

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2024

THESE 2024 TOU3 2133

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

CERON Rozenn

**Organoïdes : alternatives aux animaux de laboratoire pour les études de drug
screening et autres applications biomédicales**

Mercredi 11 décembre 2024 à 11 heures

Directeur de thèse : LEGALLAIS Cécile

JURY

Président : CUSSAC Daniel
1er assesseur : CAZALBOU Sophie
2ème assesseur : SIEUX Amandine

Maj. le 24/08/2024

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 24/08/2024

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire	M. PARINI A. Physiologie
M. BENOIST H.	Immunologie	
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie	
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire	
M. SALLES B.	Toxicologie	

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F. (*)	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L. (*)	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A. (*)	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S (*)	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
Mme ROYO J.	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A	Droit Pharmaceutique
M. GRACIA M.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme CROSSAY E.	Pharmacognosie
Mme GRISSETI H.	Biochimie
Mme MALLI S.	Pharmacie Galénique
Mme MTAT DALILA D.	Chimie Pharmaceutique
Mme MONIER M.	Microbiologie
M. TABTI R.	Chimie Thérapeutique

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Remerciements personnels

Les études de pharmacie m'ont fait ressentir de nombreuses émotions, des bonnes comme des mauvaises, mais elles m'ont permis de nouer ou de renforcer des liens avec des personnes incroyables.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, Franck et Nancy, pour tout le soutien et l'amour qu'ils m'ont apportés. Vous avez eu la patience de me supporter et d'accepter mes choix. Vous ne serez jamais égalés. Notez bien que je quitte la vie étudiante, préparez-vous à de nombreuses surprises, la prochaine arrive bientôt !

Je remercie mes grands-parents pour leur présence, leur soutien et leur humour dont je ne me lasse pas.

Je remercie également ma sœur, mes grands-parents, mes arrière-grands-parents, mes oncles et tantes de m'avoir encouragée et soutenue tout au long de ces années.

Les membres d'une famille ont parfois quatre pattes. Les miens m'ont offert et m'offrent autant d'amour que de joie.

J'ai la chance d'avoir des amitiés qui résistent au temps et à la distance, même après le lycée. Nous ne pouvons malheureusement pas toujours nous voir mais cela fera bientôt 10 ans que nous apprécions toujours autant les moments que nous partageons ensemble. Ne changez pas.

J'ai souvent répété que si c'était à refaire, je ne ferai pas les mêmes études. Mais pour les amis que j'ai rencontrés, je le referais des milliers de fois ! Certaines amitiés se sont développées plus tardivement que d'autres, mais rien n'enlève le plaisir que j'ai d'être avec vous et de partager d'excellents moments ! Les liens d'amitié se transforment parfois avec le temps, mais les moments vécus ensemble restent intacts.

J'ai eu la chance de réaliser une année de césure qui a été tout simplement exceptionnelle. J'ai rencontré et développé des liens avec des personnes incroyables qui alimentent encore aujourd'hui mon quotidien et d'autres que je n'oublierai pas. Cette année a également été embellie grâce à ma famille et mes amis avec qui j'ai pu partager des moments précieux, je vous en remercie.

Il existe des relations très particulières où l'attachement et la connexion sont inévitables. Elles sont rares et uniques, et elles permettent d'exprimer nos angoisses

et nos pensées frivoles sans être jugé. Elles sont un soutien sans faille et permettent également de faire des bêtises inavouables. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

De nombreuses personnes ont participé à la réussite de mes études, de près ou de loin, et pour la plupart, elles sont encore à mes côtés aujourd'hui, me permettant de clôturer avec succès et joie ce chapitre de ma vie. Je ne peux retenir tout ce que j'ai appris après 23 années d'études au collège, lycée et université, mais une chose est sûre, c'est que je sais compter sur mes doigts pour indiquer le nombre de pintes que je souhaite commander au bar.

Je vous remercie à tous de sublimer ma vie et j'espère que j'apporte un peu de piment dans vos vies. Je vous embrasse.

Remerciements professionnels

Je tiens à remercier Cécile LEGALLAIS, Directrice de recherche CNRS en Biomécanique et Bioingénierie (BMBI) à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), ingénieure en mécanique des fluides et titulaire d'un Doctorat en ingénierie biomédicale. Son expertise et ses conseils avisés ont été essentiels à la réalisation de cette recherche, et j'ai été honorée de travailler sous sa direction. Je vous remercie de m'avoir accueillie en tant que stagiaire et de m'avoir ouvert les portes de l'ingénierie tissulaire et des organoïdes, domaines que je trouve fascinants. J'ai hâte que l'aventure se poursuive.

Mes remerciements vont également à Daniel CUSSAC, doyen et directeur des Sciences Pharmaceutiques, vice-doyen de la Faculté de Santé de Toulouse et professeur de Physiologie et de recherche biomédicale, titulaire d'un Doctorat en pharmacie et d'un Doctorat de Sciences en pharmacologie, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Sa bienveillance et son engagement envers les étudiants sont une source d'inspiration. Je vous remercie aussi d'avoir orienté le choix de mon sujet de thèse.

Je remercie tout autant Sophie CAZALBOU, Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Paul Sabatier Toulouse III, et Docteure en sciences et génie des matériaux travaillant à CIRIMAT Toulouse, de faire partie de mon jury. J'ai toujours apprécié vos enseignements au cours de mes études et admiré votre dévotion à transmettre vos connaissances avec passion et bienveillance, inspirant ainsi les générations d'étudiants qui ont eu la chance de vous côtoyer.

Je remercie chaleureusement Amadine SIEUX, titulaire d'un Doctorat en pharmacie et pharmacienne titulaire de l'officine « Pharmacie du Fort » à Labarthe-sur-Lèze, de m'avoir accueillie lors de mes études de pharmacie. J'ai profondément apprécié travailler à vos côtés, au point de remettre en question ma spécialisation. Votre altruisme et votre authenticité m'ont marquée et inspirée. Merci d'être la personne que vous êtes et de m'avoir offert un cadre aussi enrichissant.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à Pascale VIGNERON, ingénieure d'études au sein du laboratoire BMBI, qui a été d'une patience indescriptible et qui m'a guidé et instruit tout au long des derniers mois. J'ai pu compter

sur elle à tout moment, également lors de la rédaction de cette thèse. Son aide a été très précieuse, je vous en remercie encore.

Je tenais également à remercier tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux, leur soutien et leur collaboration tout au long de ces mois passés à vos côtés.

Certaines rencontres professionnelles sont très enrichissantes sur le plan professionnel, mais aussi sur le plan personnel. Je tiens donc à remercier une autre équipe de recherche travaillant à l'hôpital de Ranguel et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Leur soutien, leur savoir-faire et leur convivialité ont rendu cette expérience formidable et agréable.

J'espère que ce sujet de thèse saura retenir toute votre attention.

Liste des sigles et abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché

Apo : apolipoprotéine

ASC : cellules souches adultes

BMBI : laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie

BSA : albumine sérique bovine

CBB : équipe de recherche Cellules, Biomatériaux, Bioréacteurs

CYP450 : cytochrome P450

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DNL : lipogenèse de novo

EBP : sociétés biopharmaceutiques émergentes

ESC : cellules souches embryonnaires

FDA : Food and Drug administration

FXR : récepteur Farnésioïde X

HepG2 : cellules de carcinome hépatocellulaire

KO : knock out

LAL : lipase acide lysosomale

LDH : lactate déshydrogénase

LDL : lipoprotéines de basse densité

LCA1 : Amaurose congénitale de Leber

MASH : dysfonctionnement métabolique associé à une stéatohépatite

MAFLD : dysfonctionnement métabolique associé à une maladie hépatique stéatosique

MEC : matrice extra-cellulaire

MMP : métalloprotéinases matricielles

Médecine 4P : médecine personnalisée, préventive, prédictive et participative

PBS : solution tampon phosphate-saline

PCL : polycaprolactone

PDMS : polydiméthylsiloxane

PHH : hépatocytes humains primaires

RE : réticulum endoplasmique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

R&D : recherche et développement

SCX : scléroxis

SVF : sérum de veau foetal

T6 : Mécanoculture T6 (CellsScale, Canada)

TSPC : cellules souches/progénitrices tendineuses

VLDL : lipoprotéines de très basse densité

Liste de l'infographie

Figure 1 : "Les 10 marchés pharmaceutiques les plus importants" (chiffre d'affaires en milliards de dollars) - LEEM 2024 – Source IQVIA	21
Figure 2 : "Répartition des exportations françaises de médicaments par zone géographique en 2022" - LEEM 2023 - Source DGDDI	22
Figure 3 : "Essais lancés en France par aires thérapeutiques en 2022" - LEEM 2023.....	23
Figure 4 : "Estimation des 20 aires thérapeutiques principales en 2027" - LEEM 2024 - Source IQVIA	24
Figure 5 : Transactions entre les différents types d'entreprises - IQVIA 2021	26
Figure 6 : "Part des essais de phase 1 par type d'entreprise" - LEEM 2023 - Source IQVIA.....	27
Figure 7 : "Répartition des investissements en R&D par fonction" - PhRMA 2023.....	28
Figure 8 : "Pourcentage d'échecs des médicaments qui progressent" - Van Norman 2019.....	30
Figure 9 : "Repères adhésifs, topographiques, mécaniques et solubles en 2D et 3D". La cellule ne possède pas les mêmes points d'adhérence en fonction de la structure dimensionnelle - Baker et al. 2012	32
Figure 10 : Différentes stratégies pour la production d'organoïdes in vitro - Yang et al. 2023	35
Figure 11 : Conséquences de la mise en place d'une stratégie personnalisée. Les traitements administrés seront adaptés aux patients et potentialiseront l'effet thérapeutique – MASTER 2 IBIS – Mezghenna 2024.....	36
Figure 12 : Structure des lipoprotéines. APO : apolipoprotéines - Bruckert et al. 2018	43
Figure 13 : "Prévalence mondiale de la MAFLD chez les adultes en surpoids ou obèses de la population générale" - Liu et al. 2022	47
Figure 14 : Effet de l'insuline Facteurs responsables de l'augmentation de gènes lipogéniques. L'insuline se lie aux récepteurs entraînant une autophosphorylation des récepteurs. Irs1/Irs2 vont être également phosphorylées après leur amarrage. La voie de signalisation PI3K/Akt est activé, suivi de mTORC1 activant lui-même SREBP1c (qui nécessite l'inhibition concomitante de FoxO1). Le glucose active ChREBP. Ces deux processus conduisent à l'augmentation de l'expression de gènes lipogéniques. Malgré le fait que Irs2 soit inhibée par l'hyperinsulinémie, l'expression élevée de Irs1 dans la zone périverneuse, siège de la lipogenèse, permet d'augmenter le signal insulinémique et par conséquent, l'augmentation de la lipogenèse - Sakurai et al. 2021	50
Figure 15 : Effets de la lipotoxicité – Rada et al. 2020	50
Figure 16 : Comparaison du mécanisme mitochondrial dans un foie sain et atteint de MAFLD – Amorim et al. 2023	51
Figure 17 : Progression de la stéatose hépatique non alcoolique - Petagine et al. 2023.....	53
Figure 18 : Les différents types d'organoïdes hépatiques - Han et al. 2023.....	55
Figure 19 : Stratégies de développement des organoïdes de foie - Hendricks et al. 2023...56	
Figure 20 : Coloration d'une lignée d'organoïdes mutés APOB par le rouge Nil à différents temps : 1 mois et 16 mois. Lipides colorés en jaune et noyaux cellulaires au DAPI - Hendricks et al. 2023	57
Figure 21 : Analyses des scores lipides des différents types d'organoïdes après traitements avec des médicaments, évaluation dose dépendante - Hendricks et al. 2023	58
Figure 22 : Perméabilité de la fluorescéine dans les Caco-2 en condition de flux ou en statique ($p < 0.05$) - Choe et al. 2017.....	67
Figure 23 : Les différentes applications des organoïdes, A) à partir d'un seul individu, B) à partir de plusieurs individus - Prior et al. 2019	71
Figure 24 : Illustration de la structure d'un tendon - Wang J, 2006	74

Figure 25 : Molécule d'acide ascorbique.....	77
Figure 26 : Illustration de la relation entre la MEC, les forces mécaniques et les facteurs humoraux (comprenant par exemple les cytokines, les facteurs de croissance, etc.) - Wang et al. 2006	78
Figure 27 : Représentation de la courbe contrainte-déformation. Les fibres tendineuses présentent une structure « frisée » en l'absence de contraintes, qui se tendra lorsqu'une contrainte sera appliquée - Wang et al. 2006	79
Figure 28 : Représentation de la triade de l'ingénierie tissulaire qui prend en compte les cellules, les biomatériaux et l'environnement.....	81
Figure 29 : Représentation du processus d'électrospinning - Inovenso	82
Figure 30 : Schéma d'électrospinning représentant a) cylindre rotatif, b) collecteur statique - Govindaraju et al. 2023	83
Figure 31 : Images au microscope électronique à balayage de scaffolds possédant des fibres alignées (gauche) et disposées de manière aléatoire (droite) - BMBI 2024	83
Figure 32 : Photographie de la cuve du bioréacteur contenant 6 scaffoldsensemencés - BMBI 2024	90
Figure 33 : Photographie d'un scaffold lors d'un test de traction avec la MTS 400 - BMBI 2024	94
Figure 34 : Photographies de scaffolds lors de tests de traction avec la machine Bose Byodynamic 5100 - BMBI 2024	94
Figure 35 : Schéma récapitulatif de la co-culture foie-tendon	95
Figure 36 : Images du microscope à fluorescence (objectif x20) : analyse du collagène de type I (vert), du cytosquelette (rouge) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024	99
Figure 37 : Graphique représentant les différents modules de Young de différents scaffolds produits en conditions sèches, avec : * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$; ns = $p > 0.05$ - BMBI 2024	102
Figure 38 : Graphique représentant la quantité d'hydroxyproline en fonction du temps - BMBI 2024	103
Figure 39 : Images du microscope à fluorescence, objectif x10 : analyse du collagène de type I (vert), du cytosquelette (rouge) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024	104
Figure 40 : Images du microscope à fluorescence (objectif x10) : analyse du sclérox (vert) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024	105
Figure 41 : Graphique comparant les modules de Young du même scaffolds dans différentes conditions avec : * = $p < 0.05$ – BMBI 2024.....	106
Figure 42 : Images du microscope confocal des organoïdes de tendons après la co-culture. La fluorescence en vert représente le collagène, en rouge le cytosquelette et en bleu les noyaux – BMBI 2024	110

Table des matières

REMERCIEMENTS PERSONNELS.....	7
REMERCIEMENTS PROFESSIONNELS	9
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	11
LISTE DE L'INFOGRAPHIE	12
INTRODUCTION.....	18
PARTIE 1 : INTERET DU DEVELOPPEMENT D'ORGANOÏDES DANS LE MARCHE PHARMACEUTIQUE ...	21
CHAPITRE 1 : ÉTAT DES LIEUX DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE.....	21
1. Le marché français et sa place à l'international.....	21
2. L'innovation pharmaceutique	23
2.1. Définition et chiffres clés.....	23
2.2. Défis et économie du développement médicamenteux.....	24
3. Les sociétés biopharmaceutiques émergentes	25
3.1. Définition	25
3.2. Leur déploiement et le financement de leurs activités	25
4. Les changements de l'industrie pharmaceutique	26
4.1. Le changement d'acteurs et de fonctionnement	26
4.2. Le changement de médication	27
5. L'économie du développement d'un médicament	28
CHAPITRE 2 : PLACES DES ORGANOÏDES DANS LES ETUDES DE DRUG SCREENING	29
1. Le drug screening	29
1.1. Définition et importance	29
1.2. Les avantages du drug screening avec les organoïdes	30
2. Les modèles animaux.....	33
2.1. Les types d'animaux utilisés	33
2.2. Éthique et limites scientifiques.....	33
3. Les organoïdes	34
3.1. Définition	34
3.2. Applications des organoïdes dans le domaine biomédical	35
PARTIE 2 : ORGANOÏDES DE FOIE.....	39
CHAPITRE 1 : LE FOIE ET SES PATHOLOGIES	39
Section 1 : Anatomie et fonctions du foie	39
1. L'anatomie hépatique	39
1.1. La structure hépatique	39
1.1.1. Organisation cellulaire	39
1.1.2. Vascularisation et innervation	40
2. Les fonctions hépatiques.....	41
2.1. Stockage.....	41
2.2. Métabolisme protéique	41
2.3. Métabolisme énergétique.....	42
2.3.1. Métabolisme glucidique	42
2.3.2. Métabolisme lipidique.....	43
2.4. Détoxification et biotransformation hépatique	44
Section 2 : Atteintes hépatiques.....	46
1. Maladie commune à haute prévalence : la MAFLD.....	46
1.1. Présentation de la pathologie	46
1.1.1. Définition et épidémiologie.....	46
1.1.2. Les causes	47
1.1.2.1. Facteurs épigénétiques et génétiques.....	47

