UNIVERSITE DE GENEVE

TRAVAIL DE MONOGRAPHIE DU BACHELOR EN BIOLOGIE

L’utilisation des organoïdes en recherche préclinique

GILLON Louise

2024

Directeur du travail

Professeur Marc Chanson

Département de physiologie cellulaire et métabolisme

Faculté de Médecine

Responsable du travail

Professeur Guillaume Salbreux

Département génétique et évolution

Faculté des Sciences

Table des matières

Abréviations 2

Résumé 2

1. Introduction 3
    - 1.1. Une technologie en plein essor 3
    - 1.2. Applications en recherche préclinique 4
2. Qu'est-ce qu'un organoïde 5
    - 2.1. Les organoïdes comme modèle de culture tridimensionnelle 5
    - 2.2. Cellules souches 8
    - 2.3. Modification génétique d'iPSCs 9
    - 2.4. Questions de recherche 10
    - 2.5. Méthode de bioimpression BATE 11
3. Utilisation en recherche préclinique 12
    - 3.1. Modélisation des maladies 12
    - 3.2. Découverte de nouvelles thérapies 14
    - 3.3. Médecine personnalisée 15
4. Conclusion 16

Bibliographie 17

Abréviations

ALI : air-liquid interface culture – système de culture par interface air-liquide

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : ARN messager

ASCs : adipose-derived stem cells – cellules souches dérivées du tissu adipeux

BATE : bioimprinting-assisted tissue emergence – emergence tissulaire assistée par la bioimpression

Cas9 : CRISPR associated protein 9 – protéine 9 associée à CRISPR

CFLD : CF liver disease – maladie hépatique liée à la mucoviscidose

CFRD : CF-related diabetes – diabète lié à la mucoviscidose

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – protéine de régulation de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (mucoviscidose)

CRISPR : clustered regularly interspaced short palindoromic repeats – répétitions de courtes séquences palindromiques regulièrement espacées

ECM : extracellular matrix – matrice extracellulaire

EHS : cellules Engelbreth-Holm-Swarm

ESCs : embryonic stem cells – cellules souches embryonnaires

FIS : Forskolin-induced-swelling – gonflement induit par la Forskoline

iPSCs : induced pluripotent stem cells – cellules souches pluripotentes induites

MSCs : mesenchymal stem cells – cellules souches mésenchymateuses

PDOs : patients derived organoids – organoïdes dérivés des patients

PSCs : pluripotent stem cells – cellules souches pluripotentes

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nuclease – nucléase effectrice de type activateur de transcription

Résumé

Les organoïdes, des mini-organes cultivés in vitro sont sous les projecteurs de nombreux laboratoires. Les recherches scientifiques se sont longtemps basées sur des modèles de cultures cellulaires, dépourvues d'architecture tissulaire pour découvrir le fonctionnement de nos cellules. De la même façon, les modèles animaux ont servi à élargir nos connaissances sur les échanges qui se produisent à travers l'ensemble d'un organisme. Récemment, un nouveau type de culture cellulaire s'est développé, basé sur l'architecture 3D et la physiologie de nos organes : les organoïdes. L'objectif de ce travail est d'appréhender cette nouvelle méthode et les outils technologiques conçus à partir des organoïdes, afin de comprendre en quoi ils pourraient s'avérer utiles en recherche préclinique.

1. Introduction

1.1. Une technologie en plein essor

La culture cellulaire est une méthode fondamentale en recherche pour modéliser le fonctionnement physiologique d'un organisme et étudier l'influence des maladies sur les intéractions moléculaires chez les individus atteints (1). Dans ce type d'études, l'objectif est de tester différentes conditions expérimentales sur des cellules afin de constater si des changements s'opèrent au sein de celles-ci. De cette manière, il est possible de comparer des cellules saines et des cellules mutées afin d'identifier les défauts causés par la maladie que l'on étudie. Les cellules sont étalées sur un milieu de culture avec des nutriments et des facteurs essentiels pour leur croissance, puis préservées dans des flasques, des boîtes de Pétri ou des plaques multi-puits (2) qui sont maintenues dans des conditions de température et de pH correspondant approximativement à des valeurs physiologiques chez l'humain. La culture de cellules a permis d'élargir nos connaissances en biologie cellulaire, notamment dans un cadre biomédical.

Actuellement, les modèles cellulaires sont toujours adaptés à de nombreux sujets en recherche fondamentale, malgré l'existence de techniques alternatives (3)[Figure 1]. Les recherches en biologie moléculaire ont élucidé de nombreuses cascades de signalisation grâce aux techniques de culture cellulaire conventionnelles. Cependant, les échanges qui régulent ces mécanismes intracellulaires à l'échelle d'un organisme ne peuvent pas directement être élucidés par cette méthode. En effet, le modèle de culture conventionnelle ne parvient pas à reproduire les interactions entre les cellules, ni la formation de plusieurs tissus différenciés au sein d'une même culture (3). Par ailleurs, cette méthode n'est pas non plus appropriée pour reconstituer la composition de l'environnement cellulaire, communément appelée la niche (4). C'est pourquoi on étudie l'interconnexion entre les voies moléculaires au moyen d'organismes modèles animaux afin de mieux comprendre l'influence des différents organes sur les processus cellulaires (3,5). Malgré la complémentarité de ces deux types d'approches, notre compréhension des mécanismes sous-jacents à certaines maladies humaines est limitée par des restrictions inhérentes à chacun de ces deux modèles (3) [Figure 1].

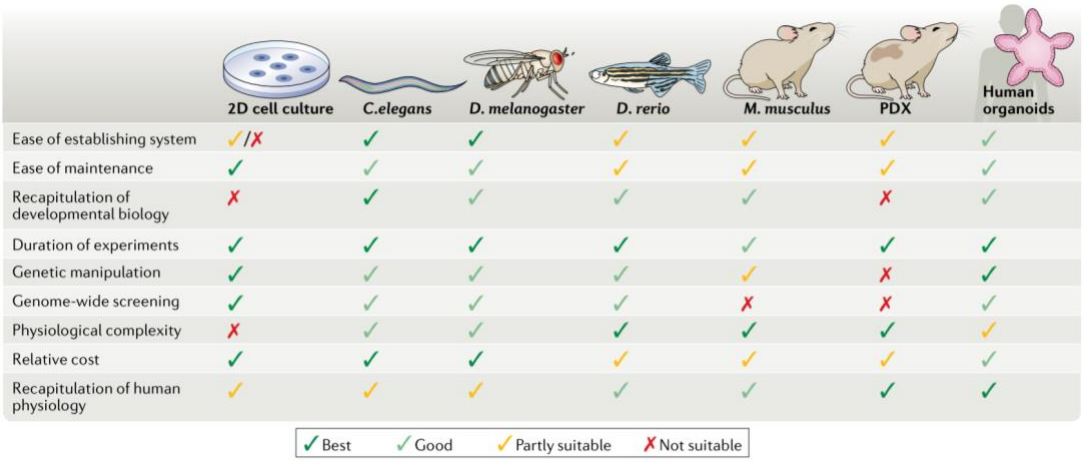

Figure 1. Tableau comparatif des organoïdes avec d'autres systèmes modèles (3)

Les différences génétiques, morphologiques, anatomiques qui séparent l'humain des organismes modèles, constituent un premier obstacle à la recherche (6,7). Le second est d'ordre éthique, accompagné par une prise de conscience et une volonté de limiter la souffrance animale à des fins de recherche (2). Par conséquent, de nouveaux outils sont élaborés pour surmonter ces limitations. Aujourd'hui, des alternatives existent et les chercheurs ne cessent d'optimiser ces technologies pour répondre à différentes questions de recherche, dans des domaines d'études variés (8).

Récemment, l'émergence des organoïdes a révolutionné les méthodes de culture cellulaire in vitro en proposant un modèle tissulaire tridimensionnel qui possède les caractéristiques fonctionnelles d'un mini-organe (1,9). Il apporte de nouvelles perspectives en recherche biomédicale, en ajoutant un niveau de complexité dans la modélisation de maladies, ainsi que pour la recherche de traitements thérapeutiques (1). C'est également un outil prometteur en médecine régénérative (10).

