



Les organoïdes, des alternatives incontournables

Cultiver des organes humains miniatures est possible aujourd'hui grâce aux technologies de cultures multidimensionnelles. Les organoïdes offrent cette nouvelle perspective de modélisation de tissus fonctionnels incluant la peau, afin d'en étudier la physiologie normale ou pathologique mais également d'identifier les activités biologiques et les aspects toxicologiques de molécules.

Organoids, the unavoidable alternatives

It is now possible to grow miniature human organs using multidimensional culture technologies. Organoids offer a new way of modelling functional tissues, including the skin, in order to study normal or pathological physiology and to identify the biological activities and toxicological aspects of molecules.

PAR/BY
Rachida
Nachat-Kappes, PhD
Scientific
Consultant,
InnovSkin.com

En 1907, Ross Harrison montrait, pour la première fois, la croissance de fibres nerveuses *in vitro*. Cependant, il aura fallu attendre les années 50, avec l'urgence de développer des vaccins lors des grandes épidémies de polio, pour que la culture cellulaire prenne de l'ampleur et soit réalisée à échelle industrielle. Le vaccin antipoliomyélitique développé à partir d'un virus désactivé est devenu l'un des premiers produits commerciaux issus de cellules animales cultivées. En 1975, Rheinwald et Green publiaient dans la célèbre revue *Cell*, leurs travaux et succès à cultiver à grande échelle des kératinocytes humains normaux (NHEK), à l'aide de couches nourricières de la lignée de fibroblastes 3T3 irradiés ⁽¹⁾. Quelques années plus tard, Pruniéras *et al.*, démontraient que l'exposition des

In 1907, Ross Harrison demonstrated the growth of nerve fibres *in vitro* for the first time. It was not until the 1950s though, driven by the urgent need to develop vaccines during major polio epidemics, that cell culture developed and was produced on an industrial scale. The polio vaccine, developed from a deactivated virus, became one of the first commercial products to be produced using cultured animal cells. In 1975, in the famous journal *Cell*, Rheinwald and Green published their research into and success with large-scale cultivation of normal human keratinocytes (NHEK), using feeder layers of the irradiated 3T3 fibroblast line ⁽¹⁾. A few years later, Pruniéras *et al.* demonstrated that exposing keratinocytes to an air-liquid interface enabled the development of a fully stratified, differentiated and cornified epidermis ⁽²⁾.

kératinocytes à une interface air-liquide permettait le développement d'un épiderme entièrement stratifié, différencié et cornifié⁽²⁾. Le premier modèle 3D reconstruit voyait le jour, et depuis, ces systèmes n'ont cessé de se perfectionner afin de se rapprocher de la physiologie et de la fonction des tissus humains.

Des modèles 2D devenus obsolètes

Les modèles de cultures en monocouche ou en suspension ont été largement utilisés par la communauté scientifique afin de caractériser et comprendre les principales fonctions cellulaires ou les effets de diverses substances. Initialement, ces modèles se basaient sur des lignées cellulaires immortalisées, comme la célèbre lignée HeLa établie à partir d'un carcinome cervical humain. Elle provenait d'une patiente, Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus, dont les cellules avaient été isolées à partir de biopsies réalisées sans son consentement. Décédée en 1951 à l'âge de 31 ans, la jeune femme s'est vue décernée une distinction à titre posthume en 2021 par le Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, directeur général de l'OMS, pour sa contribution inestimable aux sciences médicales⁽³⁾.

Ces lignées, d'origines humaines et animales, isolées de tumeurs ou immortalisées spontanément ou encore à l'aide d'oncogènes, ont l'avantage d'être facilement cultivables du fait de leur grande résistance, prolifèrent rapidement et peuvent se reproduire à l'infini. Elles se sont révélées très intéressantes pour étudier les mécanismes impliqués dans la cancérisation et afin d'identifier des molécules aux propriétés anticancéreuses lors des phases de criblages.

Conscients de la limite de ces modèles de lignées, dont de nombreux mécanismes cellulaires sont altérés, les biologistes isolent et cultivent des cultures primaires issues de tissus normaux sains. Plus complexes à cultiver, chaque type cellulaire normal nécessite un milieu défini qui lui est spécifique. Leur prolifération est limitée et après un certain nombre de passages, elles entrent en état de sénescence comme l'avaient montré Hayflick et Moorhead en 1961, à l'aide de cultures de fibroblastes⁽⁴⁾.