1.1.2.2.	Facteurs métaboliques.....	48
1.2.	La physiopathologie	48
1.2.1.	Le tissu adipeux	48
1.2.2.	Le foie	49
1.2.2.1.	Impact lipidique	49
1.2.2.2.	Inflammation.....	51
1.3.	L'évolution clinique et la prise en charge.....	52
2.	Autres maladies.....	53
2.1.	Autres maladies hépatiques	53
2.2.	Maladies monogéniques	53
CHAPITRE 2 : ORGANOÏDES HEPATIQUES.....		54
1.	Modélisations hépatiques et drug screening : les différents types d'organoïdes.....	54
1.1.	Organoïdes monocellulaires	55
1.1.1.	Organoïdes reproduisant des fonctions biologiques <i>in vitro</i>	56
1.1.2.	Organoïdes prouvant les limites des modèles animaux	57
1.1.3.	Organoïdes pour le drug screening	58
1.2.	Organoïdes multi-tissus	59
1.2.1.	Le cas de la MAFLD	59
1.2.2.	Cas des maladies rares	61
1.2.2.1.	La maladie de Wolman	61
1.2.2.2.	Le syndrome d'Alagille.....	62
1.3.	Organoïdes multi-organes : les biopuces	64
1.3.1.	Organ-on-chip.....	64
1.3.2.	Interorgans.....	66
2.	Organoïdes hépatiques et autres applications biomédicales	70
2.1.	Biobanques et plateformes	70
2.2.	Régénération tissulaire et transplantation.....	70
2.3.	La médecine personnalisée	71
PARTIE 3 : PRODUCTION D'ORGANOÏDES DE TENDONS PAR ELECTROSPINNING POUR DES ETUDES DE TOXICITE		73
CHAPITRE 1 : ORGANISATION DU TENDON ET DEVELOPPEMENT.....		73
1.	La physiologie du tendon	73
1.1.	Structure et composants.....	74
1.1.1.	La matrice extracellulaire	74
1.1.2.	Les composants cellulaires.....	75
1.2.	Le développement et l'homéostasie du tendon, source de bioinspiration pour l'ingénierie tissulaire	76
1.2.1.	Les signaux biochimiques	76
1.2.2.	Les signaux dynamiques	78
2.	La tendinopathie.....	80
3.	L'ingénierie tissulaire.....	81
3.1.	L'électrospinning.....	82
3.1.1.	Fonctionnement.....	82
3.1.2.	Paramètres influençant la fabrication des fibres	83
3.2.	Choix du matériau	84
3.3.	Le choix cellulaire	85
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES		86
1.	Processus de fabrication et de caractérisation des scaffolds	86
1.1.	Préparation de la solution de PCL.....	86
1.2.	Electrospinning.....	86
1.3.	Analyse au microscope électronique à balayage (MEB).....	87
1.4.	Analyse des propriétés du matériau électrospinné.....	87
1.4.1.	Mesure de l'épaisseur.....	87
1.4.2.	Mesure de la résistance à la traction.....	87

1.5.	Préparation du matériau pour la culture cellulaire.....	88
2.	Préparation des cultures cellulaires	88
2.1.	La congélation et la décongélation cellulaire	88
2.2.	La culture cellulaire	89
2.3.	La culture dynamique	90
2.4.	La conservation	91
3.	Tests réalisés de manière générale	91
3.1.	Analyses statistiques	91
3.2.	Immunomarquage	91
3.2.1.	Protocole d'immunomarquage	91
3.2.2.	Microscope confocal à balayage laser	92
3.2.3.	Microscope à fluorescence	92
3.3.	Dosage de l'hydroxyproline	93
3.4.	Mesure de l'absorbance de la LDH	93
4.	Tests réalisés de manière spécifique	93
4.1.	Cultures dynamiques pour l'optimisation et la reproductibilité des résultats	94
4.1.1.	Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène	94
4.1.2.	La résistance du collagène produit par les hBM MSC	94
4.2.	Co-cultures statiques en présence de médicaments	94
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		95
1.	Cultures statiques pour déterminer les conditions optimales de culture	95
1.1.	Objectifs.....	95
1.2.	Résultats obtenus	97
2.	Cultures dynamiques pour l'optimisation et la reproductibilité des résultats	100
2.1.	Objectifs.....	100
2.1.1.	Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène	100
2.1.2.	La résistance du collagène produit par les hBM MSC	101
2.2.	Résultats obtenus	101
2.2.1.	Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène	101
2.2.2.	La résistance du collagène produit par les hBM MSC	106
3.	Co-cultures statiques en présence de médicaments	108
3.1.	Objectifs.....	108
3.2.	Résultats obtenus	110
4.	Discussion.....	111
CONCLUSION.....		113
BIBLIOGRAPHIE		117

Introduction

L'exploration des mécanismes biologiques et physiologiques constitue une quête perpétuelle visant à améliorer la compréhension et le traitement des maladies pour optimiser la santé humaine. Depuis des milliers d'années, l'Homme a cherché à soigner divers maux à travers des plantes, des prières, des rituels, voire des sortilèges. Les connaissances se sont développées et améliorées au cours des siècles grâce à l'engagement de certains médecins, chirurgiens et pharmaciens, permettant des avancées notables dans la compréhension et la prise en charge des maladies. Pedanius Dioscoride, médecin, chirurgien, botaniste et pharmacologue grec ayant vécu entre 40 et 90 après J.-C., a mené une étude approfondie sur des substances thérapeutiques. Dans son ouvrage « *De Materia Medica* », il a décrit les propriétés médicinales de centaines de substances telles que des plantes, des minéraux, des huiles, des résines ou encore des vins, en détaillant les instructions vis-à-vis de leurs préparations et de leurs utilisations. Son objectif était de définir et d'expliquer « la préparation, les propriétés et les essais des médicaments », ce qui a influencé considérablement l'évolution de la pharmacologie et des pratiques médicales ultérieures. Le terme « pharmacopée » qui désigne une base de données contenant des descriptions, des spécifications et des méthodes de préparations pour les médicaments et autres substances utilisées en pharmacie, trouve ses racines dans cet ouvrage. Les connaissances sur les substances thérapeutiques n'ont cessé de croître et de se généraliser avec la copie de textes tels que « *Le Canon de la médecine* » d'Avicenne, médecin et philosophe perse (980-1037 après J.-C.), où pas moins de 700 médicaments étaient référencés. Cet ouvrage, s'appuyant sur les doctrines d'Hippocrate (460-370 avant J.-C.) et de Galien (129 et 216 après J.-C.), s'est répandu en Europe et a été enseigné jusqu'à la Renaissance.

Ainsi, la pharmacologie a progressé au cours de l'histoire, ce qui a conduit à la découverte de nouvelles substances thérapeutiques et à l'essor de l'expérimentation animale pour mieux comprendre les interactions entre les composés chimiques et les organismes vivants. Les modèles animaux ont longtemps été utilisés pour étudier, par exemple, la physiologie humaine, comme le prouvent les travaux de Galien avec des macaques de Barbarie, ou les recherches de Louis Pasteur (1822-1895) sur la vaccination. L'émergence de l'industrie pharmaceutique moderne au XX^e siècle n'a fait qu'accentuer l'utilisation du modèle animal qui est devenu une étape obligatoire pour étudier la toxicité, l'efficacité et la sécurité des médicaments, que ce soit en

infectiologie, en immunologie ou encore en cancérologie. Cependant, le modèle d'étude tend aujourd'hui à changer pour devenir un modèle plus précis et plus représentatif des systèmes biologiques humains grâce aux avancées technologiques et scientifiques via le développement d'organoïdes. Les organoïdes sont des structures tridimensionnelles cultivées en laboratoire qui imitent la complexité et la fonction des organes humains, reproduisant les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des tissus ou organes spécifiques. Étant dérivés de cellules humaines, ils offrent une alternative aux modèles animaux et sont plus pertinents pour étudier les maladies humaines et tester des médicaments dans une approche de médecine personnalisée.

Le drug screening, ou le dépistage de médicaments en français, désigne un ensemble de méthodes employées pour identifier et évaluer des substances chimiques utilisées à des fins thérapeutiques. Ce processus se déroule en amont des études précliniques, et vise à définir le potentiel thérapeutique de la molécule d'intérêt à travers des tests *in vitro* ou des modèles animaux. Il est donc primordial de posséder un modèle d'étude fiable et fidèle, afin d'améliorer la découverte de nouvelles substances à visées thérapeutiques. Des modèles d'organoïdes de cerveau, de poumons, de rate, d'intestin mais également de côlon existent de nos jours et sont en cours de développement et/ou d'amélioration.

Cette thèse a pour objectif la présentation des organoïdes comme alternatives aux animaux de laboratoire pour les études de drug screening et autres applications biomédicales, permettant de s'orienter vers une médecine personnalisée et de précision. Nous étudierons en premier lieu l'état actuel du marché pharmaceutique et le fonctionnement de l'industrie, afin de mieux comprendre la place et le potentiel des organoïdes dans ce contexte. Ensuite, nous présenterons les organoïdes hépatiques, car le foie est le principal organe de la métabolisation des médicaments. Cette partie soulignera l'intérêt de s'orienter vers une médecine personnalisée dans diverses applications biomédicales en s'appuyant sur les organoïdes, illustré par des exemples de pathologies hépatiques. Enfin, la dernière partie traitera de la production d'organoïdes de tendons, cultivés seuls ou en co-culture avec des biopuces hépatiques, pour évaluer la toxicité médicamenteuse. Ces tendons ont été développés dans le cadre d'un stage effectué à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) dans le laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie (BMBI), au sein de l'équipe de recherche Cellules, Biomatériaux, Bioréacteurs (CBB) à Compiègne.

Partie 1 : Intérêt du développement d'organoïdes dans le marché pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique est un moteur fort de l'économie mondiale et de la santé publique. Elle coordonne l'évolution de la recherche, de la fabrication et de la commercialisation des traitements à visée humaine et vétérinaire. Il est important de la préserver car en dehors des avancées médicales qu'elle stimule, cette industrie dynamique permet la création de nombreux emplois, elle alimente les échanges commerciaux internationaux et elle participe à l'économie de chaque pays par ses contributions fiscales.

Chapitre 1 : État des lieux de l'industrie pharmaceutique

1. Le marché français et sa place à l'international

Dix pays dans le monde, chacun avec un marché distinct, représentent à eux seuls 72,1% du chiffre d'affaires du marché pharmaceutique. La France se positionne à la 5^{ème} place du classement [1], largement distancée par le marché américain qui possède un système de santé différent. Les pays émergents, représentant 27,9% du chiffre d'affaires mondial, mettent actuellement en place un système de santé leur permettant de faciliter l'accessibilité aux traitements pour une plus grande partie de la population. Ce changement est marqué par un accès renforcé aux médicaments innovants [1], [2], redéfinissant la position des pays émergents sur le marché international (*Figure 1*).

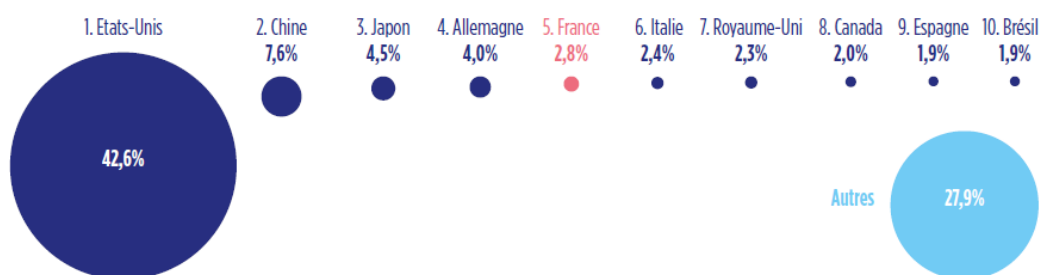


Figure 1 : "Les 10 marchés pharmaceutiques les plus importants" (chiffre d'affaires en milliards de dollars) - LEEM 2024 – Source IQVIA

La France exporte de nombreux produits pharmaceutiques à l'étranger, principalement en Europe (*Figure 2*). La Belgique occupe la première position parmi les destinations, avec une contribution de 5 millions d'euros sur la totalité des exportations qui génèrent plus de 24 millions d'euros en 2022. En contrepartie, le total général des importations de l'année 2022 coûtent près de 28 millions d'euros, ce qui crée un déficit [1].

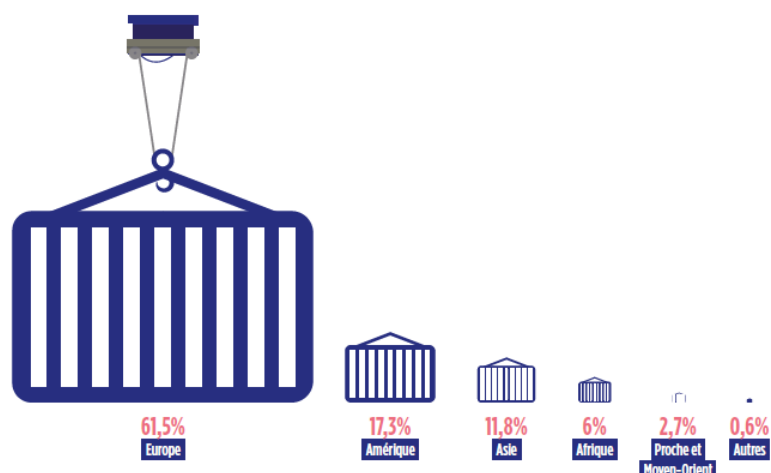


Figure 2 : "Répartition des exportations françaises de médicaments par zone géographique en 2022" - LEEM 2023 - Source DGDDI

Le secteur pharmaceutique représente le 4^{ème} excédent commercial français, mais cet excédent tend à se réduire. Ce classement repose sur l'analyse du solde commercial en valeur monétaire qui se calcule en fonction du nombre d'exportations et d'importations. Depuis quelques années, la France importe de nombreux médicaments innovants et dispendieux qu'elle ne produit pas. Cette dépense n'est pas contrebalancée par ses exportations qui concernent des médicaments peu coûteux [1], ce qui a causé un déséquilibre croissant. Néanmoins, les données du commerce extérieur au cours des six premiers mois de l'année 2024 montrent une inversion de la tendance [3]. Malgré ce changement actuel, les répercussions financières restent élevées puisque l'État doit allouer plus de fonds au commanditaire majoritaire des médicaments, l'Assurance maladie. En conséquence, pour sortir de cette dépendance industrielle, le gouvernement français a mis en place un projet de relocalisation des médicaments essentiels en finançant la construction de sites de production pharmaceutiques. Ce projet de relocalisation fait partie du plan stratégique « France 2030 ». Dernièrement, parmi d'autres initiatives françaises, une entreprise de production de paracétamol va ouvrir début 2025 au sud de Toulouse, grâce à la start-up Isophène, relançant une production européenne absente depuis des années [4]. Parallèlement, le sous-projet « Innovation Santé 2030 », dans lequel 7,5 milliards d'euros ont été investis, facilite l'accès aux produits de santé innovants et entreprend

de positionner la France en tant qu'acteur de premier plan dans le domaine de l'innovation en santé [5] en stimulant l'innovation dans les biotechnologies et les thérapies innovantes.

2. L'innovation pharmaceutique

2.1. Définition et chiffres clés

L'innovation pharmaceutique se réfère à la capacité d'une industrie à créer et à mettre sur le marché de nouveaux médicaments et traitements [6]. Elle évalue l'efficacité de la recherche et du développement au sein des entreprises pharmaceutiques. Cette innovation englobe également l'introduction de nouvelles stratégies thérapeutiques, apportant des améliorations notables en termes d'efficacité, de sécurité ou de méthodes de traitement par rapport aux thérapies existantes [7]. Cette innovation évolue vers une innovation ouverte, c'est-à-dire que son fonctionnement tend à se développer vers une approche multi-acteur où les entreprises pharmaceutiques se tournent vers des start-up, des universités ou des patients pour collaborer et améliorer leurs innovations. En plus de réduire les coûts de recherche, l'innovation ouverte permet d'accélérer la découverte de certaines thérapies en élargissant le portefeuille des industries [8].