L'utilisation de ce principe de culture cellulaire en 3D, associée à d'autres technologies de pointe, multiplie les possibilités d'applications en recherche préclinique et améliore nettement la précision des modèles (11). Différentes approches techniques, toutes dérivées de ce même principe, ont été mises au point. Ainsi, les organoïdes, les organes-sur-puces, les sphéroïdes, de mêmes que la bioimpression 3D et les systèmes de culture par interface air-liquide (ALI) connaissent un développement significatif. Nous nous intéresserons à certaines de leurs applications en recherche (7).

1.2. Applications en recherche préclinique

Il existe désormais des organoïdes de nombreux organes, y compris le cerveau, la rétine de même que le globe oculaire, les vaisseaux sanguins, la thyroïde, les poumons, les glandes salivaires, l'estomac, le foie, le pancréas, les intestins, les reins, la vessie et la prostate, les glandes mammaires, les trompes de Fallope et l'endomètre utérien (3). L'introduction dans le modèle des constituants de la niche, avec lesquels les cellules interagissent pendant le développement de l'organe, permet d'établir la microarchitecture tissulaire caractéristique d'un organe, contenue dans une culture dédiée à l'expérimentation (3,6,8). De ce fait, ces cultures contribuent à améliorer nettement la conceptualisation de maladies humaines (1).

Outre l'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent certaines maladies et leur impact sur le fonctionnement des organes, les organoïdes servent aux essais de nouvelles molécules thérapeutiques, étant des modèles parfois plus précis que ceux employés auparavant (6,12). Les recherches pharmaceutiques s'intéressent non seulement aux effets du traitement sur les cellules et les tissus, mais également aux réponses globales de l'ensemble des organes lors de l'introduction d'un agent thérapeutique. Par conséquent, cette technologie affine les prédictions des réactions provoquées par une molécule, de sa toxicité et de son efficacité potentielle (13). De plus, la possibilité de tester des stratégies thérapeutiques en utilisant directement le matériel biologique du patient, particulièrement dans le cadre de la recherche contre le cancer, pourrait améliorer considérablement le pronostic en adaptant les traitements aux réponses individuelles observées in vitro (13). L'usage standardisé de ces dispositifs en clinique pourrait révolutionner le domaine de la médecine personnalisée (14).

Au-delà de la modélisation des mécanismes physiopathologiques et de la recherche de nouveaux traitements, les organoïdes sont aussi en voie de devenir des acteurs majeurs en médecine régénérative. En effet, l'utilisation de cellules souches pour la reconstitution de tissus ayant la structure et la fonction d'un organe vivant donne l'espoir aux chercheurs de pouvoir un jour fabriquer des organes de synthèse à la taille réelle (10). Cependant, nous sommes encore loin de telles innovations, malgré les avancées technologiques en la matière (4,11). Pourtant, l'enjeu est de taille dans un contexte de pénurie de don d'organes (15). Par conséquent, les recherches s'intensifient pour pallier le manque d'organes destinés à la transplantation. Néanmoins, pour réaliser cet exploit, il faudra surpasser l'une des restrictions majeures, inhérente à l'agencement des cellules souches dans l'espace, et réussir à contrôler l'auto-organisation spatiale des cellules à l'échelle macroscopique (11). Une telle avancée basculerait la médecine régénérative dans une toute autre dimension clinique. La création d'organes dérivés du matériel biologique des patients en vue d'une transplantation ou de recherches thérapeutiques avancées résoudrait de nombreux obstacles, concernant notamment les délais d'attente de greffe et de la compatibilité des organes du donneur avec le patient (1).

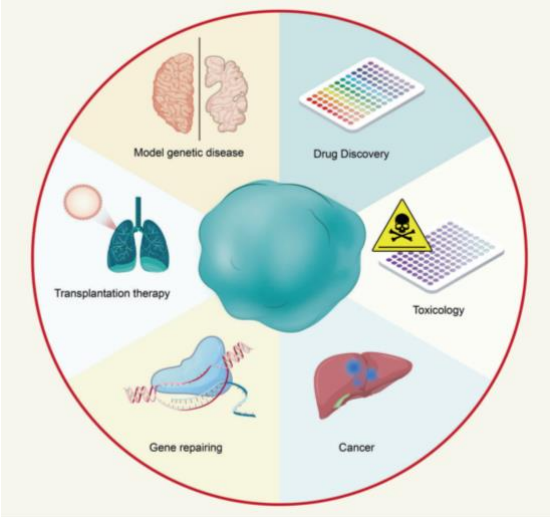

Figure 2. Représentation schématique des divers champs d'application de la technologie des organoïdes (6)

En recherche, de tels organes artificiels éviteraient des problèmes éthiques sous-jacents à l'expérimentation animale (2,16). Cependant, l'utilisation de ces technologies avec l'intention de remplacer les organismes modèles requièrerait en premier lieu la validation de protocoles qui réduiraient son hétérogénéité (4). En effet, les organoïdes sont l'objet d'une importante variabilité, tant dans leur structure que dans leur fonctionnement, exigeant une standardisation du modèle pour étendre leur champ d'application en recherche clinique (4,6,8).

Dans ce travail, nous proposons de donner une description de ce qu'est un organoïde et de présenter succinctement des outils de bioingénierie associés à ce modèle particulier de culture cellulaire. Nous verrons diverses applications en recherche préclinique, ainsi que les avantages et les limitations de leur utilisation. Enfin, nous verrons en quoi cette technique est prometteuse, notamment dans le domaine de la médecine personnalisée.

2. Qu'est-ce qu'un organoïde ?

2.1. Les organoïdes comme modèle de culture tridimensionnelle

Un organoïde est un système de culture cellulaire in vitro, structuré en 3D dans l'espace, permettant aux cellules de s'auto-organiser pour créer des architectures tissulaires complexes avec des fonctions similaires à celles d'un organe in vivo (1,5,7). Il est formé à partir de cellules souches, capables de produire les différents types cellulaires caractéristiques d'un organe (6).

Chaque variété de cellule est déterminée en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles croissent, sous l'influence de multiples facteurs moléculaires (17,18). En effet, l'engagement cellulaire dans une voie de différenciation est médié par l'interaction des cellules avec la niche, contenant des facteurs de croissance et la matrice extracellulaire (ECM) (1) (17) [Figure 3]. Les facteurs de croissance présents dans le milieu de culture ciblent les voies de signalisation intracellulaires qui régulent les gènes responsables du programme morphogénétique (1,11). En introduisant une matrice tridimensionnelle dans le milieu de culture, les cellules s'auto-organisent via les intéractions avec l'échaffaudage 3D, ce qui permet l'assemblage des tissus (1). D'abord, les cellules se regroupent en aggrégats, puis se différencient et s'arrangent dans l'espace (1). À terme, la culture tridimensionnelle adopte la structure et les fonctions d'un véritable organe (1,7).

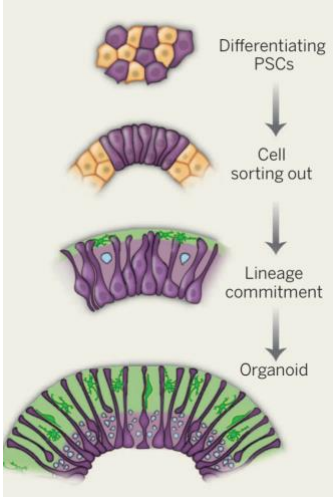

Figure 3. Schéma du principe d'auto-organisation (17)

Le système d'échafaudage est conçu pour imiter la matrice extracellulaire (ECM) (1) (4,8), un constituant essentiel de tous les tissus, qui assure le soutien mécanique des cellules et les conditions biochimiques physiologiques de la niche (7,19). Pour cela, on utilise des hydrogels naturels ou synthétiques, constitués à partir de biopolymères de protéines ou de polysaccharides. Ce sont majoritairement des protéines adhésives comme le collagène, l'entactine, la laminine et les protéoglycans d'heparine sulfate (1), qui sont associées à d'autres protéines telles que la fibrine ou encore l'acide hyaluronique (4). Le plus utilisé parmis ces hydrogels est le Matrigel, une matrice d'origine biologique extraite des cellules Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de sarcomes de souris (1,20). La composition des hydrogels fait régulièrement l'objet de recherches pour trouver les biomatériaux qui soient les plus représentatifs de l'environnement cellulaire. En fonction des applications, leur composition a une importance capitale. Dès lors que l'on utilise du matériel biologique d'origine animale pour établir la matrice, cela réduit la similitude à l'humain et en limite l'usage en recherche, notamment dans le cadre clinique (4,7). Par ailleurs, des facteurs physiques comme la viscoélasticité et la rigidité de l'ECM sont des paramètres à ajuster pour chaque type d'organoïde car elles jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie (4).