Ces modèles 2D ont énormément fait progresser le domaine de la biologie cellulaire mais ont également mis en lumière leurs limites et l'intérêt de développer des modèles cellulaires tridimensionnels (3D) plus complexes mimant davantage la physiologie des tissus.

L'avènement des modèles 3D

Les modèles 3D, physiologiquement plus pertinents que les cultures cellulaires en 2D, reproduisent ou tendent à mimer certaines caractéristiques des tissus, incluant leur microenvironnement, la présence de plusieurs types cellulaires, les interactions cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire, ces dernières exerçant une importante influence sur la structure, l'adhésion ou même le destin cellulaire. De plus, ils imitent davantage les forces mécaniques

Ces systèmes n'ont cessé de se perfectionner afin de se rapprocher de la physiologie et de la fonction des tissus humains.

These systems have been continuously improved to further approximate the physiology and function of human tissues.

This heralded the first reconstructed 3D model, since when these systems have been continuously improved to further approximate the physiology and function of human tissues.

2D models are now obsolete

The scientific community has used monolayer or suspension culture models widely to characterise and gain insight into the main cell functions or the effects of various substances. Initially, these models were based on immortalised cell lines, such as the famous HeLa line based on a human cervical carcinoma. This came from a patient, Henrietta Lacks, presenting with cervical cancer, whose cells had been isolated from biopsies taken without her consent. The young woman, who died in 1951 at the age of 31, was awarded a posthumous distinction in 2021 by Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, Director-General of the WHO, for her invaluable contribution to medical science⁽³⁾.

These lines, of human and animal origin, isolated from tumours or immortalised spontaneously or with the help of oncogenes, have the advantage of being easily cultivated due to their high resistance, of proliferating rapidly and of being able to reproduce ad infinitum. They have proved extremely useful in studying the mechanisms involved in carcinogenesis and in identifying molecules with anti-cancer properties during the screening phases.

Aware of the limitations of these lineage models, which alter many cell mechanisms, biologists are isolating and cultivating primary cultures from normal healthy tissues. More complex to culture, each normal cell type requires its own specific medium. Their proliferation is limited; after a certain number of passages, they enter a state of senescence, as demonstrated by Hayflick and Moorhead in 1961, using fibroblast cultures⁽⁴⁾.

While these 2D models have greatly advanced the field of cell biology, they have also highlighted their limitations and the need to develop more complex three-dimensional (3D) cell models that better mimic tissue physiology.

The advent of 3D models

3D models, which are physiologically more relevant than 2D cell cultures, reproduce or tend to mimic certain characteristics of tissues, including their microenvironment, the presence of several cell

auxquelles sont soumises les cellules à l'origine de la mécanotransduction cellulaire, soit leur capacité à transformer l'information sur les propriétés mécaniques de leur microenvironnement en signal biochimique. C'est ainsi que les modèles de peaux ou d'épidermes reconstruits ou bioimprimés, se complexifient avec le nombre de types cellulaires incorporés et de couches érigées. Les épidermes se pigmentent avec l'incorporation des mélanocytes et se voient ensemencés sur des équivalents dermiques afin de mimer les interactions entre fibroblastes dermiques et kératinocytes épidermiques. Certains modèles proposent d'y intégrer la composante immunitaire afin de simuler les réponses inflammatoires, particulièrement utilisés dans l'étude de troubles cutanés, dont le psoriasis ou la dermatite atopique et dans les analyses toxicologiques⁽⁵⁾.

Cependant, malgré la reconstitution de la structure tridimensionnelle, certaines fonctions du tissu ne sont pas complètement, voire pas du tout reproduites. C'est le cas, par exemple, de la fonction vasculaire, indispensable aux échanges de nutriments, d'oxygène et de métabolites.