Après « l'âge d'or » de l'industrie pharmaceutique, qui correspond à une période d'abondance marquée par une forte croissance et l'apparition de nombreux nouveaux médicaments, le secteur pharmaceutique a connu une chute marquée. Actuellement, l'industrie pharmaceutique est en train de se réinventer. Elle met l'accent sur l'innovation, grâce au développement de nouvelles technologies et aux progrès scientifiques qui permettent de produire des thérapies ciblées et personnalisées [6].

En France en 2022, les marchés thérapeutiques les plus impactés par l'innovation pharmaceutique sont les domaines de l'oncologie, des maladies auto-immunes et inflammatoires, et des affections du système nerveux central (*Figure 3*) [1].

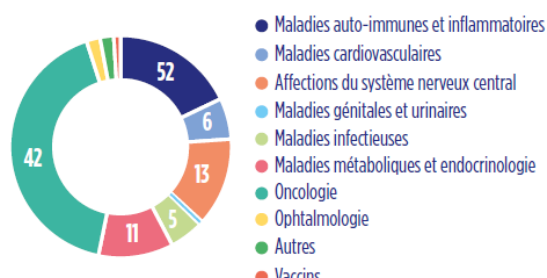


Figure 3 : "Essais lancés en France par aires thérapeutiques en 2022" - LEEM 2023

Selon les estimations pour 2027 sur le marché international, les aires thérapeutiques qui devraient connaître la plus grande évolution sont l'oncologie, l'immunologie et le diabète (*Figure 4*) [9].

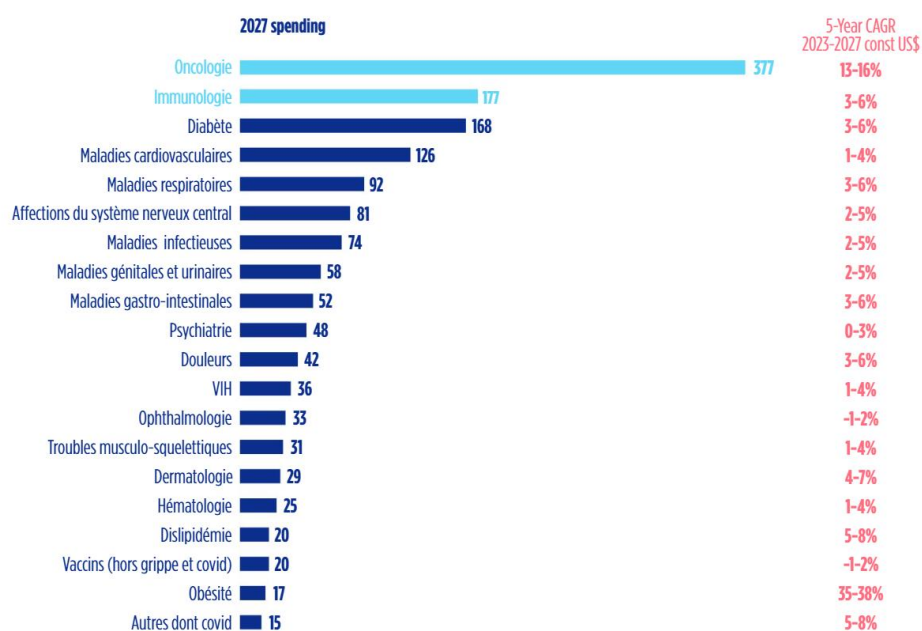


Figure 4 : "Estimation des 20 aires thérapeutiques principales en 2027" - LEEM 2024 - Source IQVIA

2.2. Défis et économie du développement médicamenteux

Selon la définition du Code de la santé publique en France, plus précisément de l'article L5111-1, un médicament est « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou pouvant lui être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier ses fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » [10]. Le processus de découverte et de mise sur le marché d'un médicament est très long, il dure environ 20 ans. L'ensemble de la recherche et du développement (R&D) d'un médicament coûte très cher et nécessite des investissements importants. Les coûts moyens de développement sont estimés à 2,3 milliards de dollars en 2022, contre 900 millions de dollars en 2012 [1]. Cette augmentation a de nombreux impacts sur l'économie, l'innovation et l'accès aux traitements. Le retour sur investissement étant diminué, le prix des traitements mis sur le marché est donc plus cher. Par conséquent, les industriels se concentrent en règle générale sur le développement de traitements ciblant des maladies communes, très fréquentes et avec une forte prévalence car les retombées économiques seront plus importantes. Ils s'intéressent peu aux thérapies

ciblant les maladies rares, souvent monogéniques et ne touchant qu'une faible partie de la population, qui elles, attireront d'avantage les laboratoires ou les start-ups de biotechnologie.

3. Les sociétés biopharmaceutiques émergentes

3.1. Définition

Les sociétés biopharmaceutiques émergentes (EBP) sont des entreprises relativement récentes, de petites ou moyennes tailles, avec un chiffre d'affaires inférieur à 500 millions de dollars et dont les dépenses en R&D représentent moins de 200 millions de dollars par an [1]. Elles se concentrent sur la recherche, le développement et la commercialisation de nouveaux médicaments en s'appuyant sur des technologies innovantes telles que la thérapie génique, l'immunothérapie ou les biotechnologies, comprenant l'ingénierie tissulaire et la production d'organoïdes. Ces EBP vont généralement se spécialiser dans un domaine en particulier, comme les thérapies ciblant des maladies rares, des cancers spécifiques ou dans les vaccins à ARNm. Tel est le cas de Moderna, qui est passée du statut d'entreprise émergente à une entreprise de premier plan grâce à son vaccin contre la COVID-19 [11].

3.2. Leur déploiement et le financement de leurs activités

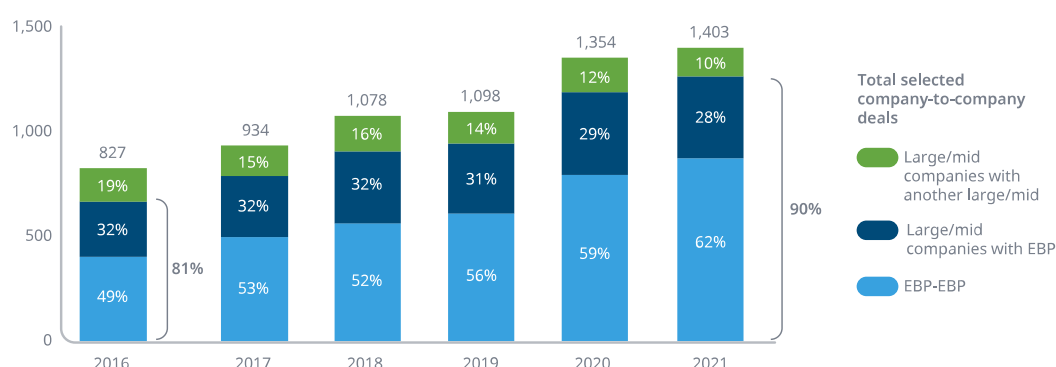
Le déploiement de ces sociétés est en partie dû à l'attractivité des politiques liées à la mise sur le marché des médicaments orphelins grâce aux incitations fiscales et réglementaires offertes par les autorités de santé [12]. La réglementation européenne sur les médicaments orphelins (Règlement CE n° 141/2000) offre une exclusivité de marché de 10 ans sur le marché européen, voire 12 ans s'il possède une indication pédiatrique. Aux États-Unis, cette exclusivité dure 7 ans [13]. De plus, des réductions sont appliquées sur les frais de la réglementation, que cela concerne l'autorisation de mise sur le marché (AMM) ou les inspections avant autorisations [14]. Dans ces conditions, les subventions sont plus facilement accordées pour la recherche, comme avec Horizon Europe [15], et une assistance scientifique et administrative est mise en place pour que les EBP obtiennent des conseils spécifiques. Les aides fournies à la recherche pour les petites et moyennes entreprises proviennent d'un fond européen. Ce fond est géré conjointement par l'Agence européenne du médicament et la Commission européenne. Les entreprises peuvent enregistrer une provision déductible pour leurs investissements, qui sera réintégrée après l'obtention de l'AMM. En contrepartie, celles qui profitent des ventes de ces médicaments doivent rembourser une partie des aides reçues pour alimenter le fond européen [16]. En plus

des fonds européens, il existe des fonds nationaux ou régionaux mais également des bailleurs de fond comme BPI France. La Banque Publique d'Investissement France, est une institution financière française créée pour soutenir l'innovation, la croissance et la compétitivité des entreprises françaises, en particulier des petites et moyennes entreprises (PME) [17]. Des investisseurs privés ou des partenariats industriels peuvent également financer les entreprises. Grâce à ces outils, les sociétés sont capables de prendre des risques mais elles sont surtout plus motivées.

4. Les changements de l'industrie pharmaceutique

4.1. Le changement d'acteurs et de fonctionnement

Tous ces avantages sont mis en place pour stimuler l'innovation en aidant des sociétés à surmonter les défis financiers. De ce fait, le nombre d'EBP n'a cessé d'augmenter depuis une vingtaine d'années. Cette tendance se poursuit, ce qui entraîne un changement d'acteurs dans le monde industriel pharmaceutique. Les industries se déchargent des services de R&D en les confiant à des CRO, des sociétés de recherche contractuelle (Contract Research Organization) qui réalisent des tests précliniques et cliniques, des tests toxicologiques, de biodisponibilité, etc., [18]. Les partenariats entre EBP-EBP sont en forte augmentation, représentant 62 % des accords en 2021, tandis que les collaborations entre grandes et moyennes entreprises pharmaceutiques diminuent (*Figure 5*), au profit d'autres partenariats (EBP-EBP et grandes/moyennes entreprises-EBP).



Source: IQVIA Pharma Deals, Dec 2021.

Notes: Deals of all types between two biopharma companies are counted and segmented by the participants company segmentation. Deals between biopharma companies and those outside the industry are not included.

Report: Emerging Biopharma's Contribution to Innovation. IQVIA Institute for Human Data Science, June 2022

Figure 5 : Transactions entre les différents types d'entreprises - IQVIA 2021

Cela montre que les EBP deviennent plus autonomes dans le développement et la commercialisation de nouveaux médicaments. Ces sociétés biopharmaceutiques émergentes arrivent progressivement à se développer et à occuper une part conséquente sur le marché du médicament, elles sont actuellement responsables des deux tiers de la pipeline de la R&D [1], [19].

4.2. Le changement de médication

Avec le développement des EBP, de nombreuses innovations pharmaceutiques ont été élaborées grâce aux avancées scientifiques et biotechnologiques permettant d'utiliser des outils comme la génomique, la protéomique ou encore la transcriptomique. Ces outils ont contribué à l'exploration plus approfondie des systèmes biologiques [20] et au développement de nouveaux médicaments : l'étude protéomique de certaines protéines en condition pathologique permet d'identifier lesquelles sont responsables de maladies. En se désintéressant des molécules chimiques et des « blockbusters » au profit des biomédicaments, les EBP ont contribué à l'utilisation de nouveaux traitements plus spécifiques et plus précis tels que les thérapies géniques et cellulaires, les anticorps monoclonaux, les vaccins à ADN ou ARN, etc. [6]. Actuellement, de nombreux biomédicaments sont impliqués dans des essais cliniques de phases 1, dirigés en majorité par des EBP (*Figure 6*) [1].

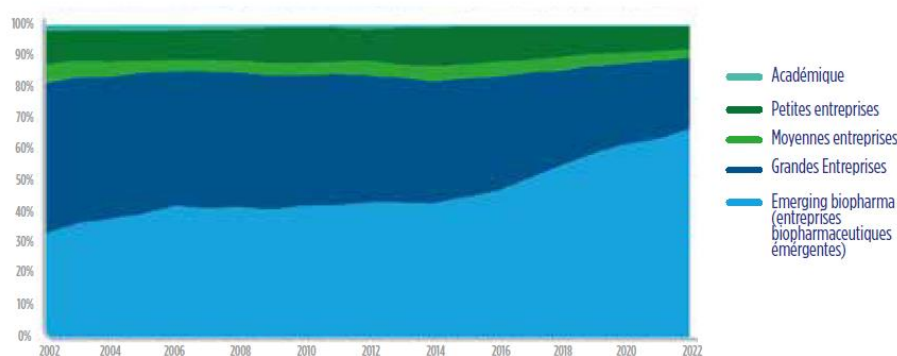


Figure 6 : "Part des essais de phase 1 par type d'entreprise" - LEEM 2023 - Source IQVIA

ATSENA Therapeutics est une société de thérapie génique au stade clinique spécialisée en ophtalmologie et employant des technologies de nouvelle génération de virus adéno-associés. Ils développent actuellement des thérapies pour traiter des maladies orphelines pédiatriques. L'une d'entre elles, qui concerne des patients atteints d'amaurose congénitale de Leber (LCA1) causée par des mutations bialléliques, a terminé son essai clinique de phase 1/2, multicentrique, ouvert et unilatéral à dose croissante. Cette maladie, causée par plus de 20 gènes, entraîne une perte de vue intense dès la naissance. Actuellement, aucun traitement n'existe mais les résultats ont montré une amélioration de la sensibilité rétinienne malgré quelques limites, mais suffisants pour entamer l'essai de phase 3 [21], [22]. De plus, ATSENA Therapeutics a reçu la « désignation de maladie pédiatrique rare, la désignation de thérapie avancée en médecine régénérative et la désignation de médicament orphelin

de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour son produit de thérapie génique expérimental pour le traitement de la LCA1 associée à *GUCY2D* » [22], ce qui lui confère des avantages en matière de R&D et de protection de la propriété intellectuelle. Les essais cliniques de phase 1/2 sont une nouvelle approche permettant de faciliter les études cliniques pour les molécules innovantes. Par exemple, la sécurité et l'efficacité sont testées successivement [23], ce qui permet de réduire les coûts. Cette société met en évidence les changements d'acteurs et de médication que rencontre le marché pharmaceutique actuel.

5. L'économie du développement d'un médicament

Les entreprises pharmaceutiques, quelle que soit leur taille, doivent structurer leur réflexion pour prendre des décisions concernant le développement d'un médicament. Elles vont analyser différentes données, dont l'opportunité scientifique et clinique, la viabilité commerciale et le contexte politique [24]. Après la validation scientifique qui porte sur la faisabilité clinique, les choix sont basés sur les considérations économiques. En prenant le cas des médicaments orphelins, l'utilisation de cadres conceptuels permet d'orienter la décision des entreprises pour garantir une innovation durable. La prise en compte des coûts d'investissement (*Figure 7*), des revenus attendus et des risques associés, permet d'orienter la prise de décision. Cependant, les entreprises tiennent compte des politiques qui peuvent impacter la R&D. Elles peuvent atténuer les coûts, réduire le temps de recherche et accélérer l'obtention des approbations réglementaires, tout en assurant la protection de la propriété intellectuelle qui garantit un monopole sur l'innovation [25]. Dans cette optique, le moindre changement en R&D, tel que la durée des tests, le nombre et le type d'animaux employés, aura

un impact sur l'investissement total. Un moyen peut être mis en place pour sécuriser les revenus et réduire les risques d'échecs : l'amélioration des technologies de « drug screening » par l'utilisation d'organoïdes.

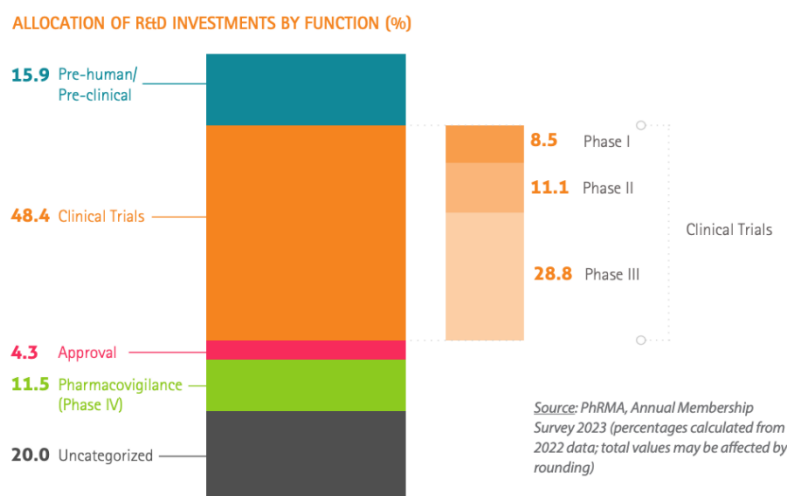


Figure 7 : "Répartition des investissements en R&D par fonction" - PhRMA 2023

Chapitre 2 : Places des organoïdes dans les études de drug screening

1. Le drug screening

1.1. Définition et importance

Le processus de développement d'un médicament débute par le choix de la maladie à traiter. Il est essentiel d'identifier une cible (par exemple une protéine, un récepteur ou une enzyme) dont l'objectif sera de prouver son rôle fonctionnel dans la pathologie choisie à travers des études génétiques, génomiques ou protéomiques [6]. Une fois que la cible est validée, le processus de drug screening commence : des centaines voire des milliers de molécules sont testées via le *de novo drug design* (visualisation et modification de molécules dans un environnement virtuel par la connaissance moléculaire de la cible ou de son ligand) [26] ou par criblage à haut débit (*high-throughput screening*) [27], pour identifier les composés actifs capables d'interagir avec la cible. Cette dernière technique est utilisée de manière récurrente par les entreprises pharmaceutiques car elle permet à des molécules de moins de 500 Daltons (Da) d'être testées contre une cible biologique [28]. Une sélection de molécules est effectuée permettant d'obtenir des « hits », capables de se lier à la cible spécifique et de moduler son activité. Ces derniers seront caractérisés et améliorés par rapport à leur efficacité, leur sélectivité et leur propriétés pharmacologiques afin d'obtenir les molécules les plus prometteuses. L'une d'entre elles sera choisie, le « lead », avant d'être elle-même optimisée et testée [6]. La molécule d'intérêt sera étudiée plus en détail au travers de tests *in vitro*, parfois sur des modèles animaux. Après toutes ces étapes, le candidat médicament passera en phase de développement préclinique. Toutefois, les milliers de molécules précédant la sélection du candidat médicament seront conservées dans des bibliothèques virtuelles et pourront faire l'objet de nouvelles études sur différentes cibles [29], ce qui contribue à la réduction du développement des molécules issues des éléments naturels [28].

