

LES ORGANOÏDES : UN MODÈLE DE CHOIX POUR REPRODUIRE LES CARACTÉRISTIQUES HISTOLOGIQUES DU TISSU D'ORIGINE

TRAVERSARI Eddy³, BONNET Julien³, SAUBIN Manon^{1,2}, TRIAIRE Simon^{1,2}, POIZAT Flora⁴, RATONE Jean-Philippe⁵, DAHEL Yanis⁵, CAILLOL Fabrice⁵, PESENTI Christian⁵, COMITI Olivier⁵, HOIBIAN Solène⁵, GIOVANNINI Marc⁵, DE CHAISEMARTIN Cecile³, TURRINI Olivier³, GINESTIER Christophe^{1,2}, CHARAFE-JAUFFRET Emmanuelle^{1,2}, GUASCH Géraldine^{1,2}, CHEVRIER Véronique^{1,2*}

*veronique.chevrier@inserm.fr

1. Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, Platform 3D-Hub-O, 27 BVD Lei Roure, 13273, Marseille Cedex09, France
2. Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, équipe cellules souches et cancer, 27 BVD Lei Roure, 13273, Marseille Cedex09, France
3. Department of surgical oncology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France
4. Department of Biopathology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France
5. Department of Gastro-enterology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France

ORGANOIDS: RELEVANT MODEL TO REPRODUCE THE HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TISSUE

ABSTRACT

Organoids are three-dimensional (3D) multicellular structures that reproduce *in vitro* the micro-anatomy and at least one organ function. This organ model is obtained from one or more stem cells which in our studies are adult stem cells. These organoids are 3D structures that develop when stem cells are in appropriate environmental conditions that will allow them to organize and differentiate with morphological properties similar to their tissues or organs of origin.

Organoids derived from patient carcinomas (also known as tumoroids) are phenotypically and genotypically similar to their cognate tumor from which they are derived. They reproduce the cell tumor heterogeneity found in tumors.

In this paper, organoids are produced using two different techniques such as air-liquid interface culture or droplet culture and then analyzed by histology or immunofluorescence techniques. We have shown that organoids developed from various parts of murine stomach transition zone or human mammary gland, are histologically similar to their tissues of origin and retain the molecular characteristics.

Tumoroids derived from biopsies of patients with rectum cancer reproduce the stage of differentiation of the original tumor ranging from high-grade dysplasia to low-differentiated adenocarcinoma.

Thus, organoids derived from healthy or diseased tissues are new tools to model diseases from patient samples or mouse models. Organoids will be a key player in the development of pre-clinical assay with the possibility to test new therapies before proposing clinical trials.

KEY WORDS

Organoids, tumoroids, histology, microscopy

RESUME

Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles (3D) qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie et au moins une fonction d'organe. Ce modèle d'organe est obtenu à partir d'une ou plusieurs cellules souches qui dans nos études sont des cellules souches adultes. Ces organoïdes se développent quand les cellules souches sont dans des conditions environnementales appropriées qui vont leur permettre de s'organiser et de se différencier avec une morphologie semblable aux tissus ou aux organes dont elles proviennent. Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients (aussi appelés tumoroïdes) sont similaires phénotypiquement et génotypiquement aux épithéliums tumoraux dont ils sont issus. Ils reproduisent l'hétérogénéité tumorale retrouvée au sein des tumeurs.

Dans cet article, des organoïdes sont produits à l'aide de deux techniques différentes que sont la culture à l'interface Air-Liquide et la technique de la goutte immergée, puis analysés par des techniques d'histologie ou d'immunofluorescence. Nous montrons que les organoïdes développés à partir de diverses parties de la zone transitionnelle de l'estomac de souris ou de glande mammaire humaine ressemblent histologiquement à leurs tissus d'origine.

Des tumoroïdes dérivés à partir de biopsies de patients atteints de cancer du rectum vont reproduire le stade de différenciation de la tumeur d'origine allant de la dysplasie de haut grade à l'adénocarcinome peu différencié.

Ainsi les organoïdes dérivés de tissus sains ou pathologiques sont de nouveaux modèles d'étude qui permettent de modéliser des maladies pour les étudier dans un environnement humain ou murin tridimensionnel et fonctionnel, et ce, avec des cellules spécifiques d'un patient ou avec des cellules de modèles murins. Les organoïdes seront un atout majeur dans le développement d'essai préclinique permettant de tester de nouvelles thérapies sur des organoïdes pathologiques humains avant de proposer des essais cliniques chez l'homme.

MOTS CLÉS

Organoïdes, tumoroïdes, histologie, microscopie

INTRODUCTION

Ces dernières années ont permis de voir l'émergence de nouveaux modèles de culture en 3 dimensions : les organoïdes. Ces organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie d'un organe. L'organoïde doit mimer les fonctions de base des organes correspondants. Ces mini-organes sont obtenus à partir d'une ou plusieurs cellules souches qui proviennent soit de cellules souches embryonnaires, soit de cellules souches pluripotentes induites ou de cellules souches adultes. Ces cellules vont s'auto-organiser en 3 dimensions grâce à leurs propriétés d'adhésion, puis proliférer et se différencier lorsqu'elles sont dans des conditions environnementales appropriées [1]. Les capacités d'auto-renouvellement des cellules souches assurent la pérennité de la culture.