Il est également possible de réaliser une culture sans système physique d'échafaudage (1). Dans cette approche, les cellules sont cultivées dans une goutellette, appelée sphéroïde (21,22), maintenue en suspension sur un support grâce à un équilibre entre les forces de gravité et de tension de surface (1,23). Ceci permet de leur éviter d'adhérer à un récipient, avec tous les biais qu'impliquerait l'intéraction des cellules avec le plastique (1,23) (22).

Plusieurs méthodes de culture de cellules souches ont été optimisées afin de se focaliser sur le fonctionnement d'un organe artificiel. C'est par exemple le cas de la culture par interface air-liquide (système de culture ALI), de même que les cultures microfluidiques en trois dimensions (7).

La méthode qui consiste à cultiver les cellules par une interface air-liquide (ALI) (1,7) implique de disposer les précurseurs cellulaires prélevées de tissus primaires sur le Matrigel, alternativement sur une couche de fibroblastes, immergé dans le milieu de culture. Le liquide s'évapore progressivement, laissant la face apicale des cellules souches exposée à l'air. La face basolatérale, quant-à-elle, est maitenue dans l'hydrogel. Les cellules perçoivent ainsi le contraste de l'interface air-liquide et engagent le processus de polarisation (1) [Figure 4]. Le système de culture primaire ALI a été élaboré pour imiter avec le plus de fidélité la polarité des cellules le long des voies respiratoires, qui sont composées de nombreux types cellulaires : les cellules ciliées, les cellules sécrétoires à savoir les cellules caliciformes et les cellules de Clara, les cellules basales sont les cellules progénitrices des différents types cellulaires de l'épithélium respiratoire (7).

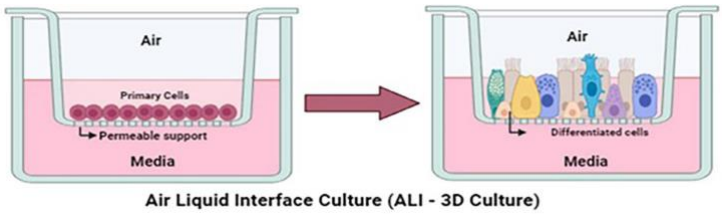

Figure 4. Schéma de la polarisation des cellules cultivées par interface air-liquide (ALI) (7)

Enfin, il existe des dispositifs, tels que les organes-sur-puces, qui incluent des composantes mécano-physiologiques additionnelles au modèle, en particulier l'écoulement de liquides (7,8). Il s'agit d'un système microfluidique dans lequel la culture cellulaire est placée au centre de la puce (2,8) [Figure 5]. Les conditions expérimentales sont modulables grâce à la composition des fluides qui circulent dans des canaux dirigés vers les différents compartiments cellulaires de la culture (8). Les réseaux de fluides peuvent être utilisés pour recréer les gradients morphogénétiques antagonistes établis pendant le développement embryonnaire, en intégrant la dimension spatio-temporelle (8) [Figure 6]. Une fois que le mini-organe a été constitué, les conduits peuvent servir à introduire des molécules dans la culture, par exemple pour évaluer la toxicité d'un médicament sur un tissu spécifique (4,8). Par ailleurs, les organes-sur-puces peuvent intégrer des réseaux vasculaires dans l'objectif de perfuser les cellules et d'apporter les nutriments essentiels à leur maturation et leur survie (2).

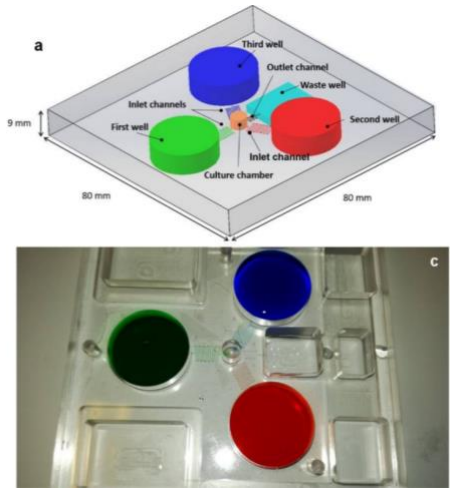

Figure 5. Schéma et photo d'un dispositif d'organe-sur-puce (2)

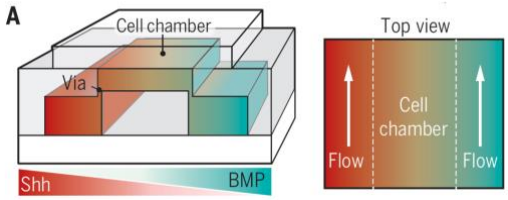

Figure 6. Schéma des gradients morphogéniques antagonistes modélisés par les organes-sur-puce (8)

Les organes-sur-puce, se focalisent surtout sur la fonction d'un organe plutôt que sur son architecture, en la réduisant aux éléments les plus caractéristiques de sa physiologie (8). Par conséquent, cet outil de bioingénierie simplifie l'activité d'un organe, en incluant uniquement les propriétés physico-chimiques et les cellules qui lui sont propres lors de la création de la puce. A contrario, les organoïdes ont plutôt pour objectif de reproduire la structure et la fonction d'un organe dans son intégralité, via les mécanismes d'auto-organisation originels qui se produisent lors de la mise en place des tissus (4).

2.2. Cellules souches

Il existe plusieurs classes de ces cellules souches à partir desquelles les organoïdes sont fabriqués: les cellules souches embryonnaires (ESCs), les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs), les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASCs) néonatales ou adultes (1,7), ainsi que les cellules souches prélevées sur des tissus primaires adultes, notamment par biopsie (3,13). Ce sont toutes des cellules pluripotentes (PSCs), c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de générer tous les types cellulaires d'un organe spécifique grâce à leur potentiel de différenciation (1,24,25). Le processus par lequel elle y parviennent est identique à celui d'un organe in vivo et dépend des conditions définies par le milieu de culture (1).

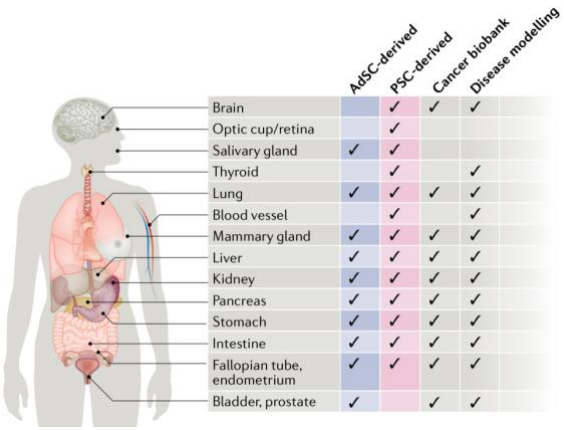

Figure 7. Tableau qui expose les divers organoïdes obtenus à partir des différents types de cellules souches (3)

A l'origine, les iPSCs sont des cellules somatiques. Elles sont prélevées soit dans le sang, soit au niveau de la peau ou du bulbe capillaire (18). Ce sont des fibroblastes qui ont été reprogrammés à l'état de cellules souches embryonnaires pour acquérir les mêmes caractéristiques que les ESCs (3,26,27). Les ESCs sont des cellules souches provenant de la masse cellulaire interne du blastocyste (6,28). Elles donnent naissance aux trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (1,27). Les iPSCs et les ESCs se différencient au moyen de facteurs régulateurs de croissance, ou de cellules supportrices présentes dans le milieu de culture, pour recréer les lignées cellulaires spécifiques d'un organe (3,5).