L'objectif suivant des biologistes était par conséquent de développer des modèles encore plus complexes simulant non seulement la structure des organes, mais reproduisant également leurs fonctions en y incluant, par exemple, les versants vasculaires, nerveux ou les annexes cutanées tels que les unités pilo-sébacées et les glandes sudoripares. Dans ce contexte, on parle d'organoïdes. Véritables « mini-organes », ils sont utilisés pour comprendre la physiologie normale des tissus et les mécanismes pathologiques (cancers, maladies monogéniques, désordres cutanés...). De plus, depuis l'entrée en vigueur en 2013 du règlement (CE) n° 1223/2009 du 30 novembre 2009, le développement de ces nouveaux modèles cutanés *in vitro* s'inscrit dans une tendance mondiale visant à définitivement s'affranchir des tests sur animaux.

Les organoïdes cutanés

Ils sont générés à partir de cellules souches et offrent l'opportunité de reproduire des peaux de plus en plus complexes intégrant les annexes essentielles à plusieurs fonctions cutanées : protection, réparation, thermorégulation ou sensorielle. Différents laboratoires dans le monde, académiques et privés, s'attèlent à mettre au point ces « mini-organes » qui ouvrent la voie à de nombreuses applications (Figure 1). Parmi celles-ci, l'un de leur objectif est d'évaluer la toxicité et l'efficacité de molécules pharmacologiques, d'ingrédients cosmétiques ou de dispositifs médicaux, une nécessité incontournable avant la mise sur le marché de nouveaux produits. De plus, leurs utilisations apportent des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes

Histoire de la recherche sur les modèles

History of model research

Dates clés

Key dates

1885

culture d'embryons de poulet
culture of chicken embryos

1907

première croissance de cellules *in vitro*
first *in vitro* cell growth

1952

établissement de la lignée HeLa
establishment of the HeLa line

1961

découverte de la limite de Hayflick
discovery of the Hayflick limit

1975

culture à grande échelle de NHEK
industrial-scale culture of NHEK

1983

premier modèle 3D d'épiderme reconstruit
first 3D model of reconstructed epidermis

1999

premier organe bioimprimé
first bioprinted organ

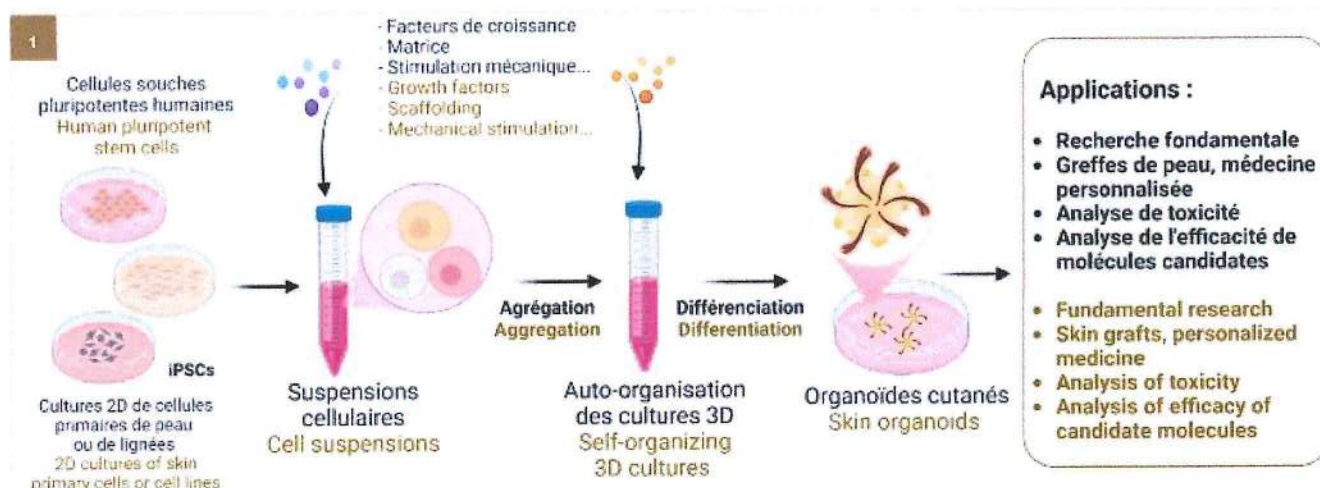
types, and cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, the latter having a major influence on structure, adhesion and even cell fate. In addition, they more closely mimic the mechanical forces acting on cells and that drive cell mechanotransduction, i.e., their ability to convert information about the mechanical properties of their microenvironment into a biochemical signal. Models of reconstructed or bioprinted skin or epidermis thus gain in complexity with the number of cell types incorporated and layers erected. The epidermis becomes pigmented with the incorporation of melanocytes and is seeded onto dermal equivalents in order to mimic the interactions between dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. Some models propose incorporating the immune component to simulate inflammatory responses, used in particular in studies of skin disorders such as psoriasis or atopic dermatitis and in toxicological analyses⁽⁵⁾.

