.S., OOSTERHOFF, L.A., VERNOOIJ, I.G.W.H., *et al.* (2017) Long-Term Adult Feline Liver Organoid Cultures for Disease Modeling of Hepatic Steatosis. *Stem Cell Reports* vol. 8, n° 4, p. 822-830. [https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.015]
- LANCASTER, M.A., KNOBLICH, J.A. (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* vol. 345, n° 6194, p. 1247125. [https://doi.org/10.1126/science.1247125]
- LARA-GONZALEZ, E., WITTIG, O., DIAZ-SOLANO, D., *et al.* (2023) 3D organoid modeling of extramedullary hematopoiesis. *The International Journal of Artificial Organs* vol. 46, n° 1, p. 29-39. [https://doi.org/10.1177/03913988221136144]
- LAU, H.C.H., KRANENBURG, O., XIAO, H., *et al.* (2020) Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* vol. 17, n° 4, p. 203-222. [https://doi.org/10.1038/s41575-019-0255-2]
- LAWSON, E.F., GHOSH, A., BLANCH, V., *et al.* (2023) Establishment and characterization of oviductal organoids from farm and companion animals†. *Biology of Reproduction* vol. 108, n° 6, p. 854-865. [https://doi.org/10.1093/biolre/ioad030]
- LEE, D.F., SALGUERO, F.J., GRAINGER, D., *et al.* (2018) Isolation and characterisation of alveolar type II pneumocytes from adult bovine lung. *Scientific Reports* vol. 8, n° 1, p. 11927. [https://doi.org/10.1038/s41598-018-30234-x]
- LI, J., LI, J., ZHANG, S.Y., *et al.* (2018) Culture and characterization of chicken small intestinal crypts. *Poultry Science* vol. 97, n° 5, p. 1536-1543. [https://doi.org/10.3382/ps/pey010]
- LI, L., FU, F., GUO, S., *et al.* (2019) Porcine Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response. *Journal of Virology* vol. 93, n° 5, p. e01682-18. [https://doi.org/10.1128/JVI.01682-18]

- LI, L., XIE, T. (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 21, p. 605-631. [https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525]
- LI, X., ZHENG, M., XU, B., *et al.* (2021) Generation of offspring-producing 3D ovarian organoids derived from female germline stem cells and their application in toxicological detection. *Biomaterials* vol. 279, p. 121213. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121213]
- LI, X.-G., ZHU, M., CHEN, M.-X., *et al.* (2019) Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity via suppression of the Wnt/ β -catenin pathway. *Toxicology Letters* vol. 305, p. 19-31. [https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.008]
- LI, Yaqi, TANG, P., CAI, S., *et al.* (2020) Organoid based personalized medicine: from bench to bedside. *Cell Regeneration (London, England)* vol. 9, n° 1, p. 21. [https://doi.org/10.1186/s13619-020-00059-z]
- LI, Yang, YANG, N., CHEN, J., *et al.* (2020) Next-Generation Porcine Intestinal Organoids: an Apical-Out Organoid Model for Swine Enteric Virus Infection and Immune Response Investigations. *Journal of Virology* vol. 94, n° 21, p. e01006-20. [https://doi.org/10.1128/JVI.01006-20]
- LIU, G., DAVID, B.T., TRAWCZYNSKI, M., *et al.* (2020) Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 16, n° 1, p. 3-32. [https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x]
- LUO, H., ZHENG, J., CHEN, Y., *et al.* (2020) Utility Evaluation of Porcine Enteroids as PDCoV Infection Model in vitro. *Frontiers in Microbiology* vol. 11, p. 821. [https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00821]
- MARSEE, A., ROOS, F.J.M., VERSTEGEN, M.M.A., *et al.* (2021) Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell* vol. 28, n° 5, p. 816-832. [https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.005]
- MARTORELLI DI GENOVA, B., WILSON, S.K., DUBEY, J.P., *et al.* (2019) Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for Toxoplasma sexual reproduction. *PLoS Biology* vol. 17, n° 8, p. e3000364. [https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364]
- MENESES, A.M.C., SCHNEEBERGER, K., KRUITWAGEN, H.S., *et al.* (2016) Intestinal Organoids-Current and Future Applications. *Veterinary Sciences* vol. 3, n° 4, p. 31. [https://doi.org/10.3390/vetsci3040031]
- MUSSARD, E., POUZET, C., HELIES, V., *et al.* (2020) Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche in vitro with pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium. *Stem Cell Research* vol. 48, p. 101980. [https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980]
- NA, S.W., GUAN, L.L. (2022) Understanding the role of rumen epithelial host-microbe interactions in cattle feed efficiency. *Animal Nutrition* vol. 10, p. 41-53. [https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.04.002]
- NAKAGAWA, H., KASAGI, Y., KARAKASHEVA, T.A., *et al.* (2020) Modeling Epithelial Homeostasis and Reactive Epithelial Changes in Human and Murine Three-Dimensional Esophageal Organoids. *Current Protocols in Stem Cell Biology* vol. 52, n° 1, p. e106. [https://doi.org/10.1002/cpsc.106]
- NANTASANTI, S., SPEE, B., KRUITWAGEN, H.S., *et al.* (2015) Disease Modeling and Gene Therapy of Copper Storage Disease in Canine Hepatic Organoids. *Stem Cell Reports* vol. 5, n° 5, p. 895-907. [https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.002]
- OLAYANJU, A., JONES, L., GRECO, K., *et al.* (2019) Application of porcine gastrointestinal organoid units as a potential in vitro tool for drug discovery and development. *Journal of Applied Toxicology* vol. 39, n° 1, p. 4-15. [https://doi.org/10.1002/jat.3641]