Une fois que les cellules primitives ont acquis l'identité de l'organe, la culture est placée dans un environnement 3D permettant aux cellules de s'auto-organiser dans l'espace (1,4). Ceci entraîne la sélection cellulaire et l'engagement des différentes lignées dans leur programme de différenciation respectif (1,17). La différenciation des cellules issues des ESCs et des iPSCs récapitule les étapes qui ont lieu au cours de la gastrulation et de l'organogénèse (1). Le changement d'un stade cellulaire à un autre est déclenché par l'introduction de facteurs de transcription qui régulent les gènes de différenciation cellulaire (1,17). Le milieu de culture permet ainsi de reconstituer la composition de l'environnement cellulaire en y intégrant les facteurs qui influencent le développement embryonnaire [Figure 8].

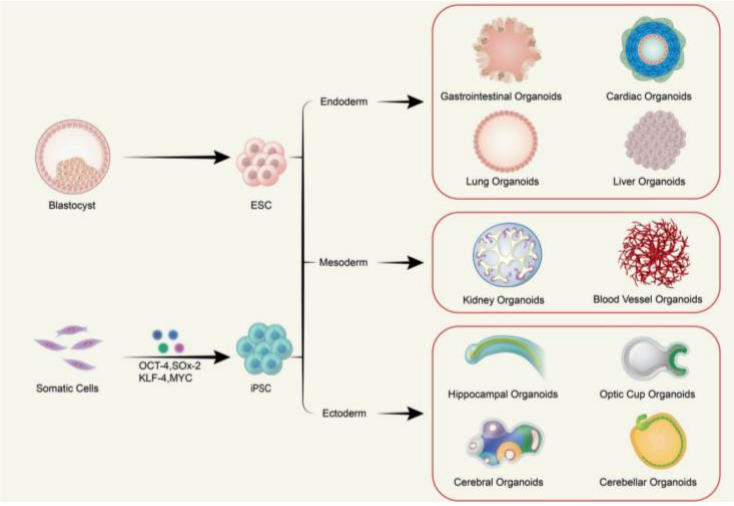

Figure 8. Schéma de la différentiation des ESCs et des iPSCs en organoïdes de divers organes (6)

Les ASCs, quant à elles, sont les cellules souches mésenchymateuses caractéristiques du tissu adipeux (25). Elles sont prélevées au niveau des régions sous-cutanées (25). Comme les ESCs et les iPSCs, elles nécessitent des facteurs de croissance pour développer les tissus d'un organe spécifique. Cependant, la combinaison de facteurs moléculaires qui est utilisée pour cultiver les ASCs n'est pas similaire à celles des ESCs et des iPSCs (1). En effet, les ASCs sont prélevées des tissus adipeux matures, post-nataux ou adultes, qui ont déjà traversé les stades développementaux de la période embryonnaire (24,25). Par conséquent, pour générer les trois feuillets embryonnaires, les ASCs activent des voies de signalisation en conditions d'homéostasie tissulaire, qui diffèrent de celles qui sont enclenchées en conditions développementales (1). C'est pourquoi, pour amorcer la différenciation des ASCs, le milieu de culture doit contenir un ensemble de facteurs moléculaires représentatifs des conditions tissulaires.

2.3. Modification génétique d'iPSCs

La reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs est une découverte qui a valu le prix Nobel de médecine à Shinya Yamanaka en 2012 (29). Ses travaux ont démontré que l'induction des gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc permettait d'obtenir des cellules souches pluripotentes (26) [Figure 9]. Aujourd'hui, cette technique est extrêmement bien maîtrisée en laboratoire, à tel point que les iPSCs acquièrent un potentiel de prolifération et de différenciation similaire à celui des ESCs. De même, les protocoles de différenciation des iPSCs sont désormais mieux contrôlés qu'auparavant et ils sont efficaces pour restituer les différents types cellulaires d'un tissu (18). Malgré cela, il faut être conscient qu'une hétérogénéité persiste au sein des cultures, due à l'auto-organisation des cellules souches (4,8).

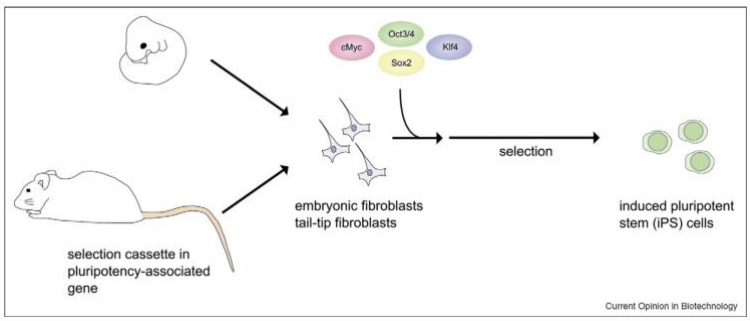

Figure 9. Schéma de la repogrammation de cellules somatiques en iPSCs via les gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (26)

Une avancée supplémentaire dans la production des lignées cellulaires issues des iPSCs a été de créer des souches modifiées dans le but de reproduire le profil génétique du patient (18). Des endonucléases ont été employées à cet effet pour intégrer ou corriger des mutations dans le génome de manière ciblée. Il s'agit par exemple de la nucléase effectrice de type activateur de transcription (TALEN) et plus récemment, de l'endonucléase Cas9 associée au système de répétition de courtes séquences palindromiques regulièrement espacées (CRISPR) (5,18). La technologie CRISPR-Cas9, élaborée par Emmanuelle Charpentier et Jennifer A. Doudna, a d'ailleurs été également récompensée en 2020 par le prix Nobel de chimie pour le développement d'une méthode d'édition du génome sites-spécifique (30).

Dès lors, pour cribler des médicaments il est non seulement possible de prélever les cellules d'un patient atteint, mais aussi de générer une pathologie qui intègre les mêmes spécificités que cet individu grâce aux iPSCs génétiquement modifiées (18). Nous verrons dans un chapitre dédié à la modélisation des maladies et la découverte de nouvelles thérapies, quels seraient les avantages de cette méthode en recherche préclinique, à travers l'exemple de la mucoviscidose.

2.4. Questions de recherche

« Les organoïdes sont utilisés dans divers domaines tels que les maladies infectieuses, les pathologies d'orgine génétique et les cancers, en utilisant des cellules souches humaines ou des cellules somatiques primaires, des cellules humaines génétiquement modifiées et des échantillons de biopsies de patients humains » (7).

Certaines cellules sont plus indiquées que d'autres pour répondre à une question de recherche. Par exemple, les organoïdes qui utilisent des ESCs et iPSCs sont plus appropriés que les ASCs aux recherches en embryologie, afin d'étudier l'organogénèse au cours des premières étapes du développement (1). En effet, grâce à la culture d'organoïdes dérivés des ESCs et iPSCs, les chercheurs ont la possibilité de reconstituer les étapes de l'engagement cellulaire dans les voies de différenciation cellulaire, en se focalisant sur les mécanismes d'auto-régulation spatio-temporels mis en place lors de l'assemblage des tissus à des stades précoces (1,11,17).

Par ailleurs, les organoïdes, qu'ils soient issus des ESCs, iPSCs ou ASCs, offrent la possibilité d'étudier et de simuler le fonctionnement d'un organe en conditions physiologiques ou pathologiques, en variant les conditions expérimentales (7). Ils sont élaborés dans le but d'adopter la structure et la fonction d'un organe, à taille réduite. Par conséquent, ils sont utilisés pour décrire les mécanismes physiologiques qui se produisent dans notre corps (1). Cependant, dès lors que l'on s'intéresse aux différentes voies de signalisation cellulaires, il faut tenir compte du fait qu'un organoïde est isolé du reste du corps et coupé de tous les échanges qui pourraient avoir lieu dans l'organisme, qui serviraient à maintenir l'homéostasie, ou à coordonner le fonctionnement de l'ensemble d'un système par exemple. C'est un inconvénient majeur, notamment pour la recherche de nouveaux médicaments car en utilisant des organoïdes il n'est pas possible de considérer l'ensemble des échanges moléculaires qui auraient potentiellement des répercussions sur l'efficacité du traitement ou sa toxicité. Les organes-sur-puces constituent une alternative pour mener des essais en phase pré-clinique car ils offrent la possibilité de rassembler plusieurs organes artificiels sur une même puce [Figure 10]. Ceci permet d'établir les relations entre les organes de manière à tenir compte de l'association de ces différentes sous-unités anatomiques dans l'analyse (8).