However, despite the reconstitution of the three-dimensional structure, certain tissue functions are reproduced only incompletely, if at all. This is the case, for example, of the vascular function, essential for the exchange of nutrients, oxygen and metabolites.

Biologists, therefore, next sought to develop even more complex models that not only simulated organ structure, but also reproduced their functions by including, for example, the vascular and nervous aspects or skin appendages such as the pilosebaceous units and the sweat glands. In this case, we refer to organoids. These "mini-organ" models are used to further insight into normal tissue physiology and pathological mechanisms (cancers, monogenic diseases, skin disorders, etc.). Furthermore, since Regulation (EC) No. 1223/2009 of 30th November 2009 came into force in 2013, the development of these new *in vitro* skin models is part of a worldwide trend to definitively do away with animal testing.

Skin organoids

These are generated from stem cells and provide a way of reproducing increasingly complex skins that incorporate the appendages essential to several skin functions, i.e., protection, repair, thermoregulation and sensory functions. Various laboratories around the world, both academic and private, are working hard to develop these "mini-organisms", which pave the way to numerous applications (Figure 1). One of their aims is to assess the toxicity and efficacy of pharmacological molecules, cosmetic ingredients or medical devices, an essential requirement prior to the marketing of new products. Their use is also driving major advances in our understanding of the fundamental mechanisms of skin biology and the disorders that can affect it. As part of the Biomicrotechnology and Functional Genomics (Biomics) team at CEA Grenoble, Prof. Walid Rachidi



Génération d'organoides cutanés et leurs applications.

Generations of skin organoids and their applications.

iPSCs : Cellules souches pluripotentes induites. iPSCs: Induced pluripotent stem cells.

Figure créée avec / Figure created using Biorender.com

fondamentaux de la biologie de la peau et des désordres qui peuvent l'affecter.

Au sein de l'équipe Biomicrotechnologie et Génomique Fonctionnelle (Biomics) au CEA de Grenoble, le Pr Walid Rachidi, s'intéresse et développe avec son équipe de nouveaux modèles d'organoides cutanés. « En plus de les utiliser pour des analyses toxicologiques, le développement de médicaments, ou encore la compréhension du fonctionnement physiologique de la peau, il est possible de produire des organoïdes pathologiques, reconstruits à partir de cellules de patients atteints de maladies » décrit le Pr Rachidi. « Dans mon cas, je m'intéresse à la maladie des enfants de la lune ou xeroderma pigmentosum, une maladie génétique rare caractérisée par un risque dix-mille fois plus élevé de développer un cancer de la peau, dû à une hypersensibilité aux rayonnements UV. Nous reconstruisons des organoïdes à partir des cellules des patients afin de comprendre les mécanismes responsables de leur réactivation tumorale mais également afin de réaliser des criblages médicamenteux ». D'autres approches consistent en la reconstruction d'organoides diabétiques afin d'élucider les processus à l'origine des troubles de la cicatrisation observés chez les patients. Par ailleurs, la technologie des ciseaux moléculaires CRISPR-Cas9, couronnée par le prix Nobel de chimie en 2020, permet d'induire des modifications génétiques au niveau cellulaire et offre la possibilité de reconstruire de nombreux modèles d'organoides pathologiques.