La conception d'organoïdes pour des études de drug screening offrirait la possibilité, en plus de jouir de traitements spécialisés, de réduire la part des échecs dans les essais cliniques. Entre 2007 et 2010, ainsi qu'entre 2013 et 2015, des enquêtes ont révélé que le pourcentage d'échecs des essais cliniques de phase II et III était très élevé. En cause, un manque d'efficacité à hauteur de 56% et 52% respectivement et des problèmes de sécurité avec des taux à 28% et 24% [27] (incluant de la toxicité, des effets secondaires graves, etc.).

Des études ont mis en évidence que la part d'échecs dans les essais précliniques et cliniques était largement supérieure au taux de réussite. Seulement un dixième des molécules pharmaceutiques en cours de développement réussit les tests précliniques pour entrer dans les phases cliniques. La troisième colonne illustre de manière hypothétique le taux de réussite des essais cliniques si les molécules toxiques étaient effectivement bien identifiées lors des phases précliniques, suggérant une corrélation entre la toxicité observée chez l'animal et celle chez l'humain (Figure 8) [30].

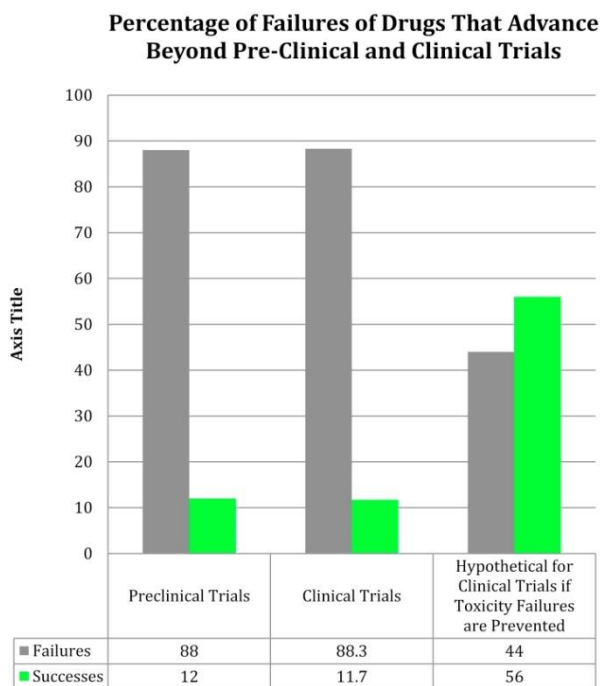


Figure 8 : "Pourcentage d'échecs des médicaments qui progressent" - Van Norman 2019

Ces résultats nous prouvent à la fois la complexité de développer de nouveaux traitements, malgré la variété de tests effectués lors des études précliniques pour limiter les insuccès des recherches, mais également l'importance d'élaborer des modèles d'études fiables et représentatifs des pathologies humaines [31], notamment grâce aux organoïdes.

1.2. Les avantages du drug screening avec les organoïdes

Le nombre de cancers a explosé dans le monde en une trentaine d'années. En France en 2023, 433 136 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués, avec une prédominance chez les hommes (57%). Le cancer de la prostate est le plus répandu chez les hommes, avec 59 885 nouveaux cas en 2018, mais il constitue la troisième cause de décès masculine. Chez les femmes, le cancer du sein est le plus fréquent, avec 61 214 nouveaux cas en 2023, et il représente la principale cause de mortalité. En ce qui concerne le cancer colorectal, il est la deuxième cause de décès par cancer chez les hommes et la troisième cause chez les femmes. Le cancer du poumon fait partie des 4 cancers les plus fréquents avec 52 777 nouveaux cas tous genres confondus [32]. Ces statistiques nous montrent l'importance de la prise en charge des cancers en France pour diminuer la mortalité, et l'intérêt de produire des modèles de cancers sous formes d'organoïdes afin de développer des traitements de plus en plus adaptés.

Le type d'organoïdes développés à partir de cellules tumorales s'appelle des tumoroïdes. Ils se distinguent des organoïdes par l'utilisation de cellules tumorales provenant de la tumeur du patient [33]. Ces structures conservent une forte similarité avec la génétique des cellules tumorales *in vivo* sur de longues périodes [34], [35] ce qui favorise l'accès aux chercheurs pour réaliser des études protéomiques et/ou transcriptomiques [36]. Dans le cas du cancer colorectal, de nombreuses mutations génétiques jouent un rôle dans le développement du cancer. Ces gènes ont été en partie identifiés grâce à l'utilisation d'organoïdes et de la technologie de CRISPR-Cas9. Cette technique permet de modifier de manière précise et efficace l'ADN, en activant ou en inhibant des voies impliquées dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs ou les pro-oncogène [37]. Une hétérogénéité est présente au sein de tumeurs et entre les tumeurs car en plus des gènes principaux identifiés qui sont *APC*, *KRAS*, *SMAD4* et *TP53*, des mutations rares ont été découvertes [38]. Ces variabilités intra- et intertumoraux accentuent la complexité de traitement de ce type de cancer ce qui explique l'échec de nombreuses thérapies. La multitude d'organoïdes issus des tumeurs qu'il est possible de produire grâce aux modifications génétiques par l'édition du génome, augmente la chance de découvrir un traitement efficace et adapté au patient.

Des études ont prouvé la fiabilité des organoïdes lors de tests de sensibilité aux médicaments par rapport aux conditions *in vivo*. De nombreux organoïdes présentant différents génotypes, issus d'une biobanque créée spécifiquement, ont été testés en présence de différents agents anticancéreux pour le traitement du cancer gastrique. Les organoïdes étaient représentatifs des conditions *in vivo* car ils présentaient les mutations les plus fréquentes dans ce type de cancer (*TP53*, *APC*, *SMAD4* ou *MUC6*). Dans ces conditions, des médicaments ont été mis en contact avec les organoïdes et les réponses obtenues ont permis de mettre en évidence des réponses similaires : résistance face au 5-fluorouracil (5-FU) et au cisplatine, réponse positive avec un nouveau traitement, la napabucasine [35].

Pour étudier les pathologies telles que le cancer, d'autres modèles d'études existent comme les lignées cellulaires cultivées en 2D (cellules tumorales primaires ou immortalisées) ou les xénogreffes dérivées de patients (tumeurs humaines présentes dans des organismes vivants autres qu'humains, comme des souris) [33]. Cependant, ces modèles ne sont pas aussi représentatifs que les tumoroïdes car ils sont difficilement cultivables sur le long terme et perdent leur diversité génétique au cours

des différentes manipulations expérimentales, contrairement aux tumorôides [33], [37]. L'un des principaux inconvénients de la culture 2D est l'interaction cellulaire. Malgré qu'il existe des interactions cellule-cellule, les interactions cellule-matrice sont limitées ou absentes, ce qui impacte la différenciation et la signalisation cellulaire. En effet, les adhésions cellulaires diffèrent en fonction du support sur lequel les cellules se trouvent (*Figure 9*), modifiant les forces mécaniques qui les régulent. Les cellules nécessitent une certaine flexibilité pour se développer, ce qui est limité sur un support rigide en plastique [39]. Dans une culture en trois dimensions, les cellules possèdent de nombreuses interactions cellulaires avec la matrice, rendant ainsi possible la conservation de leurs structures, de leurs fonctions et des mutations génétiques de la tumeur d'origine [40]. Elles peuvent continuer à interagir entre elles en transmettant des signaux biochimiques et dynamiques, reproduisant ainsi un microenvironnement semblable à celui retrouvé *in vivo* [27], [33], [41]. Les xénogreffes, quant à elles, sont au contact des microenvironnements de l'hôte qui ne sont pas d'origine humaine [37], ce qui altère leur efficacité. Ainsi, les organoïdes/tumorôides apportent plus de spécificité et sont des modèles idéaux pour la modélisation de maladies, les études de toxicité et de dépistage de médicaments.

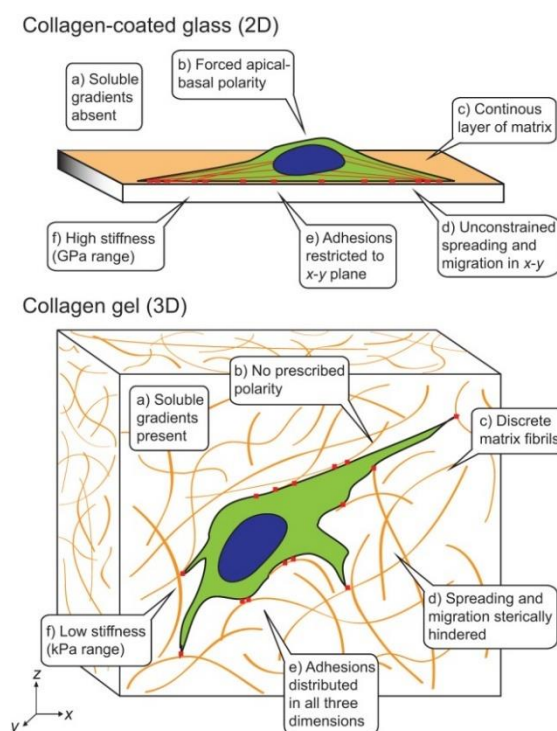


Figure 9 : "Repères adhésifs, topographiques, mécaniques et solubles en 2D et 3D". La cellule ne possède pas les mêmes points d'adhérence en fonction de la structure dimensionnelle - Baker et al. 2012

Elles peuvent continuer à interagir entre elles en transmettant des signaux biochimiques et dynamiques, reproduisant ainsi un microenvironnement semblable à celui retrouvé *in vivo* [27], [33], [41]. Les xénogreffes, quant à elles, sont au contact des microenvironnements de l'hôte qui ne sont pas d'origine humaine [37], ce qui altère leur efficacité. Ainsi, les organoïdes/tumorôides apportent plus de spécificité et sont des modèles idéaux pour la modélisation de maladies, les études de toxicité et de dépistage de médicaments.

Le développement d'organoïdes est une alternative aux modèles cellulaires existants et aux animaux de laboratoire. Le modèle animal n'est pas fiable en totalité car des différences génétiques et physiologiques existent avec l'Homme, ne permettant pas de prédire en totalité l'efficacité et la sécurité des médicaments. Le cas classique du thalidomide, utilisé comme sédatif et anti-nauséeux à la fin des années 1950 chez les femmes enceintes, a provoqué de graves effets sur le fœtus, dont la phocomélie [42]. Ce médicament, contre-indiqué chez les femmes enceintes ou en âge de procréer [43], met bien en évidence cette différence entre les espèces animales utilisées en laboratoire et l'Homme : « les tests sur les animaux n'ont pas révélé de tératogénicité significative chez 10 souches de rats ; 11 races de lapins ; 2 races de chiens ; 3

souches de hamsters ; 8 espèces de primates ; et divers chats, tatous, cochons d'Inde, porcs et furets » [44]). Ces différences interespèces concernent de nombreuses fonctions anatomiques, particulièrement des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme, ainsi que dans la variation de l'expression des gènes et d'enzymes métaboliques [33], [45].

2. Les modèles animaux

2.1. Les types d'animaux utilisés

Le choix des animaux s'impose par leur similitude physiologique avec les humains. Chaque espèce présente une particularité favorisant son utilisation dans des études différentes qui peuvent porter sur la neuroscience, sur le développement embryonnaire ou encore sur la génétique. Les rongeurs (rats et souris) sont les animaux les plus employés par les laboratoires. Au cours de l'année 2022, les souris représentent 66% des utilisations et les rats 8%. Les lapins et les poissons, tous confondus, sont employés à hauteur de 9% chacun. Les 8% restants concernent les autres animaux comme les primates (0.2%), les chats (0.1%), les chiens (0.2%), etc., [46]. La souris possède une similitude génétique élevée avec l'Homme, ce qui en fait un animal de choix mais qui, cependant, n'est pas représentatif de la physiologie humaine dans sa totalité. Les souris peuvent être modifiées génétiquement, c'est le cas des souris « knock out » (KO) et « knock in ». Dans le premier cas, un gène fonctionnel sera inactivé ou remplacé pour étudier son rôle dans la physiologie murine [47]. Dans le second cas, un gène codant pour un oncogène par exemple, sera inséré dans l'ADN de la souris. En dehors des animaux transgéniques, il existe des animaux présentant des mutations génétiques naturelles qui sont également étudiés à des fins biomédicales. Tous ces animaux sont utilisés dans le but de dépister de nouveaux traitements à partir de modèles de pathologies humaines [48].

2.2. Éthique et limites scientifiques

La prise en considération des conditions de traitement des animaux a évolué au fil du temps, et des institutions ont pris conscience de l'importance de limiter l'utilisation des animaux, notamment pour réduire leur souffrance. Cependant, malgré des directives dont la première est apparue en 1986, substituée par la directive 2010/63/UE [49], le nombre d'animaux utilisés en laboratoire n'a pas diminué de manière significative au cours de la dernière décennie : 1 769 618 animaux utilisés en 2014 contre 1 802 025 en 2022 [46], [50]. Le règlement européen 2019/10 a sollicité plus de transparence de la part des laboratoires utilisant les animaux [51], ce qui a augmenté le nombre

d'animaux utilisés à hauteur de 2 128 058 en France, car les animaux d'élevage n'étaient pas compris jusque-là [46]. Le principe des « 3R » établi par Russell et Burch en 1959, vise à « remplacer » les animaux lors des expériences par des alternatives lorsque cela est possible (lignées cellulaires, utilisation de l'informatique de nos jours, etc.), à « réduire » le nombre d'animaux utilisés et à optimiser la collecte d'informations. Le dernier « R » renvoie au fait de « raffiner » les expérimentations, c'est-à-dire de diminuer la « fréquence ou [...] la gravité des procédures inhumaines appliquées » [49], [52]. L'objectif étant de réduire ou de diminuer « l'inhumanité » [52]. Pourtant, de nombreux animaux, en particulier les plus exploités (souris, rats et lapins), qui constituent 97% de ces animaux, subissent encore des expériences qualifiées de « sévères » qui constituent 11,5% des expérimentations [50].

Les animaux ne sont pas génétiquement fiables à 100%, ce qui constitue une source d'erreur pour les études cliniques. Cette limite génétique démontre l'importance de développer des modèles représentatifs de la biologie humaine et d'explorer au maximum les effets thérapeutiques et indésirables de ces nouveaux traitements. Le développement et la production des organoïdes apportent une solution à ce problème et permettent d'orienter les recherches vers des cultures multi-organoïdes intégrant des organoïdes de foie, afin de prendre en considération la métabolisation hépatique des médicaments dans le corps humain.