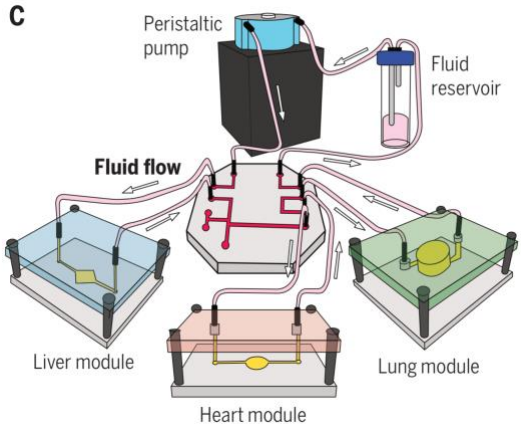

Figure 10. Schéma d'un modèle de microingénierie cœur-poumon-foie relié entre elles pour tester des molécules pharmacologiques (8)

2.5. Méthode de bioimpression BATE

Les organoïdes dérivés des cellules souches ont un potentiel d'auto-organisation qui les rend uniques en tant que modèle de culture tissulaire et « inégalé[s] en termes de reproduction des caractéristiques locales de l'architecture tissulaire et de la composition en types cellulaires » (11). L'architecture des tissus d'un organoïde reste cependant imparfaite. En effet, la culture ne pouvant pas excéder l'échelle du millimètre, sa taille est insuffisante pour reproduire avec exactitude la complexité de l'ensemble des interactions cellulaires telles qu'elles se produisent dans un véritable organe (11). Les échanges qui ont lieu dans l'intégralité de l'organisme tout au long de la vie d'un individu, participent au développement et au maintien des fonctions physiologiques des tissus. Malheureusement, les organoïdes ne sont pas encore représentatifs d'une telle complexité biologique à si petite échelle (11).

Toutefois, afin d'exploiter au mieux le potentiel d'auto-organisation des organoïdes, ces derniers sont parfois combinés à d'autres méthodes de bioingénierie, telle que la bioimpression. Il s'agit d'une technique d'impression 3D de tissus et d'organes artificiels, utilisant des encres biologiques faites de biomatériaux, en association avec des facteurs moléculaires et des cellules vivantes(11).

Il existe désormais une nouvelle méthode de bioimpression, appelée "bioprinting-assisted tissue emergence" (BATE) (11), conçue pour diriger la morphogénèse des tissus dérivés de cellules souches et d'organoïdes. L'association entre la culture d'organoïdes et la bioimpression BATE garantit une meilleure préservation de l'organisation spatiale des cellules et confère une architecture tissulaire plus précise que celles obtenues avec les méthodes classiques de culture cellulaire en 3D (11). Dans une approche classique de culture d'organoïdes, la matrice extracellulaire sert d'environnement permissif à l'auto-organisation mais ne constitue pas, en soit, un modèle d'architecture lors de l'assemblage des tissus. Par conséquent, les organoïdes sont formés par l'arrangement relativement aléatoire des agrégats cellulaires dans l'espace (4,11). En revanche, BATE contraint les cellules à s'organiser en respectant un plan tridimensionnel, déposé sur des matrices extracellulaires qui sont adaptées à cet usage, telles que le Matrigel, le collagène I ou la méthylcellulose (11).

Le dispositif est composé d'un microscope couplé à une seringue, permettant de visualiser le transfert de bio-encre à l'intérieur de la matrice 3D située sur la platine [Figure 11]. Ainsi, les cellules sont aspirées puis déposées successivement par la seringue dans les hydrogels en cours de gélification. Ce système facilite l'impression 3D en donnant un retour visuel de la matière qui est déposée sur la matrice en temps réel. Par conséquent, cette technique de bioimpression n'exige pas une expertise approfondie en hydrogels et en bio-encres, et en facilite l'utilisation. (11)

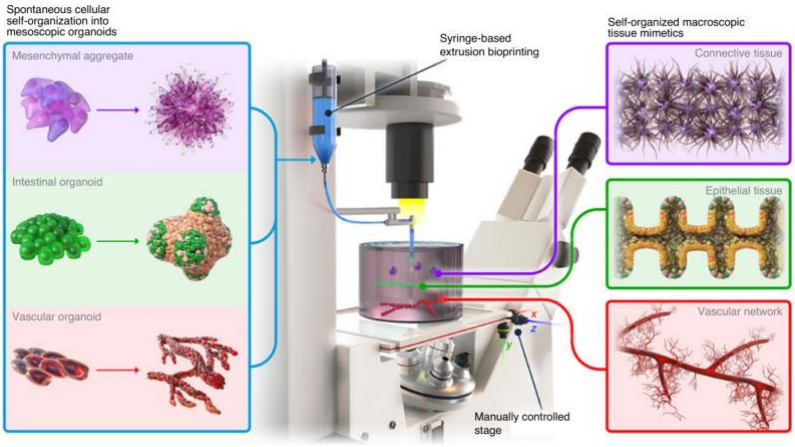

Figure 11. Schéma du concept de bioimpression BATE pour la conception d'organoïdes (11)

L'association de la méthode de bioimpression BATE et de la culture d'organoïdes a permis de « contrôler l'auto-organisation des tissus à des échelles millimétriques et centimétriques, ce qui ouvre de nouvelles voies pour la recherche de médicaments, le diagnostic et la médecine régénérative » (11) [Figure 12].

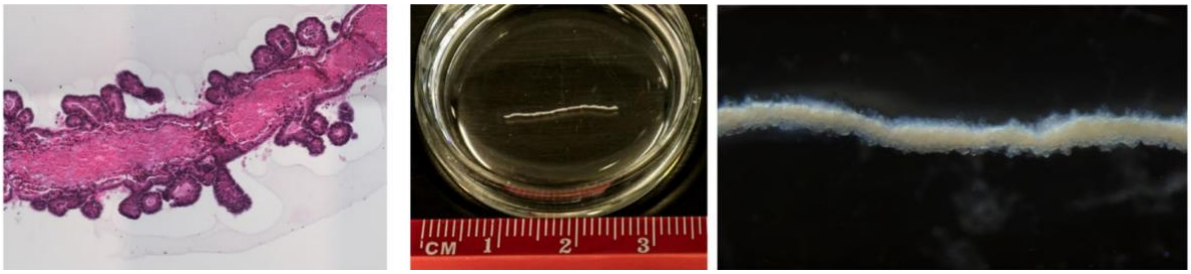

Figure 12. Images histologiques et de culture d'un organoïde d'intestin créé en utilisant la méthode BATE

3. Utilisation en recherche préclinique

3.1. Modélisation des maladies

Pour mesurer la portée des bénéfices liés à l'utilisation des organoïdes dans la caractérisation du phénotype d'une pathologie, nous prendrons exemple sur la mucoviscidose.