- OOST, M.J., IJAZ, A., VAN HAARLEM, D.A., *et al.* (2022) Chicken-derived RSPO1 and WNT3 contribute to maintaining longevity of chicken intestinal organoid cultures. *Scientific Reports* vol. 12, n° 1, p. 10563. [<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14875-7>]
- PAIN, B., BAQUERRE, C., COULPIER, M. (2021) Cerebral organoids and their potential for studies of brain diseases in domestic animals. *Veterinary Research* vol. 52, n° 1, p. 65. [<https://doi.org/10.1186/s13567-021-00931-z>]
- PATRÍCIO, D., SANTIAGO, J., MANO, J.F., *et al.* (2023) Organoids of the male reproductive system: Challenges, opportunities, and their potential use in fertility research. *WIREs Mechanisms of Disease* vol. 15, n° 2, p. e1590. [<https://doi.org/10.1002/wsbm.1590>]
- PEREIRA, E.C. (2020) Establishment and characterization of canine pancreatic organoids. Thèse en Master Santé et production animales en Amazonie, Université fédérale rurale d'Amazonie, Belém
- PIERZCHALSKA, M., GRABACKA, M., MICHALIK, M., *et al.* (2012) Prostaglandin E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *BioTechniques* vol. 52, n° 5, p. 307-315. [<https://doi.org/10.2144/0000113851>]
- PIERZCHALSKA, M., PANEK, M., CZYRNEK, M., *et al.* (2019) The Three-Dimensional Culture of Epithelial Organoids Derived from Embryonic Chicken Intestine. *Methods in Molecular Biology* vol. 1576, p. 135-144. [https://doi.org/10.1007/7651_2016_15]
- PIERZCHALSKA, M., PANEK, M., CZYRNEK, M., *et al.* (2017) Probiotic Lactobacillus acidophilus bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and myofibroblasts. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* vol. 53, p. 7-18. [<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.06.002>]
- POWELL, R.H., BEHNKE, M.S. (2017) WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biology Open* vol. 6, n° 5, p. 698-705. [<https://doi.org/10.1242/bio.021717>]
- QUAH, P.S., TRAN, B.M., CORBIN, V.D.A., *et al.* (2023) Development of Matrix-Embedded Bovine Tracheal Organoids to Study the Innate Immune Response against Bovine Respiratory Disease. *Organoids* vol. 2, n° 2, p. 82-101. [<https://doi.org/10.3390/organoids2020007>]
- RAMÍREZ-FLORES, C.J., KNOLL, L.J. (2021) Breakthroughs in microbiology made possible with organoids. *PLoS Pathogens* vol. 17, n° 11, p. e1010080. [<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010080>]
- RATAJCZAK, M.Z., RATAJCZAK, J., KUCIA, M. (2019) Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circulation Research* vol. 124, n° 2, p. 208-210. [<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314287>]
- RESENDE, T.P., MEDIDA, R.L., VANNUCCI, F.A., *et al.* (2020) Evaluation of swine enteroids as in vitro models for Lawsonia intracellularis infection^{1,2}. *Journal of Animal Science* vol. 98, n° 2, p. skaa011. [<https://doi.org/10.1093/jas/skaa011>]
- RILEY, L.G., GARDINER-GARDEN, M., THOMSON, P.C., *et al.* (2010) The influence of extracellular matrix and prolactin on global gene expression profiles of primary bovine mammary epithelial cells in vitro. *Animal Genetics* vol. 41, n° 1, p. 55-63. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01964.x>]
- ROSSI, G., MANFRIN, A., LUTOLF, M.P. (2018) Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics* vol. 19, n° 11, p. 671-687. [<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>]
- SAKALEM, M.E., DE SIBIO, M.T., DA SILVA DA COSTA, F.A., *et al.* (2021) Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and

- medicine. *Biotechnology Journal* vol. 16, n° 5, p. e2000463. [https://doi.org/10.1002/biot.202000463]
- SATO, T., VRIES, R.G., SNIPPERT, H.J., *et al.* (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* vol. 459, n° 7244, p. 262-265. [https://doi.org/10.1038/nature07935]
- SCHEEMAERKER, S., CAMPOS, M., INGLEBERT, M., *et al.* (2022) Organoids of canine medullary thyroid carcinoma and feline thyroid adenomatous hyperplasia. *ACVIM Forum* 2022, 22-26 juin 2022, Austin, Texas URL: <https://www.vin.com/doc/?id=10362412>
- SCHEEMAERKER, S., INGLEBERT, M., DAMINET, S., *et al.* (2023) Organoids of patient-derived medullary thyroid carcinoma: The first milestone towards a new in vitro model in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 21, n° 1, p. 111-122. [https://doi.org/10.1111/vco.12872]
- SCHOTANUS, B.A., NANTASANTI, S., HUCH, M., *et al.* (2014) P610 Wnt and notch regulate proliferation, migration and differentiation of human hepatic progenitor cells and canine liver organoids. *Journal of Hepatology* vol. 1 Supplement, n° 60, p. S272. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278(14)60772-8]
- SHI, M., MCCRACKEN, K.W., PATEL, A.B., *et al.* (2023) Human ureteric bud organoids recapitulate branching morphogenesis and differentiate into functional collecting duct cell types. *Nature Biotechnology* vol. 41, n° 2, p. 252-261. [https://doi.org/10.1038/s41587-022-01429-5]
- SMITH, D., PRICE, D.R.G., BURRELLS, A., *et al.* (2021) The Development of Ovine Gastric and Intestinal Organoids for Studying Ruminant Host-Pathogen Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 11, p. 733811. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.733811]
- STEWART, A.S., FREUND, J.M., GONZALEZ, L.M. (2018) Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Veterinary Journal* vol. 50, n° 2, p. 241-248. [https://doi.org/10.1111/evj.12734]
- STIELER STEWART, A., FREUND, J.M., BLIKSLAGER, A.T., *et al.* (2018) Intestinal Stem Cell Isolation and Culture in a Porcine Model of Segmental Small Intestinal Ischemia. *Journal of Visualized Experiments* n° 135, p. 57647. [https://doi.org/10.3791/57647]
- TAJIMA, A., PRADHAN, I., TRUCCO, M., *et al.* (2016) Restoration of Thymus Function with Bioengineered Thymus Organoids. *Current Stem Cell Reports* vol. 2, n° 2, p. 128-139. [https://doi.org/10.1007/s40778-016-0040-x]
- TALHOUK, R.S., NEISWANDER, R.L., SCHANBACHER, F.L. (1998) Effect of substratum on growth, cell morphology and lactoferrin synthesis and secretion in bovine mammary cell culture. *Tissue & Cell* vol. 30, n° 2, p. 226-235. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166(98)80071-2]
- TEKES, G., EHMANN, R., BOULANT, S., *et al.* (2020) Development of Feline Ileum- and Colon-Derived Organoids and Their Potential Use to Support Feline Coronavirus Infection. *Cells* vol. 9, n° 9, p. 2085. [https://doi.org/10.3390/cells9092085]
- THOMPSON, R. (2020) Endometrial tissue cryopreservation and organoid culture from domestic and endangered equids. Thèse de doctorat en philosophie, University of Tennessee
- THOMPSON, R.E., MEYERS, M.A., PREMANANDAN, C., *et al.* (2023) Generation and cryopreservation of feline oviductal organoids. *Theriogenology* vol. 196, p. 167-173. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.020]
- THOMPSON, R.E., MEYERS, M.A., PUKAZHENTHI, B.S., *et al.* (2022a) Evaluation of growth, viability, and structural integrity of equine endometrial organoids following