3. Les organoïdes

3.1. Définition

Les organoïdes sont des structures tridimensionnelles cultivées *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes, embryonnaires ou adultes, capables d'imiter la complexité anatomique et fonctionnelle des organes humains, en reproduisant leurs caractéristiques et fonctions physiologiques [53]. Ils sont ainsi définis par « l'auto-organisation, la multicellularité et fonctionnalité » [54]. Le concept influençant le développement d'organoïdes remonte au début des années 1900, époque à laquelle Edmund Beecher Wilson, biologiste américain, a mis en évidence la capacité des cellules embryonnaires à être dissociées et à se réorganiser en une structure organisée qui leur est propre [40]. Par la suite, à partir des années 1980, des études ont été menées permettant de simuler la recherche sur les organoïdes. Depuis quelques années, cette approche est en train de se développer rapidement et de révolutionner la recherche biomédicale. La conception d'organoïdes nécessite des connaissances approfondies et la réalisation de nombreux tests pour produire des

organoïdes fiables et reproductibles. Cette étape comprend notamment le choix cellulaire, le choix de la matrice, mais aussi les éléments biochimiques et/ou dynamiques qui influencent le développement des cellules. Les cellules peuvent être des cellules souches embryonnaires (ESC), des cellules souches adultes (ASC), des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) [33], [55] obtenues après reprogrammation, et des cellules tumorales [33] prélevées sur la tumeur du patient (*Figure 10*).

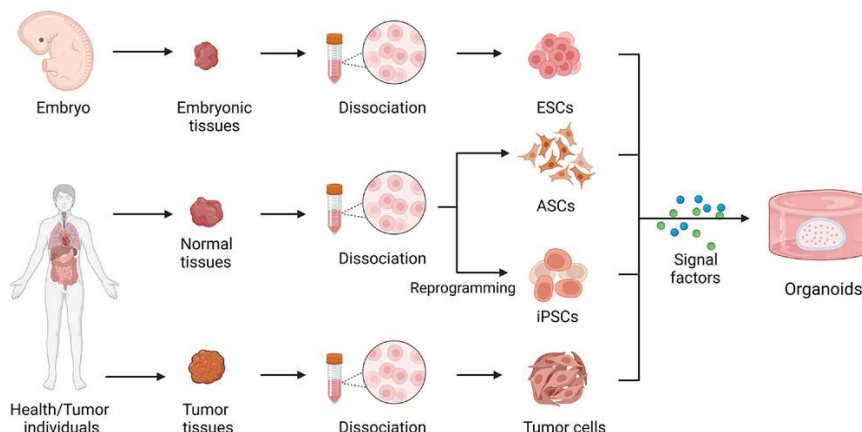


Figure 10 : Différentes stratégies pour la production d'organoïdes *in vitro* - Yang et al. 2023

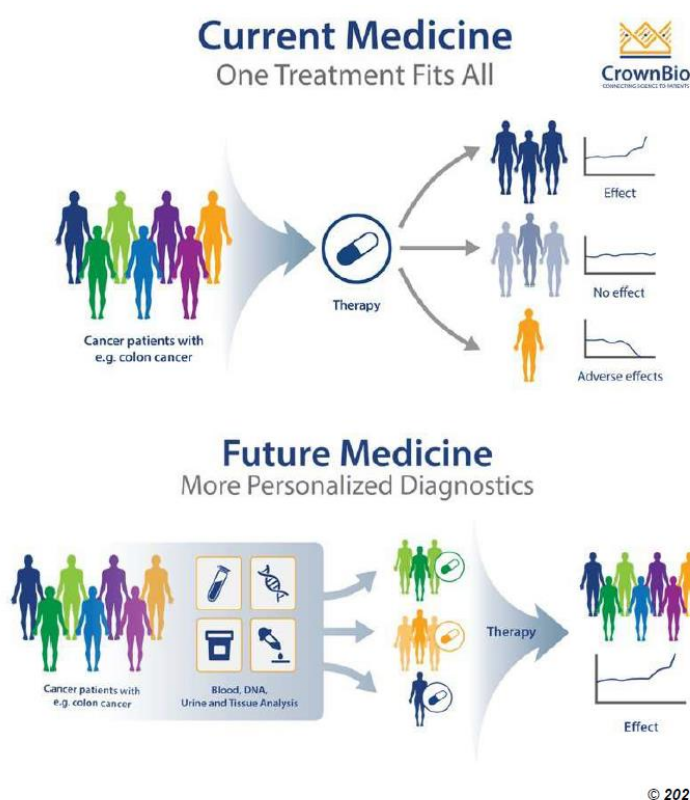
Chaque type cellulaire présente des avantages qui orientent le choix de l'utilisateur : les ASC serviront majoritairement à la production d'organoïdes utilisés pour étudier les pathologies, tandis que les organoïdes produits avec les iPSC permettront, grâce à leur proximité avec le tissu fœtal et leur profil génétique, d'étudier le développement des organes [36].

L'amélioration des techniques de culture des organoïdes, comme la culture sur des matrices extracellulaires spécifiques, sur des scaffolds réalisés à partir de polymères grâce à des techniques d'électrospinning [56], ou encore l'ajout de facteurs inducteurs [57], permet le développement *in vitro* d'organoïdes de cerveau, d'estomac, de foie, de poumons et de reins [33], parmi d'autres. Il est essentiel de reproduire le microenvironnement et les caractéristiques de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus originels pour une culture optimale d'organoïdes fonctionnels [36].

3.2. Applications des organoïdes dans le domaine biomédical

La similitude des organoïdes avec l'anatomie des organes et leur capacité à réaliser certaines activités distinctes leur ont permis d'être développés et optimisés pour diverses recherches, telles que la transplantation, la modélisation des maladies, la réalisation de traitements personnalisés ainsi que le drug screening et la réalisation de tests de toxicité [33], [40], [53], [54]. Le développement des organoïdes est un processus long, qui dure plusieurs années, et qui exige de contrôler et de reproduire

de nombreuses fois les expériences réalisées, ce qui implique du temps et des investissements. La médecine pratiquée aujourd’hui souhaite développer une médecine des « 4P » : personnalisée, préventive, prédictive et participative [58]. Le concept de cette vision est d’améliorer la prise en charge des patients afin que chaque traitement soit adapté spécifiquement à chaque patient [59]. Le développement d’organoïdes participe à cette médecine des « 4P », car l’étude et la compréhension de certaines maladies, notamment celles causées par des facteurs génétiques, comme les maladies rares, deviendront possibles grâce à la conception d’organoïdes à partir des cellules des patients. Ainsi, des traitements personnalisés seront développés car des médicaments pourront être testés sur ces organoïdes pour déterminer lesquels seront les plus adaptés aux porteurs de la maladie [33], réduisant le nombre d’effets indésirables ou l’absence d’effets (*Figure 11*) [58].



© 2021 Crown Bioscience Inc.

Figure 11 : Conséquences de la mise en place d’une stratégie personnalisée. Les traitements administrés seront adaptés aux patients et potentialiseront l’effet thérapeutique – MASTER 2 IBIS – Mezghenna 2024

Le développement d’organoïdes pour les études de drug screening améliorerait également la prédiction des réponses lors des tests réalisés, réduisant ainsi les échecs des études cliniques et l’utilisation des animaux de laboratoire. La ressemblance structurelle et fonctionnelle des organoïdes avec les tissus *in vivo* est une réussite dans de nombreux domaines, leur permettant d’être employés à différentes échelles. Parmi les organes les plus importants, le foie joue un rôle considérable dans la métabolisation des médicaments, influençant leur devenir. La connaissance de la

structure et du fonctionnement du foie, ainsi que la compréhension de ses pathologies grâce aux organoïdes, en font un modèle d'étude indispensable pour le développement de médicaments.

Partie 2 : Organoïdes de foie

La compréhension des mécanismes physiologiques du foie et de ses fonctions est essentielle pour le développement d'organoïdes utilisés dans le cadre du drug screening et des autres applications biomédicales. Le foie joue un rôle fondamental dans la métabolisation des médicaments, influençant de ce fait la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des substances actives. Par conséquent, la modélisation *in vitro* de cet organe est primordiale pour développer de nouvelles molécules thérapeutiques et réaliser des études de toxicité, d'efficacité et de sécurité. De plus, en intégrant des technologies innovantes telles que la microfluidique avec les organoïdes, les recherches sur le foie peuvent évoluer vers des méthodes d'études plus précises, efficaces et personnalisées.

Chapitre 1 : Le foie et ses pathologies

Section 1 : Anatomie et fonctions du foie

1. L'anatomie hépatique

1.1. *La structure hépatique*

Le foie, qui pèse en moyenne 1,5 kilos, est un organe interne et, plus précisément, une glande endocrine et exocrine richement vascularisée. Il est situé dans la cavité abdominale, sous le diaphragme et protégé par la capsule de Glisson. Le foie dérive de l'endoderme et appartient au système digestif. Il possède 4 lobes divisés en 8 segments, chacun composé de milliers de lobules hépatiques, représentant l'unité fonctionnelle du foie [60].

1.1.1. Organisation cellulaire

Le lobule hépatique, de forme hexagonale, est composé de différents types cellulaires qui se distinguent en deux catégories : les cellules parenchymateuses, qui constituent le tissu fonctionnel d'un organe, et les cellules non parenchymateuses, assurant l'apport sanguin, les fonctions de signalisation et d'interactions des cellules hépatiques entre elles et avec celles du système immunitaire.

Les cellules non parenchymateuses incluent, entre autres, des cellules endothéliales, mésenchymateuses et musculaires, indispensables au fonctionnement du tissu hépatique [61]. Des cellules immunitaires sont également présentes, comme les cellules de Kupffer, localisées dans les sinusoides hépatiques. Elles agissent en tant que macrophages résidents impliqués dans la défense immunitaire du foie [62], en

détectant les éléments pathogènes et en les phagocytant [63]. Dans la zone péri-sinusoïdale, les cellules étoilées, ou cellules de Ito, jouent un rôle dans le stockage de la vitamine A par le biais de gouttelettes lipidiques remplies de rétinoïdes. Ces cellules mésenchymateuses régulent également la fibrose lors d'une lésion en passant d'un état quiescent à un état actif, conduisant à une production et une sécrétion de collagène. Cette cicatrisation est essentielle mais une suractivation entraîne une fibrose hépatique [64], [65].

Les cellules parenchymateuses, quant à elles, incluent les hépatocytes et les cholangiocytes. Les hépatocytes sont les cellules majoritaires et fonctionnelles du foie, participant à de nombreuses voies métaboliques [66]. Ce sont des cellules exocrines et endocrines car elles participent au métabolisme énergétique, aux fonctions de synthèse, d'épuration et de détoxification, ainsi qu'à la production de la bile [65], [66]. La bile sera cependant transportée et excrétée par les cholangiocytes. Ces cellules, appartenant au parenchyme hépatique, forment les canaux biliaires et régulent l'osmolalité et la viscosité de la bile [67]. L'ensemble de ces voies, grâce à la synergie cellulaire, répond aux besoins énergétiques et métaboliques du corps humain.

Il existe un autre type cellulaire présent dans le foie, les cellules progénitrices hépatiques, appelées hépatoblastes. Elles sont capables de se différencier en hépatocytes ou cholangiocytes en fonction des besoins. Elles participent, tout comme les hépatocytes, à la régénération tissulaire hépatique survenant lors d'une lésion tissulaire. Lors d'une chirurgie résectrice, des signaux de lésions tissulaires (facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6)) vont être détectés par les hépatocytes sains restants qui vont proliférer et entraîner une hyperplasie afin de reconstituer le tissu hépatique manquant [61].

1.1.2. Vascularisation et innervation

Afin de répondre à ses besoins, le foie est richement vascularisé et innervé. Chaque minute, le foie est parcouru par 1,4 litre de sang. Sa vascularisation est particulière car il est nourri par une artère, l'artère hépatique, et par une veine, la veine porte. Le sang arrive dans les lobules hépatiques au niveau de l'espace porte, composé de la triade portale, elle-même constituée d'une artère, d'une veine et d'un canal biliaire. Cette triade portale se situe à chaque extrémité de l'hexagone. L'oxygène, indispensable aux cellules hépatiques, est principalement apporté par l'artère hépatique. La veine porte irrigue en majorité le foie, lui apportant les éléments provenant d'organes tels que l'estomac, les intestins, le pancréas et la rate [68]. Les éléments toxiques et

étrangers sont également apportés par la veine porte. La veine et l'artère se divisent en branches où le sang circule avant d'atteindre les sinusoides hépatiques, formant les capillaires en contact avec les hépatocytes. Les substances produites par les hépatocytes sont collectées dans le sang, qui continue son trajet dans les veines centro-lobulaires, se rejoignant pour former les veines hépatiques, avant de terminer dans la veine cave inférieure [60], [69]. La bile, quant à elle, est sécrétée par les hépatocytes dans les canaux biliaires dans le sens inverse du sang pour rejoindre le tube digestif et faciliter la digestion.

2. Les fonctions hépatiques

2.1. Stockage

Le foie est un organe essentiel pour maintenir l'homéostasie physiologique. Il joue un rôle de stockage pour les vitamines liposolubles (A, D, E et K) ainsi que pour la vitamine B12. Le temps de stockage est différent pour chacune d'entre elles, allant de quelques mois à plusieurs années pour la vitamine A. Le fer est également stocké dans le tissu hépatique au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer sous forme de ferritine. Le foie contrôle la libération du fer en fonction de sa concentration sanguine, en augmentant ou en inhibant sa libération [60].

2.2. Métabolisme protéique

En plus de ses fonctions de stockage, le foie joue un rôle crucial dans la synthèse et le maintien de l'équilibre des protéines sanguines, qui sont essentielles pour de nombreuses fonctions physiologiques. Le foie, plus précisément les hépatocytes, produit l'albumine, qui est la protéine majoritaire dans la circulation sanguine à hauteur de 50 à 60% [70]. Parmi les différentes fonctions attribuées à l'albumine, comme le maintien de la pression osmotique, ses propriétés antioxydantes ou encore anti-inflammatoires, l'albumine peut se lier de manière réversible à de nombreuses molécules exogènes et endogènes afin de les transporter dans le sang [71]. Cette dernière fonction est attribuée à sa structure, stable et souple. Des études ont souligné l'importance de cette structure car lorsqu'un patient est malade, l'albumine peut subir des modifications post-traductionnelles, telles que l'oxydation ou la glycosylation, affectant ses fonctionnalités. La structure de l'albumine est primordiale dans la fonction de transport car en se liant au récepteur néonatal (FcRn) présent à la surface des cellules épithéliales et endothéliales, le complexe formé entre l'albumine et son ligand est internalisé de manière pH dépendant dans les lysosomes. Ce processus permet non seulement le recyclage de l'albumine, mais également la libération de la molécule

pour sa dégradation [72]. L'albumine peut transporter de nombreux composés dont des hormones, des ions métalliques, des médicaments mais elle transporte notamment des acides gras libres, qui sont hydrophobes. Lors d'une atteinte hépatique, il a été mis en évidence que des modifications post-traductionnelle, en particulier les oxydations, peuvent altérer la capacité de liaison de l'albumine avec les acides gras [72], [73], [74]. Cela pourrait entraîner une augmentation des acides gras dans le sang, résultant d'une diminution de leur liaison à l'albumine, et provoquer ainsi une hypertriglycémie.

D'autres éléments sont produits par le foie, tels que la prothrombine et le facteur V, protéines impliquées dans la coagulation sanguine, ou les transaminases (ALAT et ASAT) qui catalysent des réactions métaboliques hépatiques impliquant certains acides aminés [70]. Le foie pourra également fournir de l'énergie grâce au métabolisme des acides aminés à partir des protéines dégradées. Les acides aminés pourront également servir à la production de glucose dans les tissus intestinaux et musculosquelettiques pour procurer de l'énergie [65].

2.3. Métabolisme énergétique

2.3.1. Métabolisme glucidique

Le métabolisme énergétique, comprenant le métabolisme glucidique et lipidique, est en partie régulé par des hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon. En condition physiologique, l'insuline coordonne l'entrée du glucose dans les cellules hépatocytaires, musculaires et adipeuses. Au niveau hépatique, après absorption intestinale, le foie capte le glucose alimentaire via la veine porte et le stocke sous forme de glycogène, en réponse à l'augmentation de l'insuline sécrétée par le pancréas, qui stimule la glycogénogenèse pour stocker de l'énergie (stockage au niveau musculaire également). L'insuline favorise également la glycolyse, et par conséquent, la lipogenèse *de novo* (DNL), qui correspond à la synthèse des lipides. Elle inhibe la lipolyse dans les tissus adipeux, correspondant à la dégradation des graisses, ce qui réduit la libération d'acides gras dans la circulation sanguine. À l'inverse, lors des phases de jeûne, le pancréas libère du glucagon, ce qui stimule la glycogénolyse et la gluconéogenèse dans le tissu hépatique, augmentant ainsi la production de glucose pour maintenir la glycémie. Ce processus d'équilibre est parfois altéré à la suite d'une consommation excessive d'aliments riches en sucres et en graisses, entraînant une résistance à l'insuline du foie, souvent liée au diabète de type II. En situation pathologique, la production de glucose se poursuit en raison de la

diminution de l'effet de l'insuline, contrairement à la synthèse des lipides qui n'est pas altérée. En conséquence, ces effets entraînent une hyperglycémie associée à une hypertriglycéridémie [75], [76].