La technologie des organoides offrent de véritables espoirs dans les domaines de la thérapie cellulaire et la médecine régénérative, comme le démontrent

and his team are developing new models of skin organoids. "As well as using them for toxicological analyses, drug development and for understanding the physiological functioning of the skin, we can also produce pathological organoids, reconstructed from cells of patients suffering from disease," explains Prof. Rachidi. "In my case, I'm interested in moon children's disease or xeroderma pigmentosum, a rare genetic disease characterised by a ten-thousand-fold increase in the risk of developing skin cancer, due to hypersensitivity to UV radiation. We are reconstructing organoids from patients' cells in order to understand the mechanisms responsible for their tumour transformation, and also to carry out drug screening." Other approaches involve reconstructing diabetic organoids to elucidate the processes behind wound healing disorders observed in patients. In addition, CRISPR-Cas9 molecular scissors technology, awarded the Nobel Prize for Chemistry in 2020, makes it possible both to induce genetic modifications at cell level and to reconstruct numerous models of pathological organoids.

Organoid technology offers real hope in the fields of cell therapy and regenerative medicine, as demonstrated by the work of Professor Karl Koehler's lab in the United States. Published in the renowned journal Nature, they have succeeded in creating skin organoids that include hair follicles⁽⁶⁾. These advances are proving invaluable in the treatment of burn victims and for reconstructive surgery. Lastly, the manufacture of organoids from patient cells also opens up interesting prospects for personalised medicine.

les travaux issus du laboratoire du Pr Karl Koehler aux États-Unis. Ces derniers, publiés dans la célèbre revue *Nature*, sont parvenus à créer des organoïdes cutanés incluant des follicules pileux⁽⁶⁾. Ces avancées se révèlent précieuses dans le traitement des grands brûlés et pour la chirurgie reconstructive. Enfin, la fabrication d'organoïdes à partir de cellules de patients ouvre également des perspectives intéressantes pour la médecine personnalisée.

Les organes ou organoïdes sur puce

Très prometteurs pour faire progresser la recherche fondamentale, appliquée et translationnelle, les organes-sur-puce (OoC, *Organ-on-a-Chip*), ont été positionnés en 2016 par le Forum Économie Mondial comme l'une des dix plus importantes technologies émergentes⁽⁷⁾. Apparus au cours de la dernière décennie, les OoC connaissent un engouement particulier avec une augmentation de leur complexité. Leur objectif est de mimer la connexion entre plusieurs organes à l'aide de systèmes comme la microfluidique. Cette technologie assure avec haute précision la circulation dynamique des fluides et préserve les gradients spatio-temporels et échanges entre les organes. De plus, les OoC tentent de prendre en compte et de reproduire au plus proche la dynamique du microenvironnement spécifique à chaque organe. « *Les OoC sont très utiles pour évaluer les effets toxicologiques de médicaments ou de polluants et prédire leurs effets sur la santé humaine. Avec l'intégration d'un compartiment hépatique, il est possible de voir des molécules initialement inoffensives devenir toxiques pour d'autres organes, suite à leur métabolisation par les cellules du foie* » confie le Pr Rachidi.

Une des contraintes majeures pour une validation et adoption plus large des OoC dans le secteur industriel réside dans le choix des matériaux utilisés pour les puces microfluidiques (Figure 2). Ils doivent être biocompatibles, sans effet toxique ou relargage de substances, et être transparents et peu ou pas auto-fluorescents afin de permettre les observations des tissus en microscopie. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est l'un des matériaux les plus utilisés pour les systèmes d'OoC. Malgré ses multiples caractéristiques bénéfiques du point de vue de l'ingénierie, les effets du PDMS sur les cellules cultivées dans ces dispositifs suscite des interrogations et de nouvelles alternatives sont en permanence proposées, dont le COC (*cyclic olefin copolymer*)⁽⁸⁾.

La technologie des OoC ne cesse d'évoluer et tend vers l'intégration de plus en plus d'organes. Prochaine étape, le corps humain sur puce ou *body-on-chip* !

Accélérer l'innovation avec les LabCom

Les lancements de laboratoires communs de recherche (LabCom), soutenus par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et le ministère de la Recherche, visent à renforcer la recherche

Histoire de la recherche sur les modèles

History of model research

Dates clés

Key dates

2006

génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)
generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs)

2009

organoïdes intestinaux humains à partir de cellules souches adultes
human intestinal organoids from adult stem cells

2013

organoïdes de cerveau, de pancréas, de foie, de rein...
organoids from the brain, pancreas, liver, kidney, etc.