Les organoïdes développés à partir de cellules souches adultes sont spécifiques du tissu dont ils sont issus. Les caractéristiques physiques et biochimiques de l'environnement de culture sont importantes pour le développement des organoïdes car il tend à reproduire la niche où les cellules souches résident normalement *in vivo*. Les organoïdes sont principalement produits à partir de deux techniques : la technique à l'interface Air-Liquide (ALI) sur filtre ou la technique de la goutte immergée [2]. Dans la technique ALI, le tissu est émincé puis enrobé dans du collagène avant d'être déposé sur un filtre alors que dans la technique en goutte immergée, les cellules souches sont obtenues après dissociation enzymatique du tissu, elles peuvent être isolées par la technique du FACS, puis enrobées dans des matrices 3D [3]. Ainsi dans la première technique, les organoïdes sont composés non seulement de cellules épithéliales mais aussi de cellules du microenvironnement. Ce système permet la préservation du microenvironnement pour au moins 1 mois. Dans la technique de la goutte immergée, seules les cellules souches vont permettre le développement d'organoïdes alors que les cellules du microenvironnement disparaissent au fur et à mesure des passages [4]. Ces cellules souches doivent être cultivées dans un milieu de culture complexe enrichi en facteurs de croissance spécifiques pour chaque organe. Ce milieu a pour but de reproduire les facteurs de la niche du tissu initial.

Nous avons précédemment développé des organoïdes à partir de diverses parties de la zone ano-rectale (épithélium glandulaire du rectum, épithéliums stratifiés des zones de transition épithéliales (ZT) ainsi que du canal anal) [5]. Les zones de transition représentent une transition abrupte entre deux types d'épithélium. Ces zones de transition sont déterminantes pour l'étude de l'initiation des cancers car

ces régions développent fréquemment des cancers de très mauvais pronostic à tendance métastatique. La transition d'un épithélium à l'autre peut être facilement détectée histologiquement et moléculairement car les épithéliums expriment des protéines spécifiques telles que la cytokératine 17 (cellules de la ZT), la cytokératine 14 pour l'épithélium stratifié du canal anal et la cytokératine 8 pour l'épithélium rectal glandulaire. Nous avons précédemment montré que ces organoïdes ressemblaient à leurs tissus d'origine [1].

Les organoïdes dérivés de tumeurs de patients (aussi appelés tumoroïdes) sont similaires phénotypiquement et génotypiquement aux épithéliums tumoraux dont ils sont issus. Ils reproduisent l'hétérogénéité tumorale retrouvée au sein des tumeurs [6].

Dans cette étude, nous montrons que des organoïdes dérivés de différents tissus sains ou tumoraux tels que la glande mammaire, la zone de transition œsogastrique ainsi que le rectum, miment leur tissu d'origine.

MATERIELS ET METHODES

Echantillons humains

Les tissus de rectum sont obtenus de patients subissant des biopsies sous endoscopie lors d'examen diagnostique à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC, Marseille, France). Les patients sont informés et donnent leur consentement pour participer à une étude de recherche qui a été préalablement soumise à l'autorisation du Comité de Protection de Personnes Ouest II et diffusé auprès de l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM) pour information (protocole RBC#2015-021TZ).

Des échantillons de mammoplastie de trois femmes âgées de 20 à 43 ans proviennent de l'Hôpital de la Conception selon les protocoles IRB approuvés de l'Institut Paoli-Calmettes (Marseille, France) pour la recherche sur des sujets humains [8].

Modèle murin

Les souris sont hébergées dans une animalerie de statut SPF. Toutes les expériences ont été approuvées par la réglementation européenne et nationale (Protocoles N° 4572, 8287 et 2244).

Culture organoïde à l'interface Air-Liquide

Les filtres (PICM03050, Millicell-CM, Millipore) sont insérés dans des boîtes de Pétri

(35X10mm, 353001, Falcon) [7]. Des matrices de gel de collagène sont préparées et déposées sur le filtre en mélangeant la matrice de collagène (Cellmatrix de type I-A, W1W637-00653, Sobioda) avec un milieu de culture stérile concentré 10 X (DMEM / F-12, 12500096, Life Technologies) et un tampon de reconstitution stérile (2,2 g de NaHCO₃, 478537, Carlo-Erba dans 100 mL de NaOH 0,05 N, 1310-73-2, Carlo-Erba et HEPES 200 mM, 15630056, Life Technologies) à un ratio de 8:1:1. Ce collagène reconstitué avec la solution est conservé sur de la glace (4°C) pour empêcher la solidification du gel jusqu'à ce qu'il soit déposé sur le filtre. Un mL de solution de collagène reconstitué est ajouté au filtre dans des conditions stériles, servant de couche inférieure sans tissu. Cette couche inférieure solidifie pendant 30 min à 37°C. Le tissu provenant de biopsies humaines est émincé, mélangé à 1 mL de solution de collagène reconstitué puis déposé sur le filtre et l'ensemble est incubé 30 min à 37°C puis le milieu de culture décrit précédemment [5] est ajouté autour du filtre préalablement disposé dans la boîte de Pétri.