- cryopreservation. *Cryobiology* vol. 104, p. 56-62. [https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.003]
- THOMPSON, R.E., MEYERS, M.A., VEERAMACHANENI, D.N.R., *et al.* (2022b) Equine Oviductal Organoid Generation and Cryopreservation. *Methods and Protocols* vol. 5, n° 3, p. 51. [https://doi.org/10.3390/mps5030051]
- TIÈCHE, E.S. (2019) Organoid Cultures of Canine Thyroid Gland and Thyroid Carcinoma: a New Model for Translational Cancer Research. Thèse universitaire, Berne, Université de Berne
- TÖPFER, E., PASOTTI, A., TELOPOULOU, A., *et al.* (2019) Bovine colon organoids: From 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening platforms. *Toxicology in Vitro* vol. 61, p. 104606. [https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104606]
- TSUCHIDA, T., MURATA, S., HASEGAWA, S., *et al.* (2020) Investigation of Clinical Safety of Human iPS Cell-Derived Liver Organoid Transplantation to Infantile Patients in Porcine Model. *Cell Transplantation* vol. 29, p. 963689720964384. [https://doi.org/10.1177/0963689720964384]
- USUI, T., SAKURAI, M., NISHIKAWA, S., *et al.* (2017) Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. *Cancer Science* vol. 108, n° 12, p. 2383-2392. [https://doi.org/10.1111/cas.13418]
- VAN DEN BOSSCHE, L., SCHOONENBERG, V.A.C., BURGNER, I.A., *et al.* (2017) Aberrant hepatic lipid storage and metabolism in canine portosystemic shunts. *PLoS One* vol. 12, n° 10, p. e0186491. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186491]
- VAN DER HEE, B., LOONEN, L.M.P., TAVERNE, N., *et al.* (2018) Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* vol. 28, p. 165-171. [https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.02.013]
- VAN DER HEE, B., MADSEN, O., VERVOORT, J., *et al.* (2020) Congruence of Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original Tissue During Long-Term Culture. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8, p. 375. [https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00375]
- VERMEULEN, M., DEL VENTO, F., KANBAR, M., *et al.* (2019) Generation of Organized Porcine Testicular Organoids in Solubilized Hydrogels from Decellularized Extracellular Matrix. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20, n° 21, p. 5476. [https://doi.org/10.3390/ijms20215476]
- VON FURSTENBERG, R.J., LI, J., STOLARCHUK, C., *et al.* (2017) Porcine Esophageal Submucosal Gland Culture Model Shows Capacity for Proliferation and Differentiation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* vol. 4, n° 3, p. 385-404. [https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.07.005]
- WALKER, M.R., PATEL, K.K., STAPPENBECK, T.S. (2009) The stem cell niche. *The Journal of Pathology* vol. 217, n° 2, p. 169-180. [https://doi.org/10.1002/path.2474]
- WANG, Y., HOU, Q., WU, Y., *et al.* (2022) Methionine deficiency and its hydroxy analogue influence chicken intestinal 3-dimensional organoid development. *Animal Nutrition* vol. 8, n° 1, p. 38-51. [https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.001]
- WANG, Z., LI, J., WANG, Y., *et al.* (2020) Dietary vitamin A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets by affecting intestinal stem cells. *Journal of Animal Science* vol. 98, n° 2, p. skaa020. [https://doi.org/10.1093/jas/skaa020]
- WILSON, H.V. (1907) A New Method by Which Sponges May Be Artificially Reared. *Science* vol. 25, n° 649, p. 912-915. [https://doi.org/10.1126/science.25.649.912]

- WIMMER, R.A., LEOPOLDI, A., AICHINGER, M., *et al.* (2019) Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* vol. 14, n° 11, p. 3082-3100. [<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0213-z>]
- YANG, Y., OPARA, E.C., LIU, Y., *et al.* (2017) Microencapsulation of porcine thyroid cell organoids within a polymer microcapsule construct. *Experimental Biology and Medicine* vol. 242, n° 3, p. 286-296. [<https://doi.org/10.1177/1535370216673746>]
- YIN, L., CHEN, J., LI, L., *et al.* (2020) Aminopeptidase N Expression, Not Interferon Responses, Determines the Intestinal Segmental Tropism of Porcine Deltacoronavirus. *Journal of Virology* vol. 94, n° 14, p. e00480-20. [<https://doi.org/10.1128/JVI.00480-20>]
- YOON, Y.-J., KIM, D., TAK, K.Y., *et al.* (2022) Salivary gland organoid culture maintains distinct glandular properties of murine and human major salivary glands. *Nature Communications* vol. 13, n° 1, p. 3291. [<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30934-z>]
- YOSHIHARA, E., O'CONNOR, C., GASSER, E., *et al.* (2020) Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature* vol. 586, n° 7830, p. 606-611. [<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2631-z>]
- ZDYRSKI, C., GABRIEL, V., OSPINA, O., *et al.* (2022) Establishment and Characterization of Novel Canine Organoids with Organ-Specific Physiological Similarity. *bioRxiv* [<https://doi.org/10.1101/2022.07.15.500059>]
- ZHAN, K., LIN, M., LIU, M., *et al.* (2017) Three-dimensional culture system can induce expression of casein in immortalized bovine mammary epithelial cells. *Animal Science Journal* vol. 88, n° 5, p. 817-825. [<https://doi.org/10.1111/asj.12702>]
- ZHANG, K., LI, H., XIN, Z., *et al.* (2020) Time-restricted feeding downregulates cholesterol biosynthesis program via ROR γ -mediated chromatin modification in porcine liver organoids. *Journal of Animal Science and Biotechnology* vol. 11, n° 1, p. 106. [<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00511-9>]
- ZHU, M., QIN, Y.-C., GAO, C.-Q., *et al.* (2020) I-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food & Function* vol. 11, n° 3, p. 2714-2724. [<https://doi.org/10.1039/c9fo03065d>]
- ZHU, M., QIN, Y.-C., GAO, C.-Q., *et al.* (2019) Extracellular Glutamate-Induced mTORC1 Activation via the IR/IRS/PI3K/Akt Pathway Enhances the Expansion of Porcine Intestinal Stem Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 67, n° 34, p. 9510-9521. [<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03626>]
-