La mucoviscidose est une maladie au tableau clinique complexe, qui touche principalement les voies respiratoires, le canal biliaire, le pancréas et les intestins (5). Il s'agit d'une maladie monogénique autosomale récessive qui affecte le canal CFTR situé principalement sur la membrane apicale des ionocytes, ainsi qu'au niveau des cellules sécrétoires et des cellules basales des muqueuses (31,32). Le CFTR est un canal transmembranaire permettant le passage des ions chlore et bicarbonate à travers la membrane plasmique (32). Il est directement impliqué dans la régulation des flux d'eau entre différents compartiments tissulaires. Un défaut lié au canal CFTR induit un dérèglement des échanges ioniques, provoquant une perturbation de l'homéostasie aqueuse. Cela conduit notamment à l'obstruction des voies respiratoires, des canaux pancréatiques et biliaires en raison d'un changement dans la composition du mucus, qui devient plus visqueux et épais. De ce fait, les patients développent des infections et des inflammations chroniques. (5,33)

Les anomalies à l'origine d'un dysfonctionnement du CFTR peuvent survenir d'une malformation du canal, d'une dérégulation ou d'un défaut de maturation, d'acheminement et d'inclusion à la membrane plasmique (34). A l'heure actuelle, plus de 700 variants du gène CFTR ont été décrites comme étant pathogènes pour cette maladie (35). Le déficit fonctionnel de la protéine CFTR et la sévérité de la maladie sont variables selon le type de mutation et la combinaison des allèles atteints chez un patient. Les mutations non-sens, de même que certaines mutations qui affectent l'épissage de l'ARNm, entraînent l'absence de protéine fonctionnelle. Les mutations faux-sens provoquent généralement des défauts de conformation de la protéine lors de sa production, ce qui influence le trafic intracellulaire de la protéine. Dans ce cas, une quantité importante est dégradée par le protéasome, ce qui a pour conséquence de réduire sa présence au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (36). Un exemple serait la forme la plus courante de mucoviscidose au sein de la population caucasienne, causée par à la mutation faux-sens F508del dans le gène CFTR, qui altère le transport et l'ouverture du canal en raison du repliement incorrect de la protéine (12) [Figure 13].

Dans certaines formes de mucoviscidose le transport et la fonction de la protéine sont diminués tandis que dans d'autres, la protéine peut tout à fait être capable de rejoindre la membrane mais avoir une fonction limitée. Cela peut être dû à une diminution de la probabilité d'ouverture du canal CFTR, une réduction de la conductance ionique, une plus faible densité des canaux CFTR, ou la dislocation prématurée des canaux CFTR de la surface des cellules épithéliales (36) [Figure 13].

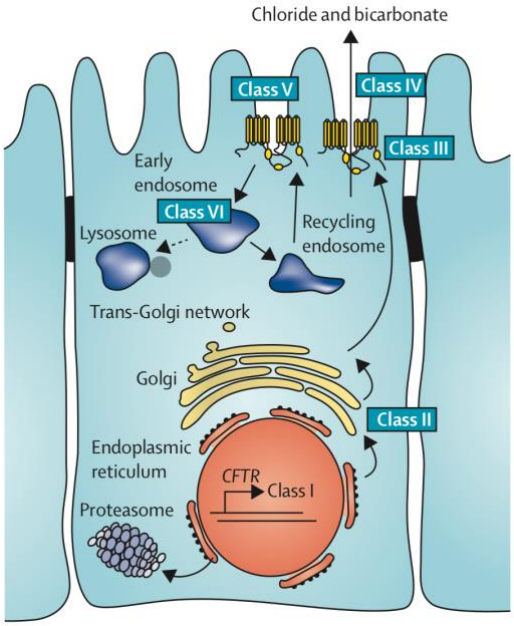

Figure 13. Schéma des différentes classes et des effets des mutations pathogènes sur la fonction du CFTR (34)

De plus, les caractéristiques et la sévérité de la maladie dépendent de la combinaison des variants du gène CFTR trouvée chez un individu atteint. Par exemple, la mutation F508del peut se trouver à l'état homozygote, ou sous une forme hétérozygote, associée à une mutation à activité résiduelle ou minimale du CFTR (36,37). Enfin, les gènes modificateurs du CFTR et d'autres facteurs issus de l'environnement contribuent à l'inégalité de la gravité des symptômes chez des patients avec le même profil génétique de mutation CFTR (36).

Les connaissances sur le CFTR et la pathogénèse de la mucoviscidose ont notamment été acquises grâce à des modulateurs du canal. Il s'agit de molécules qui restaurent l'activité et le trafic intracellulaire du CFTR : les potentiateurs augmentent l'activité du canal, les correcteurs améliorent sa production et son transport jusqu'à la membrane plasmique. (36)

Le criblage moléculaire des modulateurs a principalement été effectué sur des lignées cellulaires transfectées et des cultures primaires ALI de cellules épithéliales. Récemment, les organoïdes ont constitué un modèle de choix pour mesurer la fonction du CFTR d'après le profil génétique du patient et en réponse aux modulateurs. Ainsi, la méthode Forskolin-induced-swelling (FIS) a permis de suivre l'activité du CFTR dans des organoïdes intestinaux dérivés de patients atteints de mucoviscidose (37) [Figure 14]. La Forskoline est un activateur de l'adénylate cyclase (3,12,38) qui est introduite dans un organoïde où elle entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire (39). Lorsque le CFTR est fonctionnel, la variation de la concentration d'AMPc est accompagnée du transport d'ions et de fluide dans la lumière de l'organoïde ce qui induit son gonflement. En revanche, le gonflement ne survient pas en présence de mutations dans le gène CFTR responsables de la mucoviscidose (37,39). Avant d'être employés pour le criblage de médicaments, les organoïdes dérivés de patients ont ainsi été utilisés afin d'appréhender les défauts générés par un ensemble de mutations spécifiques du CFTR sur les voies de signalisation moléculaire, en rétablissant l'activité du canal par le biais de modulateurs pharmacologiques.

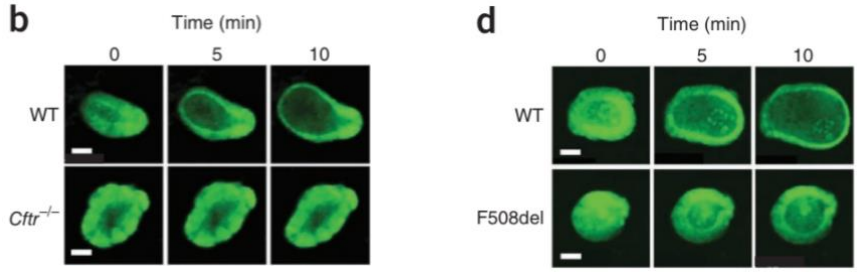

Figure 14. Images de microscopie confocale du test Forskolin-induced-swelling effectué sur des organoïdes de souris wild type et sur des organoïdes intestinaux mutants pour le gène CFTR (12).

3.2. **Découverte de nouvelles thérapies**

L'utilisation des organoïdes dérivés des patients ou d'iPSCs génétiquement modifiées prend tout son sens en recherche préclinique, notamment lorsqu'il s'agit d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'un produit avant de lancer des essais cliniques. En reprenant le cas de la mucoviscidose, les criblages moléculaires sont d'abord effectués sur des cellules immortalisées, portant une mutation dans le gène CFTR. Cependant, les lignées cellulaires ne sont pas strictement fidèles à la physiologie des cellules humaines et aux mécanismes rattachés à cette pathologie (3,18). C'est pourquoi, si un effet a été identifié sur les souches de laboratoire immortalisées, il doit être confirmé sur des cellules issues de tissus primaires humains.

De plus, avant de commencer les phases d'essais cliniques chez les volontaires sains, les médicaments sont testés au péalable sur des organismes modèles (40). Toutefois, encore à ce stade, les données récoltées chez l'animal ne sont pas toujours représentives de l'être humain. Les modèles animaux expérimentaux comptent des différences physiologiques, anatomiques, génétiques, morphologiques avec l'humain, pafois même en réponse à des facteurs environnementaux (7). Par exemple, les souris atteintes de mucoviscidose ne présentent pas le même phénotype spontané que l'humain au niveau des voies respiratoires, du foie et du pancréas (5). Effectivement, les souris malades ne sont pas sujettes aux infections chroniques comme le sont les patients souffrant de mucoviscidose, elles ne développent pas de maladie pancréatique exocrine, ni de diabète (CFRD), ni de maladie hépatique (CFLD) liée à la mucoviscidose. Par conséquent, si un médicament agit sur l'amélioration des symptômes de l'un de ces phénotypes, son effet ne sera pas détectable chez la souris. Dans le cas de la mucoviscidose, d'autres animaux comme le porc et le furet entre autres, constituent désormais de meilleurs modèles d'un point de vue anatomique et physiopathologique. Contrairement aux souris, le furet et le porc développent des infections pulmonaires, des maladies pancréatiques exocrines, de même que le CFRD et le CFLD. Sous un angle histologique, le porc et le furet possèdent tous les deux des glandes sous-muqueuses au niveau des zones cartilagineuses des voies respiratoires, tandis que leur présence est limitée à la trachée chez la souris (5).