Culture organoïde en goutte immergée à partir de biopsies

Le tissu provenant de biopsies humaines est émincé, lavé 2 fois en PBS 1X (14190094, Life Technologies) puis dissocié 20 min à 37°C sous agitation dans le tampon de digestion (1mL DMEM, 41965062, Life Technologies+ 2,5% sérum de veau fœtal (SVF), F7524 Life Technologies + 150 µL Collagénase 20%, C2674, Sigma + 1 mL Dispase, 17105-041 ThermoFischer). Un volume de 12,5 µL de DNase (89836, ThermoFischer) est ajouté pendant 10 min à 37°C sous agitation. L'échantillon est resuspendu dans 50 mL de PBS froid, centrifugé 5 min à 4°C à 200g. Les culots sont repris dans 20 mL de PBS puis passés sur filtre de 70 µm (352350, Falcon). Sont ajoutés au filtrat 200 µL de SVF. Les tissus ou amas de cellules restés sur le filtre sont dissociés avec 2 mL de TrypLE Express (12605010, Life Technologies) et incubés à 37°C pendant 5 min. L'action de l'enzyme est arrêtée par ajout de 9 mL de milieu *Complete AdDF Medium* [Advanced DMEM/ F12 (12634010, Life Technologies) Glutamax 1X (35050061, Life Technologies) HEPES 10 mM (15630080, Life Technologies) Pénicilline-streptomycine 100 U/ml (15140122, Life Technologies)] + 2,5% SVF (A5209401, Life Technologies). L'ensemble est ensuite passé sur un filtre de 40 µm puis centrifugé à 200g pendant 5 min à 4°C, le culot étant resuspendu dans 1 mL *Complete AdDF Medium* et les cellules sont comptées. Pour la réa-lisation d'organoïdes tumoraux et sains, le culot cellulaire est re-suspendu dans du Matrigel (356231, Corning) afin d'obtenir un ratio de 1000 à 50000 cellules par goutte de 25 µL de Matrigel. Ces gouttes sont placées au centre des puits d'une plaque de culture de 48 puits préalablement chauffée à 37°C. Après une période de solidification du Matrigel pendant 10 min

dans un incubateur à 37°C 5% CO₂, la goutte est recouverte par 300 µL de milieu de culture supplémenté par 10 µM de Y-27632 (durant les 5 premiers jours). Les milieux de culture pour les organoïdes de glande mammaire [8] et les organoïdes de rectum [5] ont été antérieurement décrits.

Histologie

Les organoïdes sont prélevés puis fixés 1 h à 4°C en PBS (14190094, Life Technologies) 4% PFA (28908, Life Technologies). Après 2 lavages en PBS, ils sont inclus en gélatine-sucrose (DPBS 1 X, Gélatine 7,5% (G7765-1L, Sigma), Sucrose 15% (S7903-1KG, Sigma)) et coupés au cryostat (Cryostar NX70, Leica).

Les organoïdes peuvent aussi être inclus en PBS 2% Agarose (R0801, Thermo Scientific) 20 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite déposés dans une cassette, incubés 24h en formol (252549, Sigma), déshydratés et imprégnés avec le processeur de tissu (ASP300S, Leica) puis inclus en paraffine (EG1150H, Leica).

La plateforme ICEP (Ipc Crcm Experimental Pathology) réalise les inclusions en paraffine, les coupes au microtome Leica de 4 µm ainsi que les colorations HES à partir des échantillons inclus en paraffine ou en gélatine-sucrose. La coloration HES est composée d'hématoxyline colorant les noyaux en violet, d'éosine colorant le cytoplasme en rose et de Safran colorant le collagène en jaune.

Immunofluorescence

Après un déparaffinage suivi d'un démasquage antigénique à pH6 pour les organoïdes inclus en paraffine, ou décongélation pour les organoïdes inclus en gélatine-sucrose, les coupes sont lavées 3 fois dans du PBS 1X et perméabilisées dans du PBS 1X, 0,1% Triton X-100 (9036-19-5, Merck) pendant 10 min. Une solution de saturation des sites non spécifiques est alors appliquée pendant 30 min à température ambiante (Gélatine Block : 40% Gélatine (G7765, Merck) 1% BSA (04-110-812-F, Euromedex) 0,1% Triton X-100, 1,5% Sérum normal de chèvre (005-000-121, Jackson Immuno Research) et 1,5% Sérum normal d'âne (017-000-121, Jackson Immuno Research) afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps. Les anticorps primaires (**Tableau I**) dilués dans le tampon Gélatine Block sont déposés sur les coupes et incubés la nuit à 4°C. Les coupes sont lavées 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS 0,1% Triton X-100 avant ajout des anticorps secondaires (**Tableau II**) et du DAPI (D9542, Merck) dilués dans le tampon Gélatine Block pendant 30 minutes à température ambiante. Trois nouveaux lavages de 5 minutes dans du PBS 0,1% Triton X-100 sont alors réalisés avant le montage des lames avec du Prolong

Antifade (P36934, Life Technologies). Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Les images fluorescentes sont acquises à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 880. Toutes les images sont analysées à l'aide du logiciel ZEN.

| Anticorps primaire | Référence | Hôte | Réactivité | Fournisseur | Dilution |
|--|-------------|--------|-------------------|----------------|----------|
| Anti - alpha Smooth Muscle Actin aSMA | MA5-11547 | Souris | Humain | ThermoFisher | 1/200e |
| Anti - CD3 | 130-113-138 | Humain | Humain | Miltenyi | 1/200e |
| Anti - CD44v6 | BBA13 | Souris | Humain | R&D | 1/50e |
| Anti - Cytokératine 8 (CK8) | TROMA-I | Rat | Humain/ Souris | DHSB | 1/200e |
| Anti - Cytokératine 14 (CK14) | MAB3232 | Souris | Humain | Millipore | 1/200e |
| Anti - Cytokératine 17 (CK17) | Ab-53707 | Lapin | Humain/ Souris | Abcam | 1/20000e |
| Anti - OLFM4 | D1E4M | Lapin | Humain | Cell Signaling | 1/100e |

Tableau I : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

| Anticorps secondaires | Couplé à | Référence | Fournisseur | Dilution |
|-----------------------|-----------|-------------|-------------------------|----------|
| Anti - lapin | Alexa 488 | 711-546-152 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - souris | Alexa 488 | 715-546-151 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - humain | Alexa 488 | 709-546-149 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - rat | Cyanine 3 | 712-166-153 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - souris | Cyanine 3 | 715-166-151 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - lapin | Alexa 647 | 711-606-152 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |
| Anti - rat | Alexa 647 | 712-606-153 | Jackson Immuno Research | 1/1000e |