2.3.2. Métabolisme lipidique

L'alimentation fournit au corps les éléments nutritifs nécessaires à son fonctionnement. Ils comprennent les protéines, les glucides et les lipides, dans lesquels nous retrouvons le cholestérol et les triglycérides. La majorité des triglycérides (95%) ont une origine alimentaire, tandis que le foie et le tissu adipeux les synthétisent à partir d'autres lipides.

De par leur nature hydrophobe, les lipides seront pris en charge dans la circulation sanguine par des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des protéines circulant dans le sang, d'origine intestinale ou hépatique, et sont classées en fonction de leur taille et de leur densité [77]. Nous distinguons cinq classes de lipoprotéines, parmi lesquelles les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), qui sont synthétisées par le foie et qui transportent les lipides du foie vers les autres tissus ; en revanche, les chylomicrons, d'origine intestinale, transportent les lipides d'origine alimentaire vers le foie [78]. Les lipoprotéines sont constituées d'un centre apolaire, contenant du cholestérol estérifié et des triglycérides, et d'une périphérie polaire, constituée de cholestérol, de phospholipides et d'apolipoprotéines (*Figure 12*). Les apolipoprotéines (Apo), qui sont des cofacteurs et des ligands d'enzymes, jouent à la fois un rôle structural et fonctionnel dans le métabolisme des lipides. L'Apo B-100 est présente dans les VLDL, et l'Apo B-48 est présente majoritairement dans les chylomicrons [77], [78].

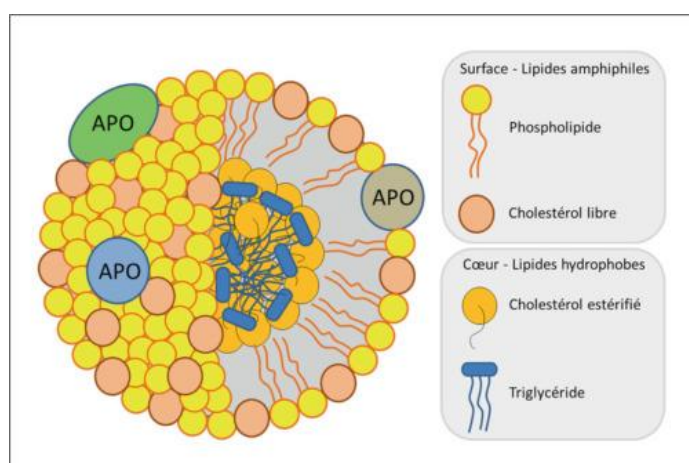


Figure 12 : Structure des lipoprotéines. APO : apolipoprotéines - Bruckert et al. 2018

Au niveau du tissu hépatique, le complexe est reconnu grâce à l'apolipoprotéine avant d'être capté puis dégradé par le foie, libérant ainsi les triglycérides dans le tissu hépatique. Les triglycérides seront distribués à d'autres tissus, notamment au muscle

pour un apport énergétique. Une partie des triglycérides produits par le foie sera destinée au tissu adipeux, où ils seront stockés dans les adipocytes. Ces derniers captent les triglycérides grâce aux VLDL, ainsi que par l'intermédiaire des chylomicrons sanguins. Les triglycérides seront ensuite dégradés en acide gras libres, pris en charge par l'albumine dans la circulation sanguine et redistribués en fonction des besoins de l'organisme. Le tissu adipeux pourra à nouveau capter ces acides gras libres pour produire des triglycérides et les stocker. Le foie, quant à lui, produira des triglycérides à partir des AG issus de la dégradation du glucose.

2.4. *Détoxification et biotransformation hépatique*

Le foie joue également un rôle dans l'épuration et la détoxification de substances d'origine endogène et exogène, car certaines d'entre elles sont nocives pour l'organisme. De nombreux mécanismes sont mis en place mais deux voies distinctes existent et dépendent de la solubilité des substances. Les composés liposolubles seront éliminés dans les selles après passage dans la bile et les intestins, tandis que les composés hydrosolubles seront éliminés dans les urines après passage dans le sang et les reins [79]. Le glutathion, un tripeptide produit par le foie, joue un rôle dans la détoxification des molécules lipophiles et des métaux lourds. En se liant par affinité au résidu cystéinyne nucléophile du glutathion, ces composés sont éliminés par voie hépatobiliaire ou par les urines [80]. En plus de ses capacités de conjugaison, il est un antioxydant neutralisant les espèces réactives de l'oxygène par réduction [81]. D'autres composés ou enzymes sont présents dans le foie pour éliminer les substances chimiques étrangères, majoritairement lipophiles [82], pour favoriser leur absorption à travers des membranes cellulaires qui sont principalement constituées de lipides. Ainsi, leur passage dans la circulation sanguine, à travers le système veineux mésentérique, est facilité au niveau du tissu intestinal.

Les médicaments administrés par voie orale vont subir un effet de premier passage hépatique en arrivant par la veine porte. Ils seront alors métabolisés par des enzymes, impactant leur biodisponibilité [83]. La biodisponibilité est un terme qui se réfère à la rapidité et à la quantité avec lesquelles un principe actif parvient à la circulation sanguine générale [84]. Elle mesure l'efficacité d'un médicament à atteindre son site d'action. Les enzymes responsables des activités de métabolisation sont des oxydases, des réductases et des hydrolases, appartenant à la famille des cytochromes P450 (CYP450), une superfamille d'enzymes monooxygénases [83]. Elles interviennent principalement dans la phase I du processus de métabolisation, où elles

ajoutent ou exposent des groupes fonctionnels, afin de rendre les molécules plus solubles. Les cytochromes P450 jouent également de nombreux rôles dans la synthèse du cholestérol, la synthèse de l'acide biliaire, etc., [85]. Durant la phase II, des transférases conjuguent les molécules à des composés hydrophiles, les rendant encore plus solubles pour faciliter leur élimination. Bien que les deux phases puissent être indépendantes, leur objectif commun est de transformer les substances lipophiles, comme les médicaments, en composés hydrophiles [82], [83], [84], [86]. Le métabolisme de certains médicaments est dépendant des CYP450. Ces substances subiront un effet de premier passage hépatique plus important que d'autres molécules, conduisant à une augmentation de leur clairance et, par conséquent, à une diminution de leur fraction biologiquement active [83] pour certaines d'entre elles.

Les substances générées lors de la métabolisation sont appelées métabolites. Ces composés peuvent parfois avoir une activité supérieure à celle du composé d'origine, ce qui est le cas des promédicaments, ou provoquer des effets indésirables [86]. Il est important de comprendre la pharmacocinétique d'un médicament en cours de développement, car il interagit avec de nombreuses molécules, protéines et enzymes susceptibles d'altérer ses propriétés physico-chimiques. La formulation du médicament est également essentielle pour optimiser, par exemple, son absorption intestinale car elle sera sensible au pH, à la présence du bol alimentaire, à la constitution des membranes épithéliales, etc. [87]. En cas d'altérations génétiques touchant les enzymes de la métabolisation, comme les CYP450, une augmentation ou diminution de l'activité enzymatique peut favoriser des métabolismes ultra-rapides ou lents. Ces altérations modifient de manière significative la biodisponibilité des médicaments et leurs effets, pouvant également provoquer des variations dans l'apparition des effets indésirables [88].

Le foie joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'organisme et le maintien de son équilibre. En cas de pathologie, des dysfonctionnements peuvent entraîner des répercussions importantes, affectant de nombreux processus physiologiques et détériorant l'état de santé du patient. Sur le plan pharmacologique, après l'administration orale d'un médicament, l'altération de certaines fonctions peut entraîner une diminution de l'effet thérapeutique du principe actif, que ce soit par des modifications de son métabolisme hépatique ou par une augmentation de la concentration sanguine due à un transport inefficace, augmentant ainsi le risque d'effets indésirables. Ces altérations peuvent ne pas être perçues lors des essais

précliniques sur les animaux, mais elles pourraient être étudiées sur des organoïdes de foie modélisant des pathologies hépatiques. L'utilisation d'organoïdes dérivés de cellules humaines représente un intérêt majeur dans les études de drug screening. Elle permet de modéliser des variations interindividuelles et intraindividuelles, pouvant améliorer la prédictibilité des études précliniques et contribuer à un avancement plus rapide et sécurisé des traitements thérapeutiques, contrairement aux animaux, qui ont montré leurs limites.

Section 2 : Atteintes hépatiques

1. Maladie commune à haute prévalence : la MAFLD

1.1. Présentation de la pathologie

1.1.1. Définition et épidémiologie

La maladie du foie gras ou stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), renommée dysfonctionnement métabolique associé à une maladie hépatique stéatosique (MAFLD) [89], est à distinguer de la stéatose hépatique alcoolique. La MAFLD, qui correspond à une accumulation de graisse dans le foie sans lien avec une consommation d'alcool, représente la principale maladie hépatique à l'échelle mondiale. Sa prévalence mondiale est estimée à un milliard de personnes [90]. Cette pathologie atteint principalement les personnes obèses et diabétiques. En France, en 2019, à la suite de l'étude de cohorte CONSTANCES, où 16,7% de la population incluse présentait une MAFLD, les statistiques ont montré qu'elle touchait 79,7% des personnes obèses et 63% des personnes diabétiques. Cette pathologie a tendance à plus s'exprimer chez les hommes (24,6%) vieillissants (36,2% des hommes âgés de 68 à 78 ans) que chez les femmes (10,1%) [91]. Aux États-Unis, 42,7% des adultes sont classés comme obèses en 2021 [92], dont 90% sont atteints de la MAFLD. Au total, 24% des adultes américains sont atteints de cette pathologie [93]. Les enfants sont également de plus en plus touchés, ce qui inquiète les autorités compétentes [93]. La répartition de la maladie est mondiale et sa prévalence mondiale ne cesse d'augmenter. Elle est intrinsèquement liée à l'accélération du nombre de cas de diabète de type II et de personnes en situation de surpoids et d'obésité [94], [95], (*Figure 13*).

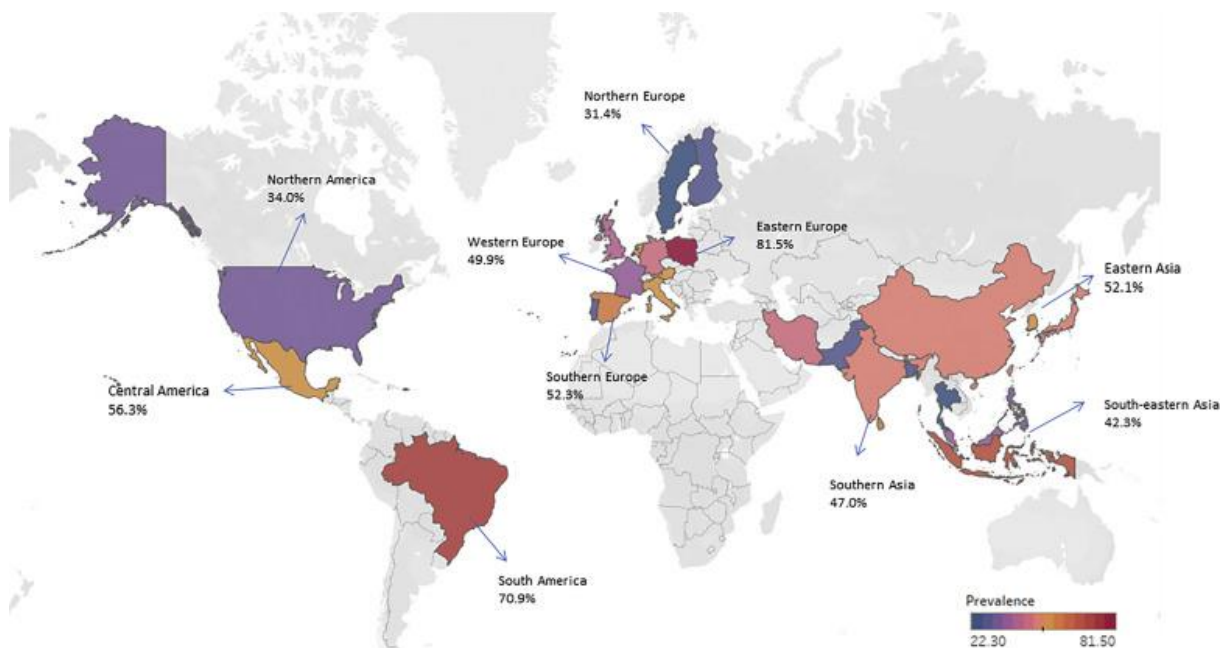


Figure 13 : "Prévalence mondiale de la MAFLD chez les adultes en surpoids ou obèses de la population générale" - Liu et al. 2022

1.1.2. Les causes

1.1.2.1. Facteurs épigénétiques et génétiques

La répartition mondiale de la prévalence de la MAFLD varie en fonction de l'industrialisation des pays [91]. Elle est étroitement liée à une alimentation déséquilibrée, riche en viande transformée, sucre et graisses, ainsi qu'à une activité physique insuffisante. Elle favorise la prise de poids [96] et l'apparition de maladies métaboliques et d'hypertension. Certaines maladies psychiatriques, comme la bipolarité et la schizophrénie, ainsi que des troubles anxieux-dépressifs, favoriseraient son développement [97].

En plus des facteurs épigénétiques, des facteurs génétiques régulent la MAFLD. La transmission héréditaire de mutations concernant le gène *TM6SF2* entraîne une augmentation de la concentration lipidique hépatocytaire causée par une diminution de l'expression des VLDL. Des études menées avec des sphéroïdes 3D (agrégats cellulaires en forme de sphère, moins complexes que les organoïdes) construits à partir d'hépatocytes humains primaires, prouvent que les individus présentant la mutation du gène *TM6SF2* expriment de manière plus forte les gènes impliqués dans la synthèse des lipides, du cholestérol et du glucose [98].

Les microARN sont des petits ARN endogènes non codants, régulant l'expression génique d'autres gènes impliqués dans différentes voies, dont celles de la MAFLD [97]. Ils empêchent ainsi la traduction ou favorisent l'instabilité des gènes [98]. La présence de microARN, tels que le miR-34a, module des gènes liés au métabolisme lipidique et

favorise l'accumulation des lipides dans le foie [98]. En étant libérés dans le sang, ces microARN peuvent également servir de marqueurs : une augmentation des taux circulants de miR-122 signe la présence d'une MAFLD [98], [99].

1.1.2.2. Facteurs métaboliques

La MAFLD est caractérisée par une accumulation excessive de lipides, principalement des triglycérides, dans le cytoplasme des hépatocytes (supérieure à 5%) [100]. Cette pathologie est fréquemment perçue comme une expression hépatique du syndrome métabolique, mais elle résulte d'au moins deux facteurs métaboliques interdépendants : l'obésité abdominale (tour de taille supérieur à 94 cm chez l'homme, 80 cm chez la femme [101]), le diabète de type 2, et le syndrome métabolique comprenant l'hypertension et les dyslipidémies [89]. Toutes ces maladies ont un point commun : le dysfonctionnement métabolique. De nombreuses études ont montré que le dysfonctionnement métabolique et l'insulinorésistance jouaient un rôle important dans le développement de la MAFLD.

1.2. La physiopathologie

Comme présenté précédemment, l'insuline coordonne l'entrée du glucose dans les cellules hépatocytaires, musculaires et adipeuses. Elle favorise l'utilisation intracellulaire du glucose : l'insuline stimule la glycogénogenèse dans le foie et les muscles, favorisant la conversion du glucose en glycogène pour le stockage de l'énergie et favorise la glycolyse et la lipogenèse. Elle inhibe la dégradation des graisses dans le tissu adipeux, ce qui réduit la libération d'acides gras dans la circulation sanguine. Toutefois, lors d'une alimentation riche en calories, la réponse des récepteurs à l'insuline est diminuée à cause de l'accumulation d'acides gras libres et d'autres produits qui interfèrent avec l'insuline, entraînant une diminution de sa réponse intracellulaire. L'insulinorésistance est un état complexe par lequel le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux deviennent moins sensibles à l'insuline et à ses effets métaboliques. Elle est influencée et aggravée par plusieurs facteurs, notamment l'obésité, l'hypertension, l'hyperglycémie, le syndrome métabolique, ainsi que le diabète de type 2.