Les modèles animaux sont nécessaires pour témoigner de la validité des effets de produits thérapeutiques sur un organisme avant son introduction chez l'homme. Cependant, les différences entre les espèces modèles et les humains témoignent de la nécessité d'adopter de nouvelles méthodes de criblage moléculaire en amont des essais cliniques, qui reposent sur des modèles organoïdes fiables et fidèles aux caractéristiques humaines. Le but est d'obtenir une prédiction plus performante de l'efficacité des médicaments et des risques de toxicité chez les patients avant de tester ces molécules sur les animaux puis de démarrer des essais cliniques (7).

Par ailleurs, grâce aux progrès des méthodes d'édition du génome, CRISPR-Cas9 pourrait servir à corriger des maladies monogéniques, plutôt qu'à simuler une pathologie (39) [Figure 15]. Actuellement, les thérapies disponibles pour traiter les patients atteints de mucoviscidose ne sont pas curatives (36). En revanche, elles réduisent les symptômes de la maladie. Toutefois, les patients qui souffrent d'un stade avancé sont généralement obligés de subir une transplantation d'un ou plusieurs organes (36). Dans une étude portant sur la mutation F508del, la restauration du gène CFTR a conduit au rétablissement de la fonction du canal (39). Cela a été confirmée par le test FIS. Cependant, les organoïdes intestinaux qui ont été corrigés génétiquement n'ont pas été transplantés dans les modèles animaux pour témoigner de la faisabilité de leur intégration au sein d'un organisme vivant.

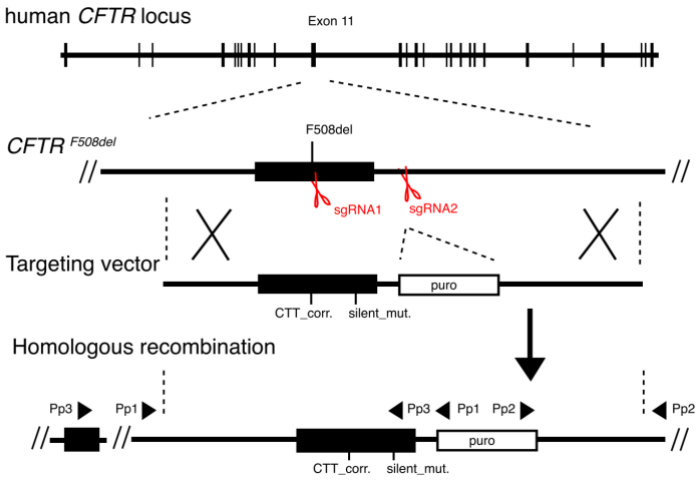

Figure 15. Schéma de la recombinaison du gène CFTR par recombinaison homologue via CRISPR-Cas9 (39)

Bien que la thérapie génique ne soit pas encore utilisée dans la pratique clinique pour traiter la mucoviscidose (18), cette étude a été la première à mettre en lumière ce nouvel axe de recherche pour le traitement des maladies monogéniques, en corrigeant directement la mutation grâce aux méthodes d'édition du génome. La mucoviscidose ayant une atteinte multiorgane, il est difficile d'appliquer cette théorie à cette pathologie mais ce principe pourrait s'avérer utile pour traiter d'autres maladies monogéniques (39).

3.3. **Médecine personnalisée**

L'un des défis majeurs de la médecine moderne est de trouver des méthodes permettant de tenir compte de la variabilité de la réponse au traitement au sein d'une population. In fine, l'objectif est de proposer des traitements qui soient adaptés spécifiquement au profil de chaque patient chez qui la pathologie a été diagnostiquée, afin d'améliorer ses chances de guérison (4,39). Ainsi, les organoïdes sont devenus des outils de recherche particulièrement intéressants en médecine personnalisée car ils permettent de tenir compte des facteurs individuels qui influencent le pronostic, afin de les intégrer dans de nouvelles approches thérapeutiques (3,7,13,14).

Désormais, en prélevant le matériel biologique des patients pour cultiver des organoïdes, il est possible de comparer l'efficacité de plusieurs traitements directement sur des échantillons qui soient spécifiques de chaque individu. Dans le cas de la mucoviscidose : « les données actuelles indiquent qu'une combinaison de correcteurs du CFTR, de potentialisateurs et de molécules qui empêchent un renouvellement excessif des protéines mutantes sera nécessaire. Cette association thérapeutique devrait idéalement être adaptée non seulement aux différentes mutations du CFTR, mais aussi à chaque patient individuel, qui présente dans la plupart des cas deux mutations différentes » (18). À terme, les organes qui sont impactés par cette maladie pourraient être modélisés grâce aux organoïdes dérivés de patients pour tester la réponse aux médicaments dans un contexte de médecine personnalisée. Cette technologie permettrait de suivre l'effet de différentes combinaisons de produits pharmaceutiques et d'adapter le dosage avant d'administrer le traitement au patient (3,4).

Actuellement, de tels "avatars" d'organes humains sont déjà utilisés dans la recherche sur le cancer car dans cette pathologie, l'efficacité d'un traitement varie considérablement d'un patient à un autre, notamment en fonction de son profil génétique et du stade auquel il est diagnostiqué (41). Avoir la possibilité de reconstituer l'environnement tumoral avec des organoïdes permet de tester plusieurs approches et d'orienter le patient vers les stratégies thérapeutiques auxquelles il répond le mieux (18) [Figure 16].

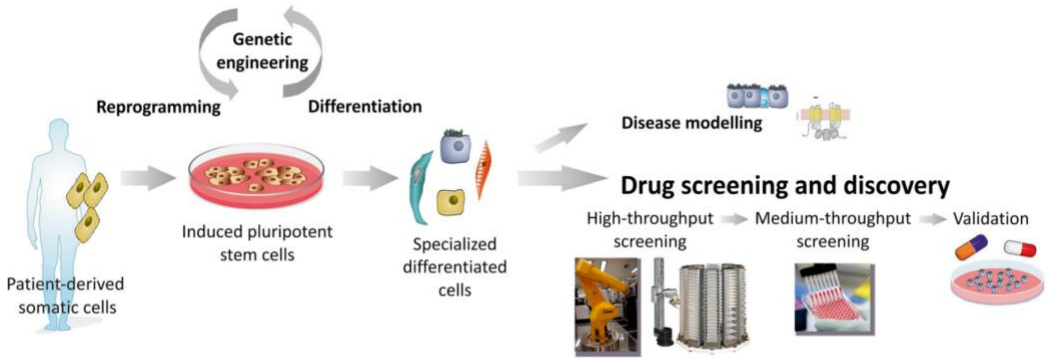

Figure 16. Schéma des potentiels des cellules souches pluripotente en médecine régénérative (18)

Dans une étude visant à inclure une patiente atteinte d'une mutation rare du CFTR dans un programme d'utilisation compassionnelle, un organoïde d'intestin a été créé à partir du matériel biologique de celle-ci afin de mesurer la fonction résiduelle minimale du CFTR, et de tester son éligibilité à la trithérapie elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (37). L'amélioration de la fonction du CFTR a été démontrée par la FIS, ce qui a permis à la patiente de bénéficier de ce traitement. Bien que ces médicaments soient déjà commercialisés, l'effet de leur association dans l'amélioration des symptômes a révélé le potentiel d'une utilisation en trithérapie dans le cas d'une mutation rare du CFTR.

4. Conclusion

Après avoir donné un aperçu de l'utilisation des organoïdes en recherche préclinique, nous en concluons que ce modèle expérimental présente des qualités intermédiaires entre la culture cellulaire et les modèles animaux. Il présente une complexité supérieure à celle des cultures cellulaires classiques sur le plan physiologique. En revanche, il n'atteint pas celle d'un organisme vivant (4). Le succès d'une thérapie, lorsqu'elle est testée chez l'animal, conduit souvent à un échec lors des premières phases d'essais cliniques. Par conséquent, certaines recherches sont suspendues voir abandonnées en raison de l'absence de sécurité et l'efficacité incertaine des produits qui sont administrés aux patients. Ces complications engendrent des coûts qui pourraient sûrement être évités avec des modèles prédictifs plus performants. En raison de la fidélité avec laquelle les organoïdes génétiquement modifiés ou dérivés de patient reproduisent les organes humains, ils pourraient certainement surpasser les modèles de cultures cellulaires et les modèles animaux pour effectuer les premières étapes de criblage de nouvelles thérapies en recherche préclinique. Enfin, la détermination de la dose adéquate pour traiter chaque patient individuellement constitue une avancée majeure en vue de nouvelles applications cliniques en médecine personnalisée.