Annexe 1 : protocole de production d'organoïdes canins de foie et d'intestin, extrait de Gabriel *et al.* (2022)

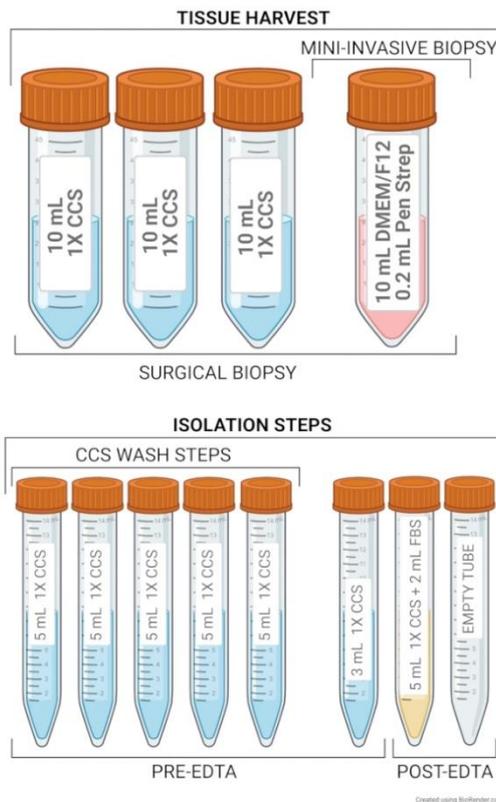
1. Preparation for isolation

1. Transport tubes: Before organoid isolation (typically 24 h prior), fill a 50 mL conical tube with 10 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Advanced DMEM/F12) enriched with 0.2 mL of Pen Strep.
2. For laparoscopic, incisional, or excisional biopsies, prepare three additional 50 mL conical tubes. Fill these tubes with 10 mL of complete chelating solution (1x CCS; see **Table 1**).
NOTE: For step 1.2, 2 mM N-Acetylcysteine (NAC) in Phosphate Buffered Saline (PBS) can also be used as a traditional solution used for stem cell harvesting. There were no differences observed when using 1x CCS or NAC in PBS. Both solutions are added to release cells in the solution.
3. Keep the tubes at 4 °C overnight and transport the tubes on ice for the remainder of the protocol.
4. Prepare five 15 mL centrifuge tubes with 5 mL of 1x CCS, one 15 mL centrifuge tube with 3 mL of 1x CCS, one empty 15 mL centrifuge tube (supernatant tube), and one 15 mL centrifuge tube with 5 mL of 1x CCS and 2 mL of fetal bovine serum (FBS).
NOTE: The above can be prepared prior to the day of isolation if multiple samples will be processed. For illustration, see the isolation tube layout in **Figure 2**.
5. On the day of isolation, prepare a Petri dish, scalpel, ice bucket, and cold Advanced DMEM/F12 in the biosafety cabinet. Place the required number of 24-well cell culture plates in the incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere) to pre-warm.
6. Place solubilized extracellular membrane matrix (ECM; see **Table of Materials**) on ice to begin thawing.
NOTE: Submersion in ice protects against rapid thawing and helps avoid solidification. A box of pipette tips can be placed in the freezer to assist in plating the solubilized ECM.
7. Prechill a centrifuge to 4 °C.
8. Move Complete media with growth factors "CMGF+" or "organoid media" (see **Table 1** for composition) from the freezer/refrigerator to a 37 °C water bath. Avoid direct light exposure when possible.

Figure 2: Isolation tube layout. Recommended setup for tissue harvesting includes 10 mL of Advanced DMEM/F12 and 0.2 mL of Pen Strep in a 50 mL centrifuge tube.

Additionally, three 50 mL tubes filled with 10 mL of 1x CCS are required for surgical biopsies or necropsies. Recommended tube layout for isolation steps includes five tubes containing 5 mL of 1x CCS to be used during CCS wash steps. The first tube is used as a sample tube containing the minced tissue, and the remaining tubes serve as reservoirs of 1x CCS to be added to the first tube. The sixth tube contains 3 mL of 1x CCS for flushing the remaining tissue from the sample tube when transferring to a 6-well plate. These six tubes will be used before the EDTA incubation step. A tube with 5 mL of 1x CCS and 2 mL of FBS serves as a sample tube after EDTA incubation, and supernatant from this tube is transferred with stem cells into an empty tube for the rest of the isolation. Keep tubes at 4 °C before beginning isolation.

Isolation Tube Layout



2. Tissue harvesting

1. Intestinal endoscopic, and laparoscopic biopsies (diameter 2.8 mm) can be acquired using large biopsy forceps. Harvest at least eight endoscopic samples per intestinal site.
2. Collect samples directly into transport tubes and place them on ice.
3. For surgical biopsies and necropsies, harvest tissue pieces with a size of 0.5 cm x 0.5 cm and place them in the first 1x CCS tube. NOTE: For intestinal biopsies, remove any remaining intestinal content and scrape the mucosal layer with a scalpel to remove villi. If samples are plentiful, additional biopsies can be collected in cryovials containing RNA storage reagent (1 mL) or

paraffin-embedded for future comparison between organoids and their tissue of origin. In the case of taking biopsies for TEM analysis, do not scrape the villi and store sample in preservative (3% paraformaldehyde and 3% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS)) and store at 4 °C.

4. Shake the 1x CCS tube vigorously for ~30 s, and then transfer the sample to a new 1x CCS tube using forceps. Repeat this process twice.
5. Transfer the sample from the last 1x CCS tube to the transport tube (Advanced DMEM/F12 + Pen Strep) and bring the sample back to the laboratory. NOTE: Samples pre-treated this way can also be shipped overnight on ice (do not ship on dry ice).

3. Organoid isolation

NOTE: Perform isolation using aseptic techniques in a biosafety cabinet. See **Figure 3** for canine organoid isolation workflow.