Tableau II : Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

RESULTATS

Différentes techniques de culture en 3 dimensions pour produire des organoïdes ont été développées ces dernières années. Les deux principales que nous utilisons sont d'une part la technique de la goutte immergée et d'autre part la technique à l'interface Air-Liquide sur filtre. Ces cultures reflètent l'identité de l'organe correspondant (**Figure 1A**). La technique en goutte où seules les cellules épithéliales sont présentes (**Figure 1B**), possède l'avantage d'une culture sur le long terme. Les organoïdes peuvent de plus être cryo-préservés et manipulés génétiquement. L'intérêt de la technique à l'interface Air-Liquide sur filtre est que ce modèle d'organoïde contient non seulement les cellules épithéliales mais aussi des cellules du microenvironnement (comme des fibroblastes, des cellules immunes) reflétant la structure native du tissu d'origine (**Figure 1C**).

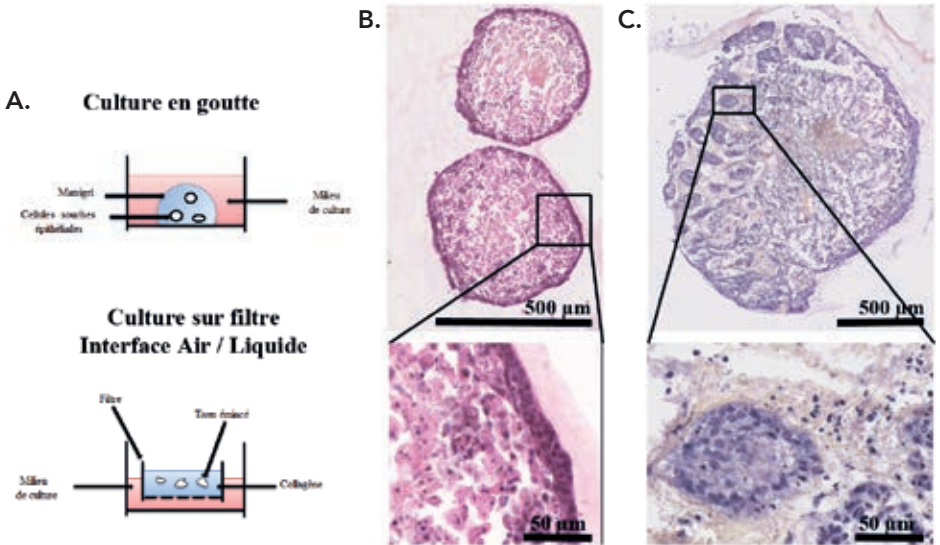
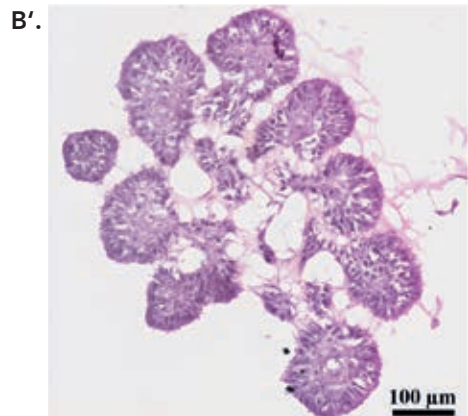
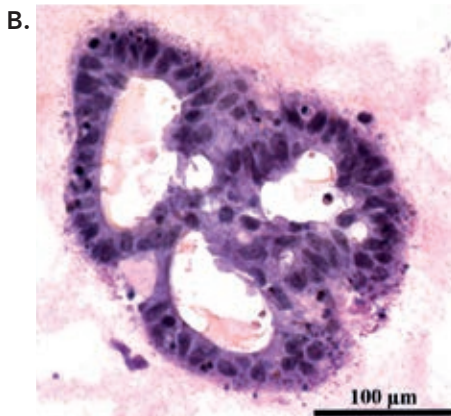
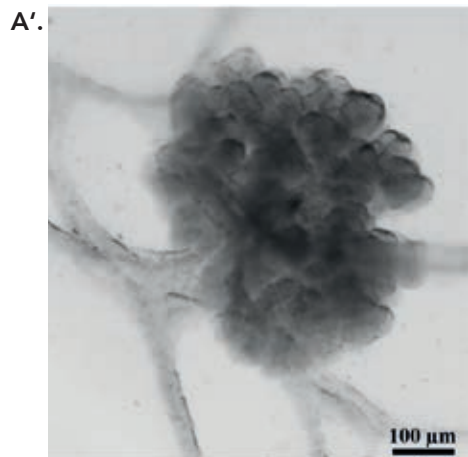
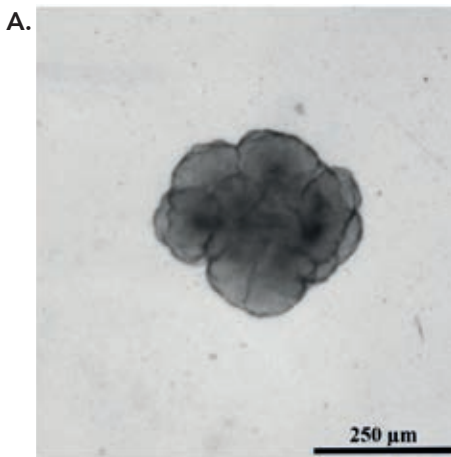


Figure 1 : A. Représentation schématique des 2 principales techniques de culture d'organoïdes : soit la technique de la goutte immergée qui contient uniquement les cellules épithéliales enrobées dans du Matrigel, soit la culture à l'interface Air-Liquide (ALI) qui est une technique plus organotypique contenant non seulement les cellules épithéliales mais aussi les cellules du microenvironnement (stroma et cellules immunitaires). L'analyse des organoïdes de zones de transition anorectales de souris [4] après coloration HES (Hémaroxyline-Eosine-Safran) montre la présence unique de cellules épithéliales dans la technique de la goutte immergée (B) alors que la technique du filtre permet de préserver le microenvironnement des cellules avec la présence du stroma et des cellules immunitaires (C).