Toutefois, malgré des progrès considérables en matière d'optimisation des protocoles de culture d'organoïdes, la fiabilité et la reproductibilité de ces méthodes sont limitées par des facteurs inhérents au modèle lui-même. Ainsi, la taille, l'hétérogénéité des lignées cellulaires, la variabilité de l'architecture d'une culture à une autre, la composition chimique et la composante biomécanique des matrices sont toutes des contraintes techniques auxquels les chercheurs sont exposés. Certains outils de bioingénierie, comme la méthode BATE, tentent de surmonter ces obstacles. Cependant, malgré toutes ces prouesses technologiques, il est possible que les organoïdes ne parviennent jamais à s'approprier les avantages qu'offrent aujourd'hui la culture cellulaire 2D et les modèles animaux. La question n'est peut-être pas de vouloir remplacer les modèles actuels, mais plutôt de chercher « jusqu'à quel point le simplisme est-il suffisamment complexe » (4). Cela nous inciterait à privilégier le modèle le plus adéquat en fonction de son application en recherche, en étant particulièrement attentif au fait qu'une augmentation de la complexité du modèle rend généralement les systèmes de contrôle et l'élaboration de procédures standardisées plus difficiles (4).

Au vu des obstacles rencontrés en recherche préclinique, l'utilisation des organoïdes comme organes de synthèse paraît aujourd'hui illusoire. Pour autant, au-delà de l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative, les organoïdes pourraient bien être utilisés prochainement ou à terme pour reconstituer des tissus ou des parties d'un organe affectés par une pathologie.

Bibliographie

1. Corrò C, Novellasdemunt L, Li VSW. A brief history of organoids. American Journal of Physiology-Cell Physiology. juill 2020;319(1):C151-65.
2. Limongi T, Guzzi F, Parrotta E, Candeloro P, Scalise S, Lucchino V, et al. Microfluidics for 3D Cell and Tissue Cultures: Microfabricative and Ethical Aspects Updates. Cells. janv 2022;11(10):1699.
3. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2020;21(10):571-84.
4. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. Nat Rev Mater. mai 2021;6(5):402-20.
5. Rosen BH, Chanson M, Gawenis LR, Liu J, Sofoluwe A, Zoso A, et al. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. 1 mars 2018;17(2):S28-34.
6. Tang XY, Wu S, Wang D, Chu C, Hong Y, Tao M, et al. Human organoids in basic research and clinical applications. Sig Transduct Target Ther. 24 mai 2022;7(1):1-17.
7. Gopallawa I, Gupta C, Jawa R, Cyril A, Jawa V, Chirmule N, et al. Applications of Organoids in Advancing Drug Discovery and Development. Journal of Pharmaceutical Sciences [Internet]. 14 juill 2024 [cité 20 juill 2024]; Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354924002338
8. Park SE, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. Science. 7 juin 2019;364(6444):960-5.
9. Willyard C. The boom in mini stomachs, brains, breasts, kidneys and more. Nature. 1 juill 2015;523(7562):520-2.
10. Bloch G. La grande ruée des start-up et des pharmas vers les organoïdes. 1 nov 2022 [cité 6 mai 2024]; Disponible sur: https://swiss3rcc.org/media/pages/article/bae73e0ab2-1704451040/article-organoids-en-suisse_octobre-2022.pdf
11. Brassard JA, Nikolaev M, Hübscher T, Hofer M, Lutolf MP. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting. Nat Mater. janv 2021;20(1):22-9.
12. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. Nat Med. juill 2013;19(7):939-45.
13. Takahashi T. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 6 janv 2019;59(Volume 59, 2019):447-62.
14. Skardal A, Shupe T, Atala A. Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. Drug Discovery Today. 1 sept 2016;21(9):1399-411.
15. Journée européenne du don (EDD) - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé - EDQM [Internet]. [cité 23 août 2024]. Disponible sur: https://www.edqm.eu/en/edd
16. Le Centre de Compétences en 3Rs Suisse (3RCC) [Internet]. [cité 11 mai 2024]. Disponible sur: https://swiss3rcc.org/fr/3rs-resources
17. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. Science. 18 juill 2014;345(6194):1247125.

18. Martin U. Pluripotent stem cells for disease modeling and drug screening: new perspectives for treatment of cystic fibrosis? Mol Cell Pediatr. 14 déc 2015;2(1):15.
19. de Jaeger C, Cherin P. Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. Médecine & Longévité. 1 mars 2012;4(1):41-53.
20. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. Journal of Experimental Medicine. 1 janv 1977;145(1):204-20.
21. Larsen CJ. Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture in vitro des tumeurs solides ? Bulletin du Cancer. 1 janv 2018;105(1):25-34.
22. Fang G, Chen YC, Lu H, Jin D. Advances in Spheroids and Organoids on a Chip. Advanced Functional Materials. 2023;33(19):2215043.
23. Timmins NE, Nielsen LK. Generation of Multicellular Tumor Spheroids by the Hanging-Drop Method. In: Hauser H, Fussenegger M, éditeurs. Tissue Engineering [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2007 [cité 20 juill 2024]. p. 141-51. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8
24. Bhartiya D. Clinical Translation of Stem Cells for Regenerative Medicine. Circulation Research. 15 mars 2019;124(6):840-2.
25. Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. Stem Cells Int. 10 déc 2020;2020:8810813.
26. Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. Current Opinion in Biotechnology. 1 oct 2007;18(5):467-73.
27. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 25 août 2006;126(4):663-76.
28. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. juill 1981;292(5819):154-6.
29. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 [Internet]. [cité 14 août 2024]. Disponible sur: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/yamanaka/facts/
30. The Nobel Prize in Chemistry 2020 [Internet]. [cité 14 août 2024]. Disponible sur: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/
31. Lei L, Traore S, Romano Ibarra GS, Karp PH, Rehman T, Meyerholz DK, et al. CFTR-rich ionocytes mediate chloride absorption across airway epithelia. J Clin Invest. 133(20):e171268.
32. CFTR Gene - GeneCards | CFTR Protein | CFTR Antibody [Internet]. [cité 23 août 2024]. Disponible sur: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFTR
33. Cystic fibrosis: MedlinePlus Genetics [Internet]. [cité 20 août 2024]. Disponible sur: https://medlineplus.gov/genetics/condition/cystic-fibrosis/
34. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. The Lancet. 5 juin 2021;397(10290):2195-211.
35. CFTR2 Variant List History | CFTR2 [Internet]. [cité 20 août 2024]. Disponible sur: http://www.cftr2.org/mutations_history
36. Mercier JC, Foucaud P. Modulateurs pharmacologiques du canal CFTR : une révolution thérapeutique dans la mucoviscidose. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. 1 juin 2022;206(6):775-86.
37. Aalbers BL, Brunsveld JE, van der Ent CK, van den Eijnden JC, Beekman JM, Heijerman HGM. Forskolin induced swelling (FIS) assay in intestinal organoids to guide eligibility for compassionate use treatment in a CF patient with a rare genotype. Journal of Cystic Fibrosis. 1 mars 2022;21(2):254-7.
38. Seamon KB, Daly JW. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. J Cyclic Nucleotide Res. 1 janv 1981;7(4):201-24.
39. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. Cell Stem Cell. 5 déc 2013;13(6):653-8.
40. Les essais cliniques (Recherches interventionnelles portant sur un produit de santé) · Inserm, La science pour la santé [Internet]. [cité 21 août 2024]. Disponible sur: https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante/
41. Des tumeurs «avatars» pour combattre le cancer colorectal - Médias - UNIGE [Internet]. 2023 [cité 6 mai 2024]. Disponible sur: https://www.unige.ch/medias/2023/des-tumeurs-avatars-pour-combattre-le-cancer-colorectal