2016

multiorgan-on-a-chip
multiorgan-on-a-chip

2020

organoïdes de peau avec des follicules pileux
skin organoids with hair follicles

2023

vers la modélisation de l'axe cerveau-intestin
towards modelling the brain-gut axis

2023

modèle peau-foie-thyroïde
skin-liver-thyroid model

Organs or organoids on a chip

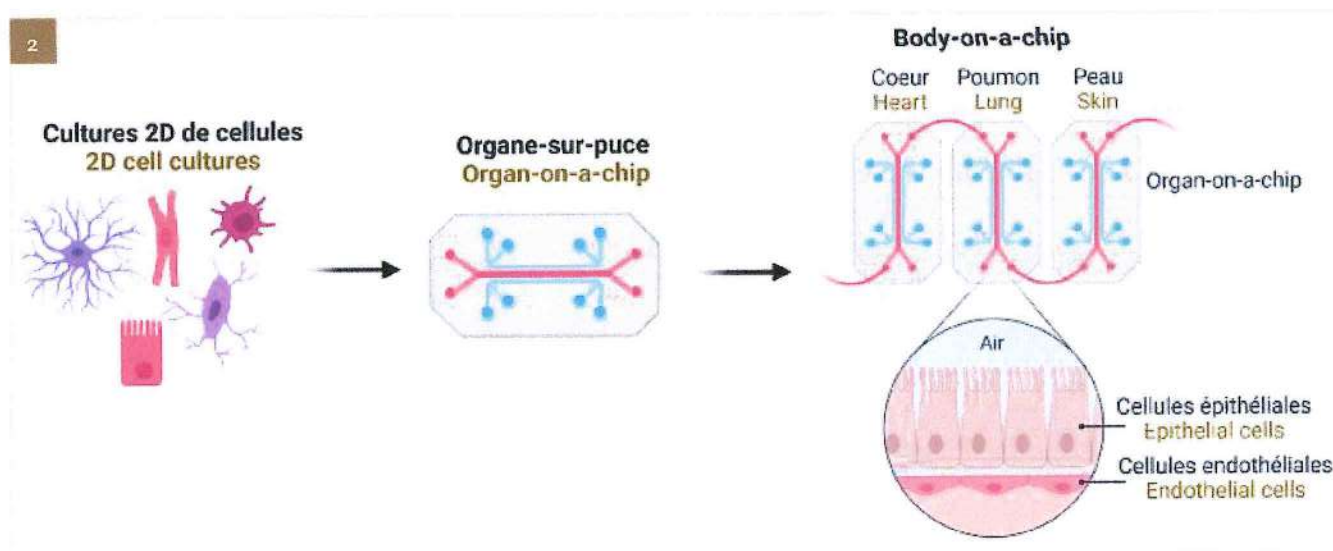
Organ-on-a-Chip (OoC) devices hold great promise for advancing fundamental, applied and translational research, and in 2016 were ranked by the World Economic Forum among the ten most important emerging technologies⁽⁷⁾. OoCs have emerged over the last decade and are gaining in popularity as their complexity increases. Their aim is to mimic the link between multiple organs using systems such as microfluidics. This technology provides high-precision dynamic fluid circulation while preserving spatio-temporal gradients and inter-organ exchanges. OoCs also attempt to take into account and reproduce as closely as possible the dynamics of the microenvironment specific to each organ. "OoCs are valuable in assessing the toxicological effects of drugs or pollutants and predicting their effects on human health. With the inclusion of a liver compartment, it is possible to watch initially harmless molecules becoming toxic to other organs, following their metabolism by liver cells," reveals Prof. Rachidi.

One of the major limitations on the wider validation and adoption of OoCs in the industrial sector lies in the choice of materials used for the microfluidic chips (Figure 2). These must be biocompatible, with no toxic effects or substance release, and be transparent with little or no auto-fluorescence to enable tissues to be examined under the microscope. Polydimethylsiloxane (PDMS) is one of the most widely used materials for OoC systems. Despite its many engineering-related advantages, the effects of PDMS on the cells cultured in these devices are still being questioned, and new alternatives are constantly being proposed, including COC (cyclic olefin copolymer)⁽⁸⁾.

OoC technology continues to evolve and is moving towards the integration of an ever-increasing number of organs. The next step is the human body on a chip, or body-on-chip!