Dans le laboratoire, nous avons expérimenté la culture d'organoïdes de différentes origines tissulaires. Les organoïdes issus de cellules souches isolées à partir de glande mammaire provenant d'une patiente saine montrent une structure lobulaire très branchée avec des canaux intra-lobulaires (**Figures 2A et 2B**). L'analyse en immunofluorescence révèle la présence d'acinis composés de cellules épithéliales glandulaires (cytokératine 8) entourées de cellules myoépithéliales (cytokératine 14 et Smooth Muscle Actin) (**Figure 2C**). Bien qu'ayant des structures moins organisées que le tissu initial (**Figure 2D**), les organoïdes reproduisent les caractéristiques moléculaires du tissu d'origine.



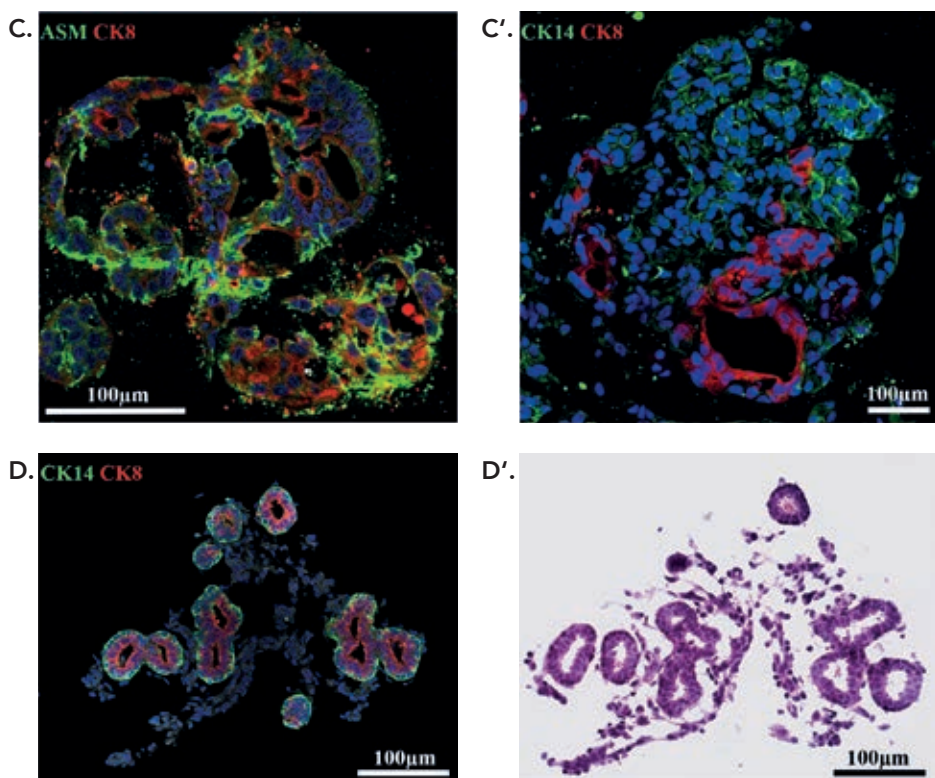
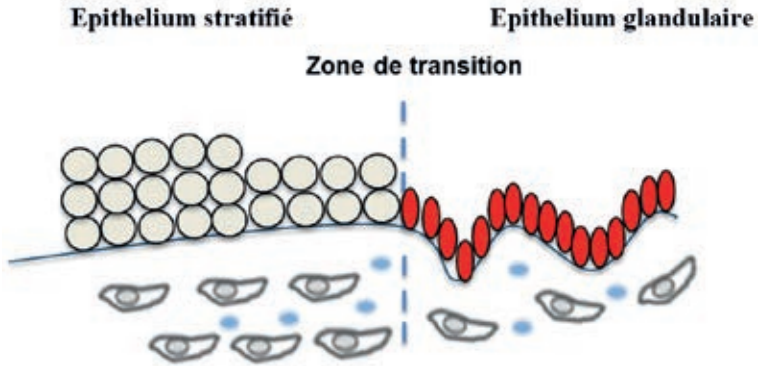


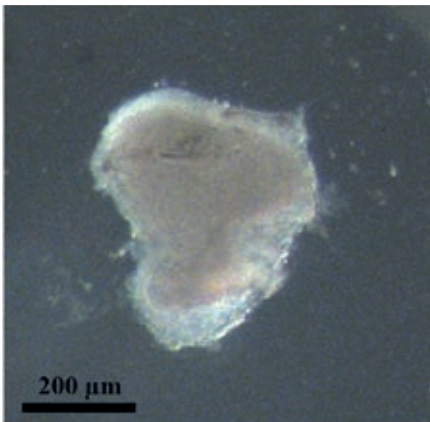
Figure 2 : Organoïdes de seins humains (A, B, C, C') ou de la lignée cellulaire épithéliale mammaire HME (A', B') par comparaison avec le tissu original (D et D'). A et A' sont des images prises en champ clair. Histologie représentant des coupes d'organoïdes (B, B') ou de tissu (D') après colorations H.E.S (Hématoxyline-Eosine-Safran). Les organoïdes en C et C' expriment la cytokératine 8 (CK8) ainsi que l'actine du muscle lisse (aSMA) ou la cytokératine 14 (CK14) révélant la présence des cellules matures luminales (CK8) ainsi que les cellules myoépithéliales (CK14, ASM). Ces cellules sont présentes dans le tissu original en D.