1. Shake tissue sample in the transport tube for ~30 s and remove excessive supernatant until there is 0.5 mL left in the tube by slow pipetting near the fluid surface. Be sure not to discard any tissue.
2. Transfer tissue and remaining supernatant to a sterile Petri dish. Using a disposable scalpel (or sterilized forceps and scissors), cut and mince the tissue into smaller pieces (size of 1 mm²) resembling a mash consistency for approximately 5 min.
3. Pipet the minced tissue with liquid from the Petri dish to the first CCS tube. Add 2 mL of Advanced DMEM/F12 to the Petri dish, flush the remaining tissue, and transfer to the first CCS tube.
4. Vortex the 1x CCS tube for 5 s approximately five times. Allow biopsies to settle to the bottom of the 15 mL tube (approximately 1 min) and remove the supernatant until there is 5 mL left in the tube. Transfer the 1x CCS from the new tube to the sample tube.
5. Repeat the previous step for the next two tubes. On the final two washes, remove the supernatant down to 3 mL remaining in the tube.
6. Transfer the biopsies and 1x CCS from the sample tube to one well of a 6-well plate. Then, add 3 mL of 1x CCS to the sample tube, gently swirl to collect any remaining tissue, and transfer to the same well of the plate.
7. Add 150 µL of 0.5 M EDTA (to achieve a total volume of 6.15 mL in a well). Place the 6-well plate on a 20°, 24-rpm nutating mixer/rocker at 4 °C. Incubate the liver samples for 10 min and the intestinal samples for 1 h on the moving rocker.
8. Transport the 6-well plate back to the biosafety cabinet. Transfer minced tissue and liquid to a 1x CCS/FBS tube and allow the tissues to settle. Transport the supernatant (this portion now includes free stem cells) and approximately 0.2 mL of the upper portion of the tissue to the empty tube.
9. Spin down the tube containing the sample (700 x g for 5 min at 4 °C). Stem cells are now pelleted along with the minced tissue. Remove and discard the supernatant carefully to not disturb the pellet.
10. Resuspend the pellet in Advanced DMEM/F12 and spin the tube again (700 x g for 5 min at 4 °C). Aspirate the supernatant and do not disturb the pellet.
11. Calculate the volume of solubilized ECM needed for seeding the dissociated cells and tissue. Use 30 µL of solubilized ECM per well of a 24-well plate to achieve proper

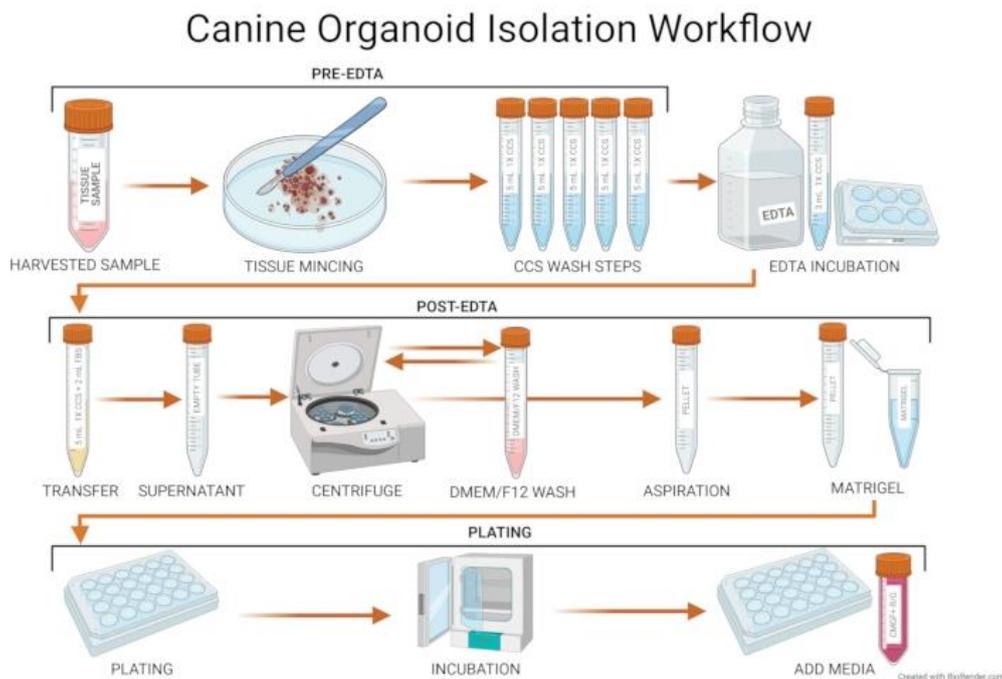
seeding

density.

NOTE: Embed a sample post isolation in 4 to 6 wells of a 24-well plate (i.e., based on the amount of minced tissue in the sample).

12. Add the calculated volume of solubilized ECM to the sample tube and slowly pipette up and down to avoid the formation of bubbles. Seed the suspension in the middle of the wells so that the solubilized ECM can form a dome-like structure. NOTE: Using pipette tips from a -20 °C freezer assists in plating solubilized ECM. If tissue chunks are larger than the P200 pipette tip, use wide cold tips or cut cold P1000 tips to assist in plating. Keep the sample with the solubilized ECM on ice whenever possible.
13. Transport the plate to an incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere) and allow the solubilized ECM to solidify for ~30 min.
14. Mix ROCK inhibitor and GSK3β in CMGF+ (concentrations in **Table 1**). Add 500 μL of this solution (CMGF+ R/G) to every well. Place the plate in the incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere).

Figure 3: Canine organoid isolation workflow. The harvested tissue sample is transferred to a Petri dish and minced properly. The sample is then transferred to a 1x CCS tube, and wash steps are performed. For the EDTA incubation in a 6-well plate, the sample is then transferred to a tube containing 1x CCS and FBS. After the tissue settles, the supernatant with a small amount of tissue is transferred to an empty tube. The sample is consequently spun, the supernatant is removed, and the pellet is resuspended in Advanced DMEM/F12. The tube is spun again, and the supernatant is aspirated and discarded. Solubilized ECM is added to the tube, mixed, and the sample is plated in a 24-well plate. The plate is consequently incubated (37 °C; 5% CO₂ atmosphere) for 30 min, and media is then added.