1.2.1. Le tissu adipeux

Au niveau du tissu adipeux, où le stockage des lipides se fait sous forme de triglycérides, la capacité de l'insuline à inhiber la dégradation des graisses est altérée, entraînant une libération excessive d'acides gras libres [95]. La libération d'acides gras par les adipocytes dysfonctionnels devenus résistants à l'insuline participe à la

lipotoxicité tissulaire [95]. Le glucose ne pénètre plus dans les adipocytes car l'insuline ne stimule plus la translocation du transporteur intracellulaire du glucose, GLUT4, au niveau de la membrane cellulaire des adipocytes, empêchant le glucose d'être capté [102]. Ainsi, le glucose n'est également plus stocké, ce qui entraîne une augmentation de sa concentration sanguine : développement d'une hyperglycémie associée à une hypertriglycémie.

À la suite du développement pathologique du tissu adipeux, les macrophages pro-inflammatoires s'activent et produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α). Le taux de cytokines augmente et favorise à la fois la résistance systémique à l'insuline et la lipolyse des adipocytes [95]. De plus, le tissu adipeux augmente la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6) conduisant à une résistance à l'insuline au niveau hépatique, engendrée par une dégradation de molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline [95].

1.2.2. Le foie

1.2.2.1. Impact lipidique

Le foie capte le glucose et les acides gras en provenance du tissu adipeux et du muscle squelettique, grâce aux transporteurs GLUT2 et CD36 respectivement. Les acides gras libres diffusent à travers le tissu hépatique par diffusion passive simple, mais leur entrée dans les hépatocytes est favorisée par la présence de transporteurs [103]. L'expression de CD36 est augmentée lors d'une surcharge lipidique [95], ce qui entraîne une augmentation intracellulaire d'acides gras libres. La surexpression de CD36 contribue à la diminution de la β -oxydation des acides gras dans les mitochondries et à une diminution de l'autophagie (dégradation d'organites intracellulaires ou de composés cellulaires indésirables pour le maintien de l'homéostasie par la voie lysosomale) [103]. Ce déséquilibre contribue à l'accumulation progressive de lipides dans les hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique (RE), conduisant au stress du RE. En plus d'augmenter les risques de mort cellulaire et d'inflammation, le stress du RE contribue

à la biosynthèse des lipides par activation de SREBP1c, jouant le rôle de facteur de transcription pour activer des gènes lipogéniques (Figure 14) [95], [104].

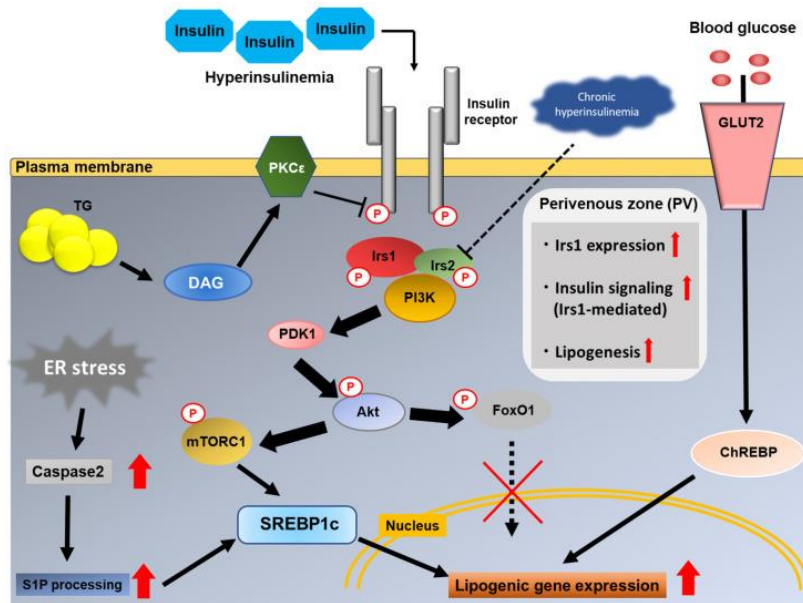


Figure 14 : Effet de l'insuline - facteurs responsables de l'augmentation de gènes lipogéniques. L'insuline se lie aux récepteurs entraînant une autophosphorylation des récepteurs. Irs1/Irs2 vont être également phosphorylées après leur amarrage. La voie de signalisation PI3K/Akt est activée, suivi de mTORC1 activant lui-même SREBP1c (qui nécessite l'inhibition concomitante de FoxO1). Le glucose active ChREBP. Ces deux processus conduisent à l'augmentation de l'expression de gènes lipogéniques. Malgré le fait que Irs2 soit inhibée par l'hyperinsulinémie, l'expression élevée de Irs1 dans la zone péri-veineuse, siège de la lipogenèse, permet d'augmenter le signal insulinémique et par conséquent, d'augmenter la lipogenèse [95] - Sakurai et al. 2021

Dans ce contexte de résistance à l'insuline, le foie continue à produire du glucose mais également des triglycérides par la synthèse *de novo*, tout en réduisant sa capacité à les détruire. L'afflux d'acides gras libres provenant du tissu adipeux et la synthèse hépatique d'acides gras favorisent la lipotoxicité. Cette lipotoxicité conduit à la progression de la stéatose hépatique avec pour conséquence une augmentation de la mort cellulaire, de l'inflammation tissulaire et du développement de la fibrose (Figure 15) [103].

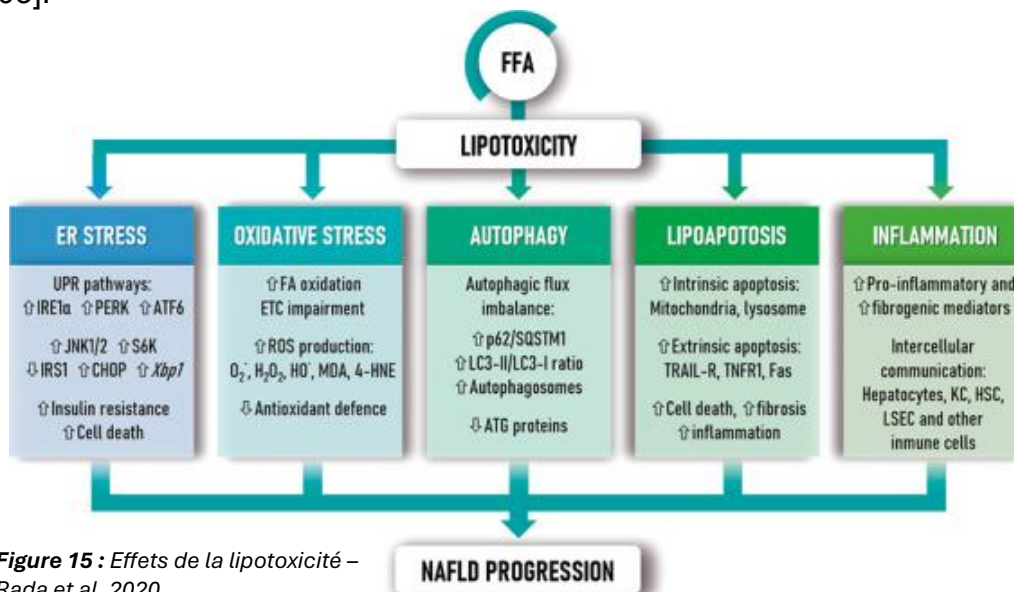


Figure 15 : Effets de la lipotoxicité – Rada et al. 2020

1.2.2.2. Inflammation

Dans les conditions physiologiques, les mitochondries réalisent la β -oxydation pour produire de l'ATP ou des corps cétoniques à partir de la dégradation des acides gras. Cependant, lors d'une surcharge lipidique des hépatocytes, le fonctionnement mitochondrial est altéré [105], entraînant un stress oxydatif et une inflammation [95]. Lors de la MAFLD, la saturation de la β -oxydation des acides gras conduit à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), favorisant le stress oxydatif. Cette augmentation des ROS n'est plus contrôlée car l'activité des enzymes oxydantes est diminuée [103]. De plus, les mitochondries dans les hépatocytes sont surchargées en calcium. Ces trois processus participent à l'activation de la kinase N-terminale c-Jun (JNK), qui déclenche des voies de signalisation responsables de la production de ROS et accentue le dysfonctionnement mitochondrial. Ces conséquences aggravent la stéatose et favorisent l'inflammation hépatique (*Figure 16*) [100], [106].

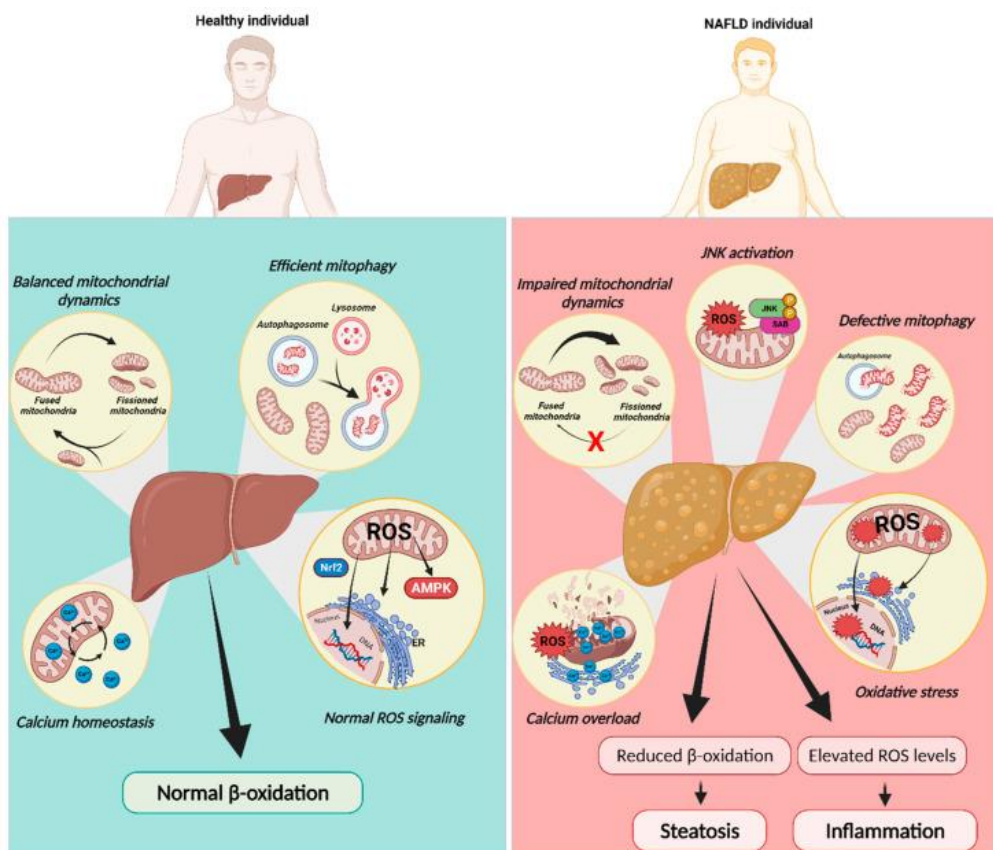


Figure 16 : Comparaison du mécanisme mitochondrial dans un foie sain et atteint de MAFLD – Amorim et al. 2023

À la suite de ces réactions et de l'augmentation des ROS, une réponse inflammatoire se met en place, impliquant l'activation des macrophages. Les hépatocytes endommagés libèrent des motifs moléculaires associés au danger (DAMP) qui, tout comme les ROS, activent les cellules de Kupffer, macrophages résidents du tissu

hépatique [103], [107]. En réponse, les cellules de Kupffer activées sécrètent des chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α) pour recruter des cellules du système immunitaire inné, comprenant des neutrophiles, des cellules naturelles tueuses, mais également des monocytes pouvant se différencier en macrophages [100], [108]. Le recrutement de ces cellules entraîne la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, aboutissant à l'augmentation de lésions tissulaires ainsi qu'à la mort des hépatocytes avec un renforcement du phénotype pro-inflammatoire des cellules immunitaires, malgré la présence d'un pool de cellules possédant un phénotype anti-inflammatoire [100].

1.3. L'évolution clinique et la prise en charge

Lorsqu'il y a une inflammation, nous parlons de dysfonctionnement métabolique associé à une stéatohépatite (MASH), qui peut progresser vers une fibrose hépatique. Le développement de la fibrose est dû à l'activation des cellules étoilées hépatiques en réponse au TGF- β , libéré par les cellules de Kupffer et les macrophages [109] en raison des lésions chroniques. L'activation des cellules étoilées conduit à une accumulation de tissu cicatriciel [64]. Si cette inflammation et cette fibrose persistent, elles peuvent évoluer. Au-delà, le risque est que la fibrose se transforme en cirrhose avant de se développer en un cancer hépatocellulaire (*Figure 17*) [100].

Les premiers signes de la MAFLD correspondent à l'accumulation de graisse dans le tissu hépatique. À ce stade, une gestion efficace des facteurs de risque permet de traiter le foie, comme l'introduction d'un régime alimentaire moins riche et d'une activité physique quotidienne. Il est également possible de prescrire des traitements ciblant d'autres facteurs métaboliques comme l'hypertriglycémie ou le diabète. Toutefois, la maladie peut progresser vers une stéatohépatite lorsque des dommages au foie surviennent à cause de l'inflammation, de l'accumulation de stress oxydatif ou encore de l'apoptose cellulaire.

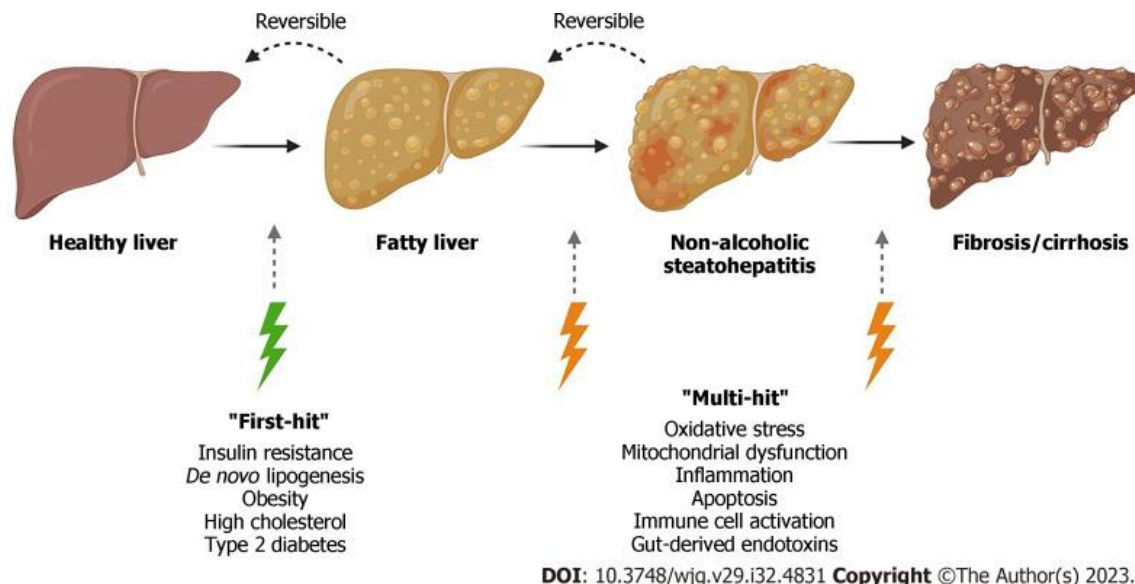


Figure 17 : Progression de la stéatose hépatique non alcoolique - Petagine et al. 2023

La MAFLD est une pathologie mondiale en pleine émergence, étroitement liée à d'autres pathologies, impliquant des dysfonctionnements dans le métabolisme des graisses, la résistance à l'insuline, l'inflammation chronique et le stress oxydatif. La complexité de son mécanisme pathologique rend difficile le développement de traitements efficaces. L'utilisation d'organoïdes permettrait de modéliser la MAFLD et d'analyser les dysfonctionnements métaboliques hépatiques dans le cadre des études de toxicité, d'efficacité et de sécurité, favorisant la découverte de molécules efficaces. De plus, la modélisation d'organoïdes multi-tissulaires ou multi-organes faciliterait la compréhension du fonctionnement des organes, comme le foie, ainsi que les interactions entre les différents tissus dans le cadre de pathologies.

2. Autres maladies

2.1. Autres maladies hépatiques

Le foie, organe exerçant de multiples fonctions indispensables au maintien de l'équilibre physiologique corporel, est une cible vulnérable au développement de nombreuses maladies. Il peut être affecté par des pathologies telles que les cancers, les hépatites d'origine virale (A, B, C, D et E) ou médicamenteuse qui peuvent être fulminantes, ou par des hépatites auto-immunes [110], [111].