La transition d'un épithélium stratifié à un épithélium glandulaire peut être facilement détectée histologiquement. Les organoïdes de la zone de transition œsogastrique montrent d'une part un épithélium malpighien stratifié et d'autre part un épithélium en simple couche de cellules mucipares (**Figures 3A-3C et 3E**). Ces organoïdes conservent aussi les caractéristiques moléculaires car les épithéliums expriment des protéines spécifiques telles que la cytokératine 17 pour les cellules de la zone de transition et la cytokératine 8 pour l'épithélium glandulaire (**Figure 3D**). Ces organoïdes possèdent une zone de transition bien organisée.

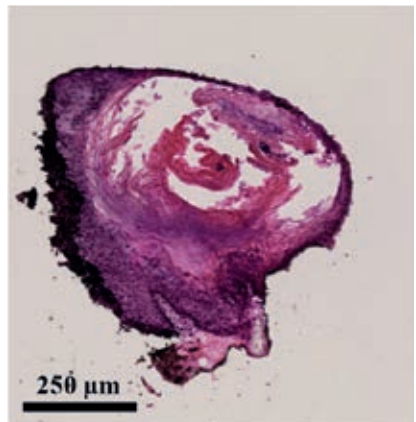
A.



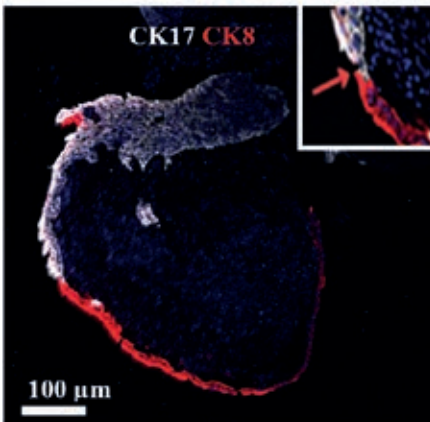
B.



C.



D.



E.

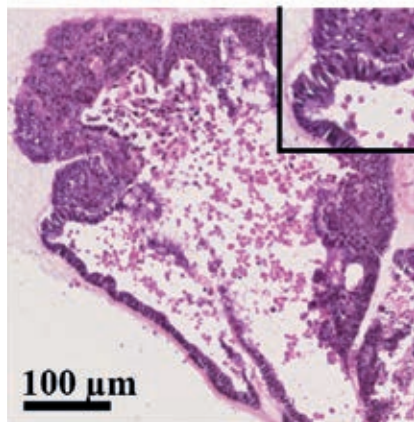


Figure 3 : Caractérisation d'organoïdes de la zone de transition d'estomac de souris.

(A) Représentation schématique de la zone de transition entre un épithélium stratifié et un épithélium glandulaire. (B) Images en champ clair d'un organoïde de zone de transition poussant en culture ALI ainsi que la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) de ce même organoïde après fixation et inclusion en gélatine-sucrose (C). Images comparatives en immunofluorescence (D) et en HES (E) montrant la zone de transition avec les cellules épithéliales stratifiées marquées par un anticorps anti-cytokératine 17 (CK17) et les cellules glandulaires marquées par un anticorps anti-cytokératine 8 (CK8).

Dans le but d'étudier les différentes phases de l'oncogenèse, nous avons établi une bio-banque d'organoïdes de rectum, issue de biopsies saines ou tumorales de patients. Les organoïdes cultivés selon la technique de la goutte immergée, présentent les mêmes caractéristiques histologiques que les biopsies initiales avec un panel allant du normal, passant par des dysplasies de haut grade jusqu'à des adénocarcinomes pouvant être bien, moyennement ou peu différenciés (**Figure 4**). Les tumoroides non seulement reproduisent le grade histologique mais ils conservent aussi le caractère de différenciation observés dans les tumeurs initiales. Ainsi, l'hétérogénéité des cancers du rectum peut être analysée grâce aux cultures d'organoïdes. Dans cette étude, deux marqueurs de cellules souches cancéreuses (OLFM4 et CD44v6) présents dans les biopsies tumorales de rectum (**Figure 5A**) sont retrouvés dans les organoïdes issus de ces biopsies (**Figure 5B**).

La technique de production d'organoïdes à l'interface Air-Liquide permet de garder le microenvironnement tumoral. Les tissus présentent un épithélium tumoral et des cellules inflammatoires (**Figure 5C'**). Ainsi sur des tumoroides de rectum, les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T (marqués par un anticorps anti-CD3) sont retrouvées dans les organoïdes (**Figure 5C**).

DISCUSSION

Nous avons démontré la faisabilité de générer des organoïdes de différents tissus incluant différents sous-types moléculaires et différents stades de progression de la maladie. Les organoïdes conservent le phénotype initialement trouvé dans le tissu d'origine.