NOTE: The following section (steps 4 and 5) describes the Canine Organoid Maintenance Protocol. Change media according to **Table 2** and check the organoids daily for signs of apoptosis, contamination, overcrowding, and detachment of solubilized ECM. Daily notes must be taken according to **Figure 4** to accurately monitor conditions and experimental effects on the cultures. See **Supplementary Table 1** for a template allowing for accurate and reproducible organoid culture-related notetaking. For hepatic organoids, use CMGF+ enhanced with ROCK inhibitor and GSK3 β .

Figure 4: Organoid sizing and density guide. (A) Organoid size chart for accurate tracking of organoid growth. The Sizing Guide includes extra-small (XS), small (S), medium (M), large (L), and extra-large (XL) categories. (B) The Density Guide consists of very low density (VLD), low density (LD), medium density (MD), high density (HD), and very high density categories (VHD). (C) Representative images of bacterial and fungal contamination of the organoid sample. (D) Representative images of organoid overcrowding and apoptosis. The objective magnification is indicated in every panel.

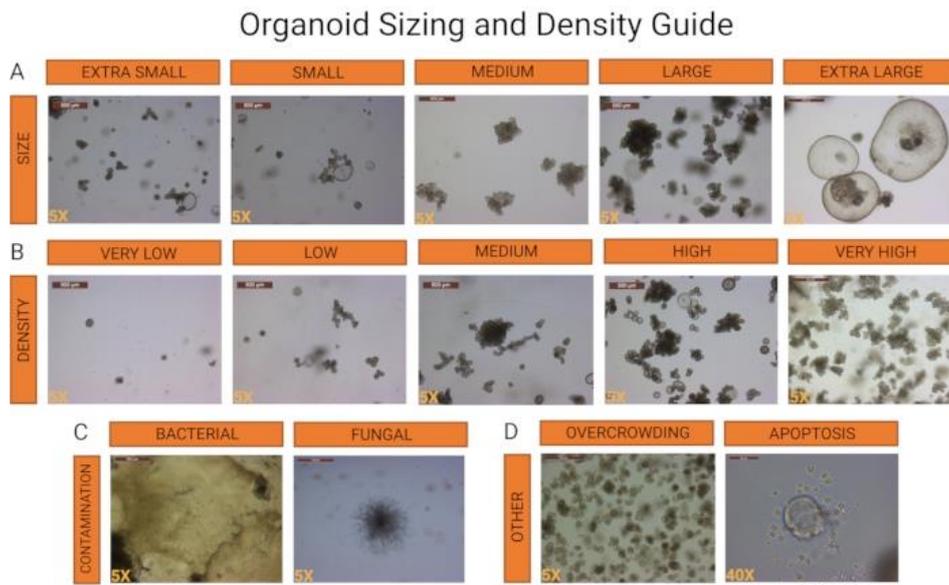


Table 2: Media change recommendation. A recommended timeline of weekly media change. Media (500 μ L of CMGF+ for intestinal organoids, or 500 μ L of CMGF+ R/G for hepatic organoids) is recommended to be changed every other day. To account for the extra hours on a weekend, 750 μ L of media is added on Friday afternoons, with media being refreshed on Monday mornings.

Media change recommendation						
Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
500 μ L	N/A	500 μ L	N/A	750 μ L	N/A	N/A

4. Organoid cleaning

NOTE: Passaging is typically performed 5-7 days after initial culture to expand the organoid cell line. Organoid cultures can typically be expanded in a 1:3 ratio. Images of healthy cultures ready for passage can be seen in **Figure 4**. Organoids have to be at least medium in size.

1. Remove the media from the wells while tilting the plate to avoid destruction of the solubilized ECM.
NOTE: If solubilized ECM detachment is considerable, it is advised to transfer the media to the 15 mL tube to avoid losing fragments of solubilized ECM containing the sample.
2. Add 0.5 mL of prechilled Advanced DMEM/F12 to each well to dissolve the matrix domes by repeated pipetting using a P1000 tip (avoid creating excessive bubbles). Transfer the organoid-containing dissolved matrix to a 15 mL centrifuge tube. Keep the tube on ice and if the volume is lower than 6 mL, slowly fill the tube with Advanced DMEM/F12 to reach a total volume of 6 mL.
3. Spin the tube (700 x g for 5 min at 4 °C) and remove all the supernatant while making sure not to disturb the pellet.
4. Add the required volume of solubilized ECM (30 µL per well to achieve proper seeding density) and slowly resuspend the pellet by pipette mixing. Plate the suspension in the middle of the 24-well plate to form a dome.
5. Place the plate in an incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere) for ~30 min, and then add the appropriate volume of media (**Table 2**).

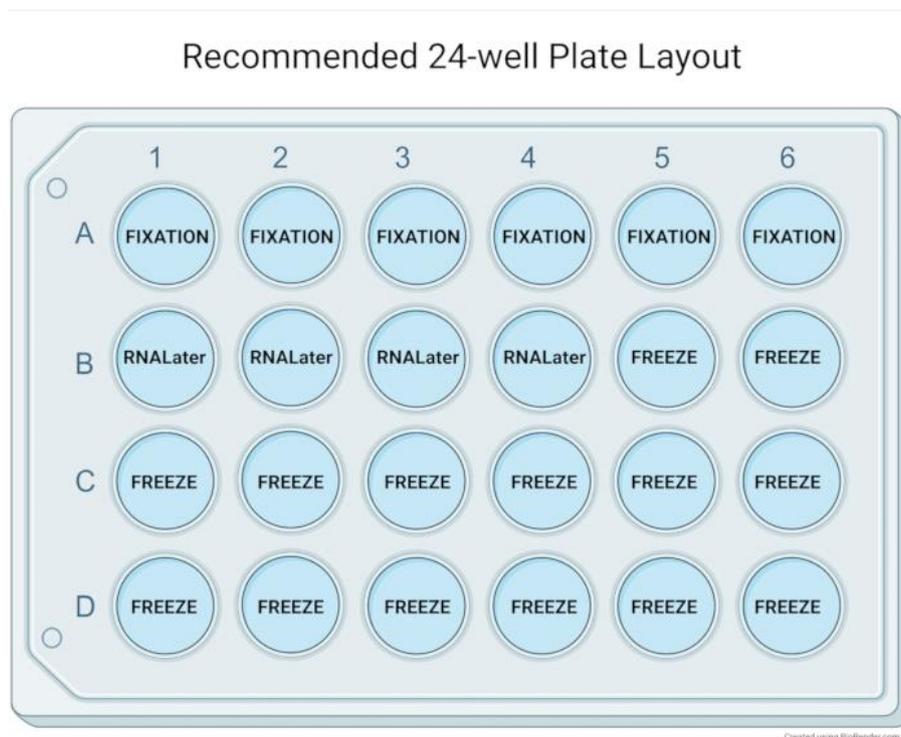
5. Organoid passaging

NOTE: Passaging is typically performed 5-7 days after initial culture to expand the organoid cell line. Organoid cultures can typically be expanded in a 1:3 ratio. Images of healthy cultures ready for passage can be seen in **Figure 4**. Organoids have to be at least medium in size.