Accelerating innovation with LabCom

The launch of joint research laboratories (LabCom), supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the French Ministry of Research, aims to strengthen research partnerships between academic and private laboratories. For the past two years, the Icare Group in Saint-Beauzire, near Clermont-Ferrand, has focused on developing innovative 3D models combining structural and functional components of human skin. The resulting LabCom, baptized "Increase", brings together the Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry Laboratory (I2CT), headed by Dr Vincent Flacher of the CNRS Institute of Molecular and Cell Biology (IBMC) in Strasbourg, and Prof. Edith Filaire, Innovation Research Director at the Icare Group. "The potential use of tissue substitutes, to supplement and/or replace the animal and in vitro



Puces microfluidiques composées de compartiments reliés entre eux par des micro-canaux.
Microfluidic chips made up of compartments interlinked by microchannels.

Le « corps-sur-puce » ou « *body-on-chip* » microfluidique permet d'étudier les interactions complexes entre les systèmes physiologiques, dans des contextes normaux, pathologiques ou pour évaluer les effets toxicologique et l'efficacité de molécules d'intérêt.

Microfluidic "body-on-chip" technology can be used to study the complex interactions between physiological systems, in normal or pathological situations, or to evaluate the toxicological effects and efficacy of molecules of interest.

Figure créée avec / Figure created using Biorender.com

partenariale entre laboratoires académiques et privés. C'est à ce titre que le Groupe Icare situé à Saint-Beauzire, près de Clermont-Ferrand, s'est engagé, depuis deux ans, au développement de nouveaux modèles 3D innovants combinant éléments structuraux et fonctionnels de peau humaine. Le LabCom obtenu et dénommé « Increase » associe le Laboratoire d'Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique (I2CT), porté par le Dr Vincent Flacher de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) du CNRS de Strasbourg et le Pr Edith Filaire, directrice Recherche Innovation du Groupe Icare. « L'utilisation potentielle de substituts tissulaires, en complément et/ou remplacement des modèles animaux et in vitro 2D ou 3D (modèles d'explants) couramment utilisés, est très intéressante et novatrice pour l'évaluation des candidats médicaments, dans les domaines de la bioproduction de molécules (thérapeutiques, substances naturelles et métabolites, alicaments, etc.), de virus ou de tissus, dans la cosmétique, la dermo-cosmétique, l'agro-alimentaire et la chimie verte, mais également dans le domaine des dispositifs médicaux » souligne le Pr Filaire. La réponse à ces défis repose sur la capacité des chercheurs à développer des systèmes/modèles permettant d'atteindre une prédictibilité accrue du devenir des nouvelles molécules qui atteindront le marché dans un avenir aussi proche que possible. ●

2D or 3D models (explant models) currently in use, is particularly useful and innovative as regards the evaluation of drug candidates, in the fields of bioproduction of molecules (therapeutics, natural substances and metabolites, nutraceuticals, etc.), of viruses or tissues, in cosmetics, dermo-cosmetics, agri-food and green chemistry, and also in the field of medical devices," she notes. The answer to these challenges lies in researchers' ability to develop systems/models that will offer greater predictability concerning the fate of new molecules that will reach the market in the very near future. ●

Références References

- ⁽¹⁾ Rheinwald JG, Green H. Cell. 1975 Nov;6(3):331-43.
- ⁽²⁾ Pruniéras, M. Régnier, D. J. Invest. Dermatol., 81 (1983), pp. 28s-33s.
- ⁽³⁾ <https://www.who.int/news/item/13-10-2021-who-director-general-bestows-posthumous-award-on-the-late-henrietta-lacks>.
- ⁽⁴⁾ Hayflick L, Moorhead P.S. Exp. Cell Res. 1961;3:585-621.
- ⁽⁵⁾ Moon S, et al. Yonsei Med J. 2021 Nov;62(11):969-980.
- ⁽⁶⁾ Lee J, et al. Nature. 2020 Jun;582(7812):399-404.
- ⁽⁷⁾ World Economic Forum. Top 10 emerging technologies of 2016. <https://www.weforum.org/reports/top-10-emerging-technologies-of-2016> (2016).
- ⁽⁸⁾ Sarah-Sophia D. et al. Organs-on-a-Chip, Volume 2, 2020, 100004, ISSN 2666-1020.