Quelques bio-banques de culture d'organoïdes ont été précédemment établies à partir de cancers variés [4, 9]. Ces cultures d'organoïdes peuvent potentiellement

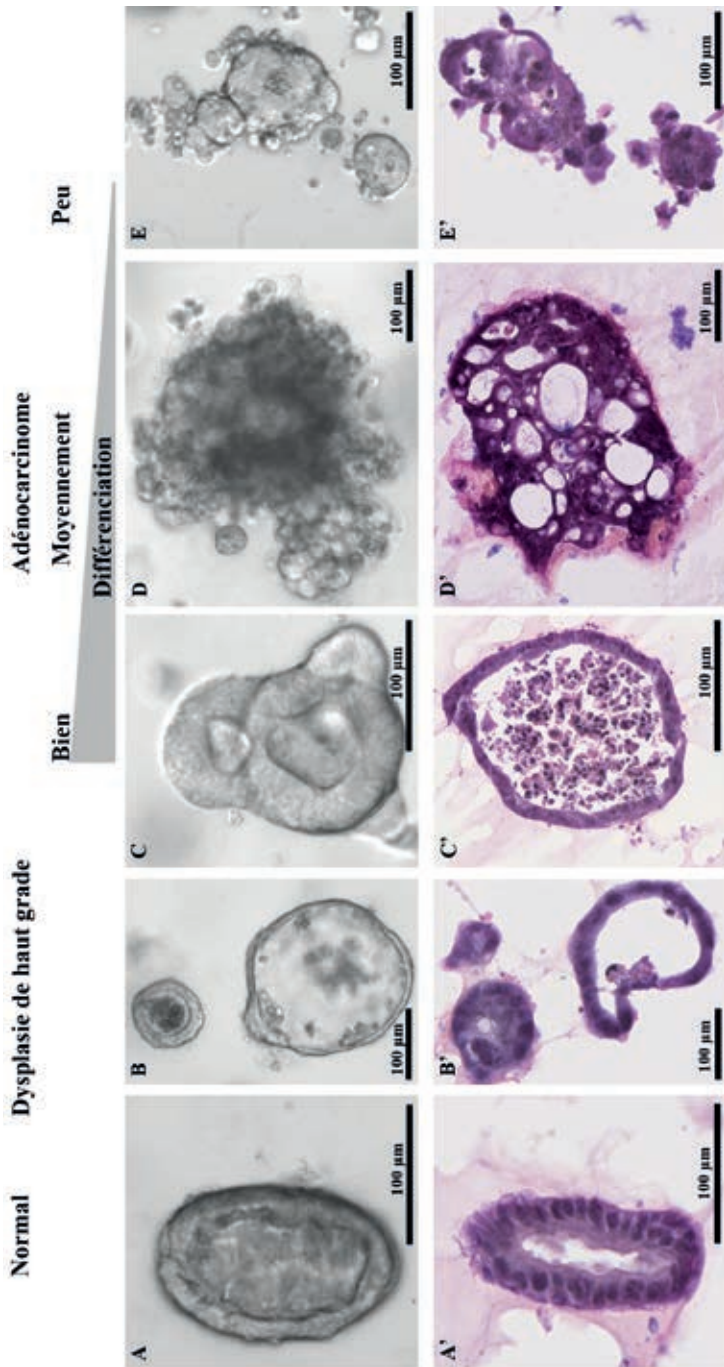


Figure 4 : Etablissement d'une biobanque d'organoïdes de rectum dérivés de patients. A, B, C, D, E. Organoïdes observés en microscopie à champ clair à partir de biopsie de patients. L'analyse des biopsies après coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) montre différents stades de différenciation allant du tissu normal (A) passant par la dysplasie de haut grade (B') jusqu'aux adénocarcinomes bien (C'), moyennement (D') ou peu différenciés (E').

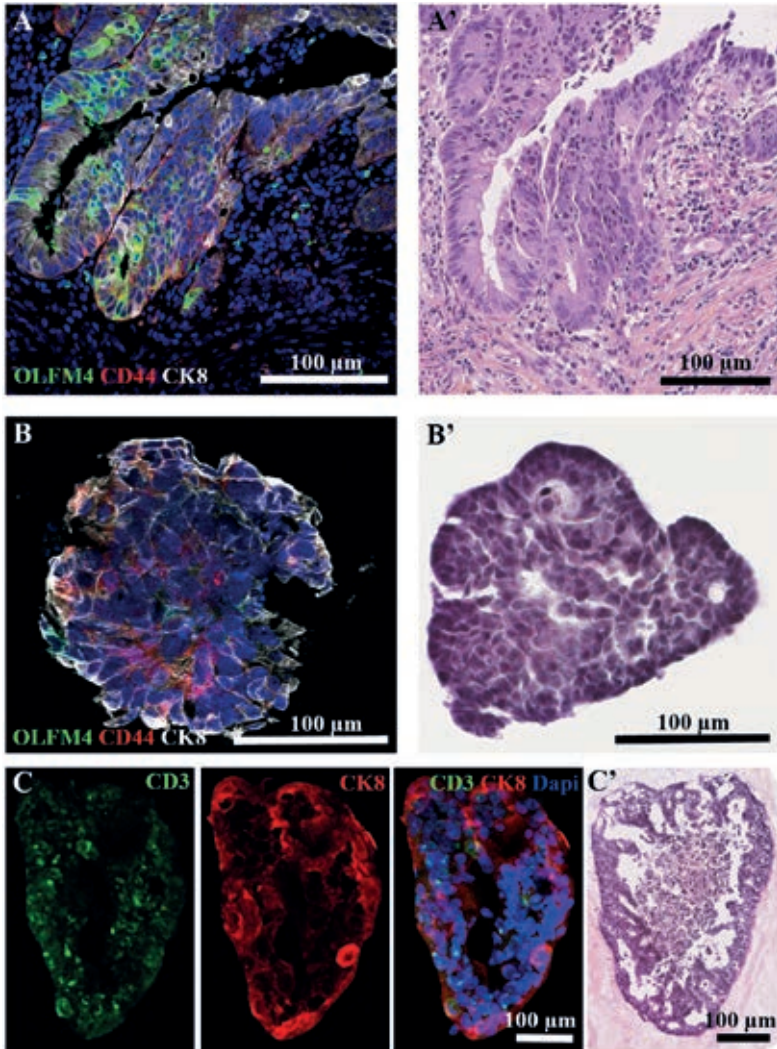


Figure 5 : Caractérisation des tumoroïdes de rectum humain par immunofluorescence. L'analyse de marqueurs de cellules souches cancéreuses tels que OLFM4 et CD44v6 présents dans la biopsie initiale (A) montre la conservation de ces marqueurs dans ces tumoroïdes obtenus par la technique de la goutte immergée (B). Grâce à la technique de culture à l'interface Air-Liquide qui maintient le microenvironnement, la présence de lymphocytes au sein du tumoroïde est révélée par un anticorps anti-CD3 spécifique des lymphocytes T (C). La cytokératine 8 (CK8) marque les cellules épithéliales.

servir d'outils précieux pour étudier les rôles fonctionnels des gènes-clés et leurs conséquences sur le développement tumoral.