1. Perform steps 4.1 to 4.3.
2. Remove the supernatant leaving 0.5 mL in the tube. Make sure not to disturb the pellet.
3. Add 0.5 mL of trypsin-like protease (see **Table of Materials**), mix properly by aspirating with a pipette and incubate in the 37 °C water bath (incubate intestinal organoids for 8 min or hepatic organoids for 10 min). Continue to mix the solution by flicking the tube several times at the half-time point of the incubation.
4. Move the tube containing the sample back to a biosafety cabinet and slowly add 6 mL of prechilled Advanced DMEM/F12 to inactivate trypsin-like protease and stop the dissociation of the cells.
5. Spin the tube (700 x g for 5 min at 4 °C) and remove the supernatant. Make sure not to disturb the pellet.
6. Perform steps 4.4. and 4.5.
NOTE: The following section (steps 6-9) describes Organoid Harvesting and Biobanking Protocol. Organoid cultures have to be free of tissue that has been

removed during previous passages. Cultures should also be healthy, at least large in size, and medium to high in density. Images of healthy cultures ready for downstream applications can be seen in **Figure 4**. Moving downstream with preservation and harvesting of sub-optimal organoid cultures can negatively impact characterization results and the biobank's viability. Review the recommended 24-well plate layout in **Figure 5**.

Figure 5: Recommended 24-well plate layout. The recommended layout of the 24-well plate for basic characterization after expansion of the organoid culture. Paraffin-embedding of six wells (medium to large organoids of medium to high density) will typically allow for a high concentration of organoids in a histology block. Four wells of organoids can be pooled to one cryovial with RNA storage reagent for downstream applications. Fourteen wells are used for biobanking the organoid samples and provide material for up to seven cryopreserved vials.



6. Fixation of organoids

1. Remove media from the well and make sure not to disturb the solubilized ECM dome.
2. Add 500 μ L of Formalin-Acetic Acid-Alcohol solution serving as a fixative (FAA; composition in **Table 1**).
3. Store organoids at room temperature. After 24 h, aspirate FAA and fill the well with 70% ethanol. Wrap plates with a laboratory flexible film tape (see **Table of Materials**)

to avoid rapid evaporation. The organoids are now ready for paraffin-embedding. The paraffin-embedding of the organoid culture is performed in traditional metal base molds.

7. RNA preservation

1. Remove media from the wells and make sure not to disturb the solubilized ECM dome.
2. Use 0.5 mL of prechilled Advanced DMEM/F12 per well to dissolve solubilized ECM domes by repeatedly pipetting up and down (avoid creating excessive bubbles). Transfer the organoids to a 15 mL centrifuge tube. Keep the tube on ice and if the volume is lower than 6 mL, slowly fill the tube with Advanced DMEM/F12 to reach 6 mL of total volume.
3. Spin the tube (700 x g for 5 min at 4 °C) and remove all the supernatant. Make sure not to disturb the pellet.
4. Add 100 µL of PBS to the sample tube and resuspend the pellet by gentle pipetting. Transfer the contents of the sample tube to a cryovial.
5. Add 900 µL of RNA storage reagent (see **Table of Materials**) to the sample tube and mix to collect any remaining organoids. Transfer these residual organoids to the cryovial and store them at -80 °C (typically four wells pooled to one cryovial will be sufficient for downstream applications, including qPCR and RNA sequencing).
NOTE: One cryovial typically produces a total of 4,000 ng of RNA (measured *via* spectrophotometer analysis).

8. Organoid biobanking

NOTE: Biobanking usually occurs 3-4 days after passage. The signs of apoptosis should not be present in the culture to perform this method. Refer to **Figure 4** for referencing size and density appropriate for freezing. Biobank medium to extra-large organoids at medium to very high densities. An emergency freeze step can be followed if an organoid cell line is especially rare or further viability is not guaranteed. Follow the same steps for normal organoid biobanking (steps 8.1 to 8.4). Emergency freezing is done with smaller and less dense cultures. Pool as many wells of growing organoids into one cryovial following steps 8.1 to 8.4. Keep in mind that a sufficient number of organoids must be kept alive in an attempt to expand the culture (emergency freezing is simply a backup procedure to protect against possible loss of culture *via* contamination or other unexpected occurrences).

1. Follow steps 7.1 to 7.3.
2. Add 1 mL of freezing media per cryovial (composition in **Table 1**) to the sample tube and gently resuspend the pellet by pipetting up and down.
3. Transfer 1 mL of the solution to one cryovial (ratio of two wells/cryovial) and keep the cryovials on ice.
4. Transfer the cryovials from ice to a freezing container (regularly refill the reservoir with isopropanol) and immediately transfer to -80 °C. Move the samples to liquid nitrogen (-196 °C) for long-term storage after 24 h.
NOTE: An alcohol-free cell freezing container can also be used instead of a traditional one. Make sure the samples do not thaw during transport from the -80 °C to the long-

term liquid nitrogen storage. Repeated thawing decreases the viability of the cell culture.

9. Revival from liquid nitrogen storage

NOTE: When choosing to thaw an organoid line, a subset of the revived organoids must be refrozen and replaced in the biobank as quickly as possible with at least one (preferably more) cryovials.