Notre bio-banque d'organoïdes de rectum va permettre à l'avenir d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse des cancers du rectum au traitement néoadjuvant car actuellement il n'existe pas de biomarqueurs pertinents pour analyser l'efficacité des chimiothérapies. Ces organoïdes, issus de biopsies, vont permettre de réaliser des tests prédictifs au traitement afin de proposer une stratégie de traitement personnalisée et d'accélérer le développement de drogues anti-cancéreuses. Le développement de nouvelles thérapies pour les cancers a été limité par la difficulté de mener des essais cliniques. Les tests de chimiothérapie sur les organoïdes tumoraux pourraient contribuer au développement d'essais précliniques facilitant la sélection des nouveaux traitements à tester lors d'essais cliniques. La technologie des organoïdes va permettre le développement de stratégies de médecine personnalisée afin d'adapter le traitement à la biologie d'une tumeur donnée.

La technologie de production d'organoïdes à l'interface Air-Liquide qui contient l'épithélium tumoral ainsi que le système immunitaire endogène va permettre de développer de nouvelles études d'immuno-oncologie et ouvrir les portes à des tests d'immunothérapie personnalisée indispensables pour orienter le traitement.

CONCLUSION

Une fois établis, les organoïdes peuvent être cultivés à long terme, cryo-conservés et manipulés génétiquement comme les lignées cellulaires 2D traditionnelles mais avec l'avantage de présenter une complexité tissulaire les rapprochant de l'organisation du tissu d'origine. À ce titre, ces organoïdes combinent la traçabilité des systèmes *in vitro* avec l'architecture 3D et la différenciation des organismes modèles *in vivo*. Ils se présentent comme un atout majeur dans le développement des protocoles de médecine personnalisée de demain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FUJII M. and SATO T. Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nature Mater.* 2021, Feb; **20**(2), 156-169.
2. LI X., OOTANI A. & KUO C. An Air-Liquid interface culture system for 3D organoid culture of diverse primary gastrointestinal tissues. *Methods Mol Biol.* 2016, 1422-33.

3. SATO T., STANGE D., FERRANTE M., VRIES R., VAN ES J., VAN DEN BRINK S., VAN HOUTD W., PRONK A., VAN GORP J., SIERSEMA P. & CLEVERS H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011, **141**, 1762-1772.
4. LO Y.H., KARLSSON K. & KUO C.J. Applications of Organoids for Cancer Biology and Precision Medicine. *Nat Cancer*. 2020,**1**(8) 761-773.
5. MITOYAN L., CHEVRIER V., HERNANDEZ-VARGAS H., OLLIVIER A., HOMAYED Z., PANNEQUIN J., POIZAT F., DE BIASIS-CADOR C., CHARAFE-JAUFFRET E., GINESTIER C. & GUASCH G. A stem cell population at the anorectal junction maintains homeostasis and participates in tissue regeneration. *Nature Com*. 2021, May12. **12**(1)2761.
6. LESAVAGE B.L., SUHAR R.A., BROGUIERE N., LUTOF M.P.&HEILSHORN S.C. Next-generation cancer organoids. *Nature Mater*. 2022, **21**(2) 143-159.
7. LI X., NADAULD L., OOTANI A., CORNEY D.C., PAI R.K., GEVAERT O., CANTRELL M.A., RACK P.G., NEAL J.T., CHAN C.W., YEUNG T., GONG X., UAN J., WILHELMY J., ROBINE S., ATTARDI L., PLEVITIS S., HUNG K., CHEN C.Z., JI H.&KUO C.J. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat. Med*. 2014,**20** 769-777.
8. RICHART L., PICOD-CHEDOTEL M.-L., WASSEF M., MACARIO M., AFLAKI S., SALVADOR M.A., HERY T., DAUPHIN A., WICINSKI J., CHEVRIER V., PASTOR S., GUITTARD G., LE CAM S., KAMHAWI H., CASTELLANO R., GUASCH G., CHARAFE-JAUFFRET E., HEARD E., MARGUERON R. & GINESTIER C. XIST loss impairs mammary stem cell differentiation and increases tumorigenicity through Mediator hyperactivation. *Cell*.2022, **185**, 1-20.
9. DROST J. & CLEVERS H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer*. 2018, **18**(7) 407-418

REMERCIEMENTS

Nous remercions la plateforme d'histopathologie ICEP pour avoir réalisé toutes les colorations HES ainsi que la plateforme imagerie MISC du CRCM. Toutes les cultures d'organoides ont été réalisées sur la plateforme organoïde 3D-Hub-O du CRCM, labélisée par le GIS IBIISA. Ces études ont été financées par l'INSERM, la fondation A*Midex investissement d'avenir CapoStromEX, l'ANR 20-CE13-0009-01 et l'INCA N°2019-188. Remerciements au Canceropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur, à l'Institut National du Cancer et à la Région Sud pour le soutien financier apporté dans la réalisation de ce projet de recherche.