1. Place solubilized ECM on ice to slowly thaw, put a 24-well plate in the incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere), and prepare the required reagents such as a 15 mL tube and Advanced DMEM/F12.
2. Recover a cryovial containing an organoid sample from liquid nitrogen storage and immediately transfer it to a heat bath (37 °C) for 2 min.
3. Transfer contents of the cryovial to a 15 mL centrifuge tube in a biosafety cabinet. Slowly add prechilled Advanced DMEM/F12 to reach a total volume of 6 mL.
4. Spin the tube (700 x *g* for 5 min at 4 °C). Remove the supernatant and make sure not to disturb the pellet.
5. Add 180 µL (30 µL per well) of solubilized ECM to the pellet and plate this suspension in the pre-heated 24-well plate. One cryovial can be plated to six wells of a 24-well plate.
6. Place the 24-well plate in the incubator (37 °C; 5% CO₂ atmosphere) for ~30 min and add CMGF+ R/G (for intestinal organoids, switch to CMGF+ in 24 to 48 h).
NOTE: When a sample is plated and growing in the 24-well plate, it must be allowed to recover for at least 2 days before passaging to increase viability.

Table 1: Composition of solutions and media. A list of components and concentrations of incomplete and complete chelating solutions, CMGF+ (organoid media), freezing media, and FAA.

Incomplete chelating solution (ICS) composition	Final concentration
500 mL H ₂ O	NA
2.49 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.98 mg/mL
2.7 g KH ₂ PO ₄	5.4 mg/mL
14 g NaCl	28 mg/mL
0.3 g KCl	0.6 mg/mL
37.5 g Sucrose	75 mg/mL

25 g D-Sorbitol	50 mg/mL
Complete chelating solution (CCS) composition	V/V % or final concentration
Incomplete chelation solution	20%
Sterile H ₂ O	80%
DTT	520 μ M
Pen Strep	Pen: 196 U/mL; Strep 196 μ g/mL
Organoid media composition	Final concentration
Advanced DMEM/F12	NA
FBS	8%
Glutamax	2 mM
HEPES	10 mM
Primocin	100 μ g/mL
B27 supplement	1x
N2 supplement	1x
N-Acetyl-L-cysteine	1 mM
Murine EGF	50 ng/mL
Murine Noggin	100 ng/mL
Human R-Spondin-1	500 ng/mL
Murine Wnt-3a	100 ng/mL
[Leu ⁶⁵]-Gastrin I human	10 nM

Nicotinamide	10 mM
A-83-01	500 nM
SB202190 (P38 inhibitor)	10 μ M
TMS (trimethoprim sulfamethoxazole)	10 μ g/mL
Additional components	Final concentration
ROCK inhibitor (Y-27632)	10 μ M
Stemolecule CHIR99021 (GSK3 β)	2.5 μ M
Freezing media composition	V/V percent
Organoid media and ROCK inhibitor	50%
FBS	40%
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	10%
FAA composition	V/V percent
Ethanol (100%)	50%
Acetic Acid, Glacial	5%
Formaldehyde (37%)	10%
Distilled water	35%

LES ORGANOÏDES CHEZ LES ANIMAUX DE COMPAGNIE ET DE PRODUCTION : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

AUTEUR : Lucas DE GIUDICI

RÉSUMÉ :

Les organoïdes sont des cultures cellulaires tridimensionnelles qui permettent de préserver à la fois la structure mais aussi la fonction des organes dont ils sont issus. Cette méthode de culture *in vitro* est récente mais déjà en plein essor chez l'humain et la souris et permet de nombreuses applications au sein de multiples champs de recherche en médecine ou en physiologie. Elle participe à la réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques.

Le présent travail a pour objectif de recenser les organoïdes ayant été développés chez les animaux de compagnie et de rente que sont le chien, le chat, le lapin, le cheval, le poulet, le porc, le bovin, le mouton et la chèvre. Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de chaque organoïde ont été recherchées dans la littérature. Les avancées permises par les organoïdes développés dans certains domaines de recherche sont mentionnées, ainsi que les perspectives d'avenir pour ce modèle de culture.

La littérature sur les organoïdes des animaux de compagnie et de production est bien moins prolifique que chez l'humain ou la souris, mais elle a néanmoins permis de montrer dans beaucoup de cas que la structure des organes dont les organoïdes sont issus est préservée. Par ailleurs, quand des études ciblées sur la fonction ont été menées, elles ont généralement confirmé une bonne conservation. Néanmoins, cette forme de culture tridimensionnelle reste encore parcellaire dans la modélisation complète d'un organe, absence de cellules nerveuses ou immunitaires.

Au bilan, cette méthode de culture cellulaire ouvre la voie à de nombreuses avancées dans des domaines comme la médecine régénérative, l'oncologie ou l'industrie du médicament. Elle nécessite cependant un effort de caractérisation afin de parfaire son usage comme modèle de culture cellulaire *in vitro* en recherche vétérinaire.

MOTS CLÉS :

CULTURE CELLULAIRE 3D, ORGANOÏDE, PROTOCOLE, MODÈLE, THÉRAPEUTIQUE

JURY :

Président : Pr Grégory JOUVION

Directrice de thèse : Dr Delphine LE ROUX

Examineur : Pr Laurent TIRET

PRODUCTION ANIMALS AND PETS' ORGANOID: STATE OF PLAY AND OUTLOOK

AUTHOR: Lucas DE GIUDICI

SUMMARY:

Organoids are tridimensional cell cultures that preserve structure and function of the organ that they are made from. This new *in vitro* cell culture is rising in the human and the mouse species and is promising as a tool in numerous search fields (medicine, physiology...) while reducing the number of laboratory animals.

The present work aims to enumerate the organoids that have already been developed from pets and production animals constituted by dog, cat, rabbit, horse, chicken, pig, cattle, sheep and goat. The literature has been reviewed to find some structural and functional characteristics. Moreover, the way organoids that have already been developed have permitted progress in some field and the perspectives that they offer have been highlighted.

Organoid literature about pets and production animals is way less fruitful than that of human and mouse. Nevertheless, this work shows that in a vast majority of studies, organoids exhibit a structure that resemble the organ they are made from. Furthermore, functional studies shows that the function of the original organ is preserved in organoids. However, this type of tridimensional cell culture is flawed and lacks of nervous cells, immune cells...

This method of cell culture paves the way for numerous progress in fields like regenerative medicine, oncology, medicine industry... However, there is work yet to be done to better characterize this cell culture to use it as an *in vitro* cell culture model in veterinary research.

KEYWORDS:

3D CELL CULTURE, ORGANOID, PROTOCOL, MODEL, THERAPEUTICS

JURY:

Chairperson: Pr Gregory JOUVION

Thesis Director: Dr Delphine LE ROUX

Reviewer: Pr Laurent TIRET