2.2. Maladies monogéniques

Des maladies monogéniques peuvent se développer à la suite de mutations perturbant les fonctions biologiques hépatiques. Les maladies rares les plus courantes concernent des pathologies telles que la maladie de Wilson, le déficit en alpha-1 antitrypsine et le syndrome d'Alagille. La maladie de Wilson correspond à une

accumulation de cuivre dans le foie qui peut ensuite s'étendre à d'autres organes comme le cœur, le pancréas ou le cerveau [112]. Sa prévalence estimée à la naissance se situe entre 1/30 000 à 110 000 dans le monde [113]. Le déficit en alpha-1 antitrypsine est une maladie entraînant des problèmes respiratoires et hépatiques. Sa prévalence à la naissance est estimée entre 1/1 600 à 5 000 en Europe occidentale et aux États-Unis [114]. Enfin, le syndrome d'Alagille, causé par des mutations dans certains gènes, notamment le gène JAG1 et le gène NOTCH2, se traduit par une cholestase néonatale [115]. Sa prévalence est estimée à 1/70 000 naissances [116].

Ainsi, la modélisation de pathologies monogéniques hépatiques grâce aux organoïdes peut également permettre une meilleure compréhension des mécanismes biologiques, mais surtout permettre l'amélioration ou le développement de nouvelles thérapies.

Chapitre 2 : Organoïdes hépatiques

En raison du nombre élevé d'échecs des études de phase cliniques ces dernières années, il est primordial d'identifier et d'éliminer les candidats médicaments peu prometteurs. Pour y parvenir, il est nécessaire de développer des outils de dépistage *in vitro* qui sont à la fois représentatifs de la physiologie humaine, fiables et reproductibles. Depuis quelques années, de nouvelles technologies se développent et sont améliorées pour permettre de réaliser des études visant à prédire la toxicité, l'efficacité et la sécurité des substances actives : les organoïdes. À partir de cellules souches humaines, nous sommes capables de produire des structures tridimensionnelles d'organes *in vitro*, possédant des fonctions physiologiques similaires à celles retrouvées *in vivo*. Il existe différents types d'organoïdes en fonction des besoins des recherches et des capacités de production. Des organoïdes microfluidiques ont été développés et apportent une amélioration considérable dans l'organisation et la fonctionnalité des cellules cultivées dans ces structures.

1. Modélisations hépatiques et drug screening : les différents types d'organoïdes

Pour rappel, les organoïdes sont des structures tridimensionnelles cultivées *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes, embryonnaires ou adultes, capables d'imiter la complexité anatomique et fonctionnelle des organes humains, tout en reproduisant leurs caractéristiques et fonctions physiologiques [53]. En raison des différences génétiques et physiologiques, il est difficile de développer un modèle animal reproduisant avec précision les pathologies humaines. De plus, l'utilisation des

cultures 2D pose des problèmes concernant la prolifération et le maintien des altérations génétiques au cours des différents passages. Par conséquent, il serait préférable de développer des modèles d'organoïdes humains capables de refléter la physiopathologie afin de les utiliser pour des études de drug screening.

Actuellement, il est possible de développer différents types d'organoïdes avec différents degrés de complexité. Des organoïdes de types monocellulaires peuvent être développés à partir de cellules prélevées sur le foie malade ou grâce à la différenciation des iPSC du patient. La production d'organoïdes contenant plusieurs types cellulaires, appelés multi-tissulaires, est possible grâce à l'utilisation des iPSC et à l'induction de voies de différenciation si besoin. Enfin, il est possible de réaliser des co-cultures de différents organes entre eux grâce au développement d'organes sur puces (*Figure 18*) [117].

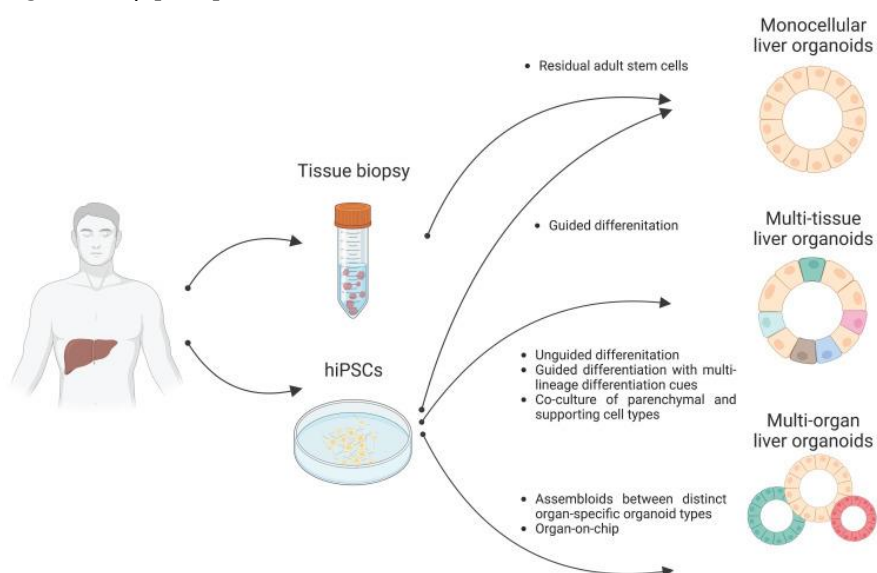


Figure 18 : Les différents types d'organoïdes hépatiques - Han et al. 2023

Il existe différents types cellulaires possibles pour la culture d'organoïdes : les cellules souches embryonnaires, les cellules pluripotentes induites, les cellules souches adultes ou les cellules primaires [118]. Une fois isolées, les cellules souches sont cultivées dans des milieux spécifiques, enrichis en facteurs de croissance, afin de guider les cellules vers certaines voies de différenciation.

1.1. Organoïdes monocellulaires

Les organoïdes monocellulaires sont constitués d'un seul type cellulaire. Cette structure ne reflète pas de manière idéale l'architecture d'un foie *in vivo* mais peut être utilisée comme modèle hépatique pour des études d'efficacité et de toxicité de nouvelles substances pharmaceutiques. Ces substances peuvent cibler la DNL ou la

production de ROS, entraînant un stress oxydatif [117]. Diverses études sont menées actuellement, ciblant des enzymes ou des facteurs de transcription impliqués dans la DNL, constituant un des principaux facteurs de la MAFLD [117].

Hendriks et al. ont développé quatre modèles différents d'organoïdes monocellulaires à partir d'hépatocytes foetaux humains pour reproduire le premier stade de la MAFLD, la stéatose. Le premier modèle reproduit la stéatose par accumulation d'AGL, tandis que les trois autres ont été modifiés soit par prime editing, soit par CRISPR-Cas9. L'un possède une variante génétique possédant un risque accru de MAFLD, *PNPLA3*, tandis que les deux autres modèles présentent des troubles lipidiques monogéniques causés par un knock out des gènes *APOB* et *MTTP* (Figure 19) [119]. Cette étude a mis en évidence la capacité des organoïdes à modéliser des pathologies humaines et leur capacité à être utilisés dans des études de drug screening.

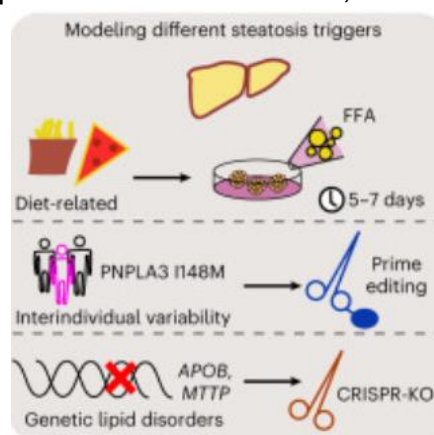


Figure 19 : Stratégies de développement des organoïdes de foie - Hendricks et al. 2023

1.1.1. Organoïdes reproduisant des fonctions biologiques *in vitro*

Les deux troubles lipidiques, nommés hypobétalipoprotéinémie familiale et abétalipoprotéinémie (forme sévère de l'hypobétalipoprotéinémie), entraînent des altérations dans le mécanisme de synthèse, de sécrétion ou de catabolisme des lipoprotéines contenant l'ApoB, impactant ainsi les LDL (lipoprotéines de basse densité), les VLDL et les chylomicrons [120]. Les organoïdes mutés ont montré une accumulation immédiate de lipides sans stimulation externe. L'analyse moléculaire a mis en évidence que cette accumulation était due à un défaut de sécrétion lipidique, causé par une absence de VLDL. De plus, les organoïdes possédaient des gouttelettes lipidiques très abondantes et une stéatose (~ 30%). Cette stéatose était absente dans les organoïdes sauvages. Pour expliquer cette accumulation de lipides, les soupçons des chercheurs se sont portés sur la DNL et le rôle du glucose (présent dans le milieu de culture). Ils ont réalisé des traçages isotopiques avec du glucose marqué afin de savoir si la DNL était responsable de l'accumulation de lipides. Ils ont ainsi prouvé que le glucose était la principale source d'acides gras synthétisés dans les organoïdes *APOB* et *MTTP* mutés [119]. Cette étude prouve que les organoïdes

sont capables de reproduire des mécanismes cellulaires retrouvés *in vivo* dans des modèles *in vitro*, ici la DNL. De plus, Hendriks et al. ont démontré le potentiel des organoïdes à être cultivés sur une longue période (Figure 20) [119].

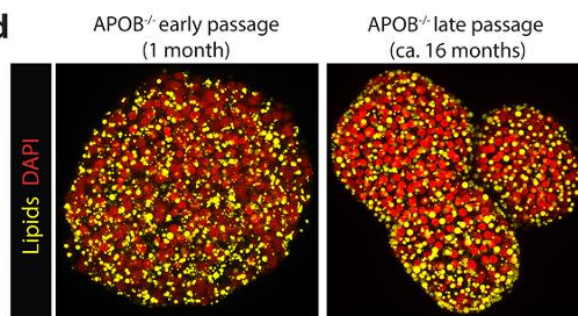


Figure 20 : Coloration d'une lignée d'organoïdes mutés *APOB* par le rouge Nil à différents temps : 1 mois et 16 mois. Lipides colorés en jaune et noyaux cellulaires au DAPI - Hendricks et al. 2023

1.1.2. Organoïdes prouvant les limites des modèles animaux

Les chercheurs ont modélisé des organoïdes sauvages, hétérozygotes et homozygotes pour le variant I148M du gène *PNPLA*. Ils ont également produit des organoïdes knock out pour ce variant grâce à CRISPR-Cas9. Les analyses ont mis en évidence que le modèle homozygote muté présentait une stéatose plus sévère que le modèle hétérozygote ou sauvage, qui, lui, n'accumulait pas de lipides dans des conditions normales. De plus, le modèle homozygote a accumulé de manière significative plus de lipides (5% de stéatose) que le modèle hétérozygote (2%). Cela montre que le génotype *PNPLA3* joue un rôle dans le développement de la MAFLD en altérant le métabolisme lipidique.

En parallèle, l'analyse du knock out du gène *PNPLA* a montré que l'absence de la protéine conduisait à une stéatose hépatique plus sévère que dans les autres organoïdes et à une accumulation lipidique plus élevée (8% de stéatose). La protéine *PNPLA* serait par conséquent impliquée dans le métabolisme lipidique et une mutation sur le variant I148M conduirait potentiellement à une altération entre la synthèse et la dégradation de lipides ou à un problème de sécrétion/dégradation lipidique [119]. Ce fait contredit des études similaires qui ont été réalisées chez des souris. L'une de ces études a mis en évidence que la déplétion totale en *PNPLA* réduisait la stéatose, l'inflammation et la fibrose hépatique chez la souris. Il a ainsi été suggéré que la suppression de l'expression de la protéine serait bénéfique chez les patients humains porteurs de la MAFLD [121].

Grâce à l'utilisation des organoïdes humains, Hendricks et al. ont mis en évidence d'une part, que la déplétion en *PNPLA* aggrave le phénotype stéatosique chez l'Homme, et, d'autre part, qu'il existe des différences réelles interspèces dans la métabolisation hépatique. En effet, la perte de la protéine favorise le métabolisme du rongeur alors qu'elle est délétère pour le métabolisme humain. Cette étude souligne le potentiel des organoïdes humains dans les études de drug screening, car les

modèles animaux ne sont pas toujours fiables pour modéliser des pathologies humaines.

1.1.3. Organoïdes pour le drug screening

Par la suite, des recherches ont été menées sur des traitements en cours d'essais et sur les nouvelles cibles potentielles identifiées. Ils ont choisi 17 médicaments candidats ciblant la MAFLD et ont traité les différents modèles d'organoïdes avec. Pour souligner les effets de la diminution de la stéatose, ils ont analysé les gouttelettes lipidiques au rouge du Nil en fonction de leur fluorescence, puis ils ont évalué l'efficacité des traitements par une analyse des scores lipidiques (*Figure 21*) [119].

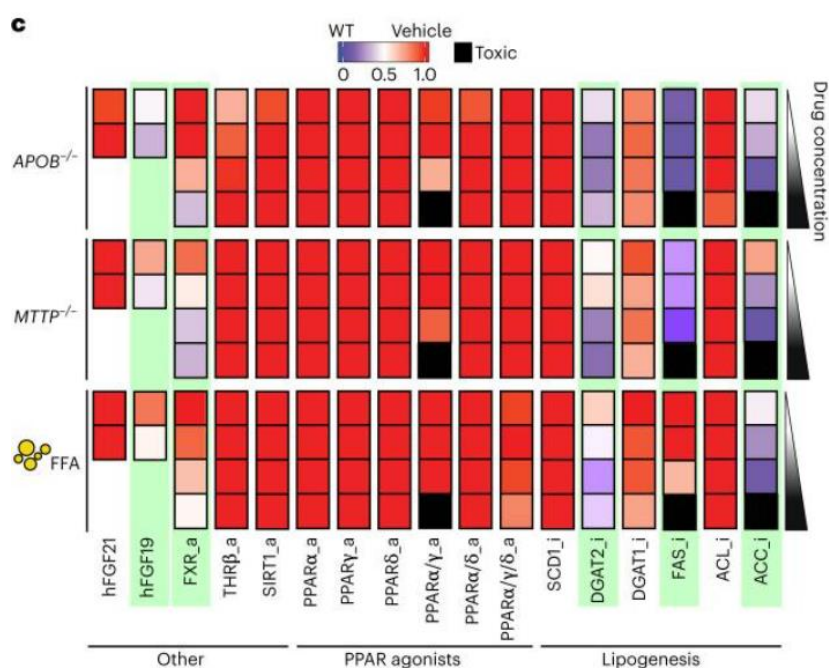


Figure 21 : Analyses des scores lipidiques des différents types d'organoïdes après traitements avec des médicaments, évaluation dose dépendante - Hendricks et al. 2023

Après avoir réalisé un criblage de plusieurs candidats médicaments sur les quatre types d'organoïdes, ils ont observé des réponses similaires en fonction de la dose, permettant d'identifier les médicaments capables de réduire la stéatose. Les plus efficaces inhibent la DNL, de manière directe en ciblant des enzymes clés de la lipogenèse, notamment l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la diacylglycérol acyltransférase-2 (DGAT2) et l'acide gras synthase (FAS) [117], [119]. Ces inhibiteurs entraînent des changements transcriptionnels, par exemple avec une diminution de l'expression des gènes liés à la production d'énergie (glycolyse et gluconéogenèse) afin de s'adapter à l'accumulation d'acétyl-CoA (produit de la dégradation des glucides et acides gras). Cependant, les organoïdes ont compensé en augmentant l'expression des gènes impliqués dans la production de graisses, et la prolifération des cellules

hépatiques a diminué, altérant la régénération cellulaire et signalant de potentiels effets indésirables [119].

D'autres traitements sont efficaces par des actions indirectes sur la DNL, comme un agoniste du récepteur Farnésoïde X (FXR) et le hFGF19 recombinant [117], [119]. Les deux molécules sont liées à l'activation du FXR. Une fois activé, le récepteur entraîne la production de FGF19, régulant le métabolisme lipidique et glucidique. Les deux traitements ont diminué l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse, la glycolyse et la gluconéogenèse. Cependant, des effets indésirables sont apparus avec un remodelage de la MEC médié par TGF- β , conduisant à une transition épithélio-mésenchymateuse. Ce changement est potentiellement responsable de l'apparition de cancer [119].

Ils ont également étudié l'influence de la mutation du variant I148M du gène *PNPLA* dans la réponse aux traitements. Ils ont ainsi observé une diminution de l'efficacité de l'agoniste FXR et du hFGF19 recombinant, indiquant que les facteurs génétiques peuvent moduler la réponse aux traitements [119]. Ces variabilités génétiques, influençant la réponse des traitements, ont été prouvées dans le foie [122] et sont en cours d'études pour d'autres pathologies, comme pour le cancer du sein [123].

Cette étude, dans sa globalité, met bien en évidence le potentiel des organoïdes pour la modélisation de pathologies humaines. Leurs capacités à reproduire des fonctions biologiques *in vitro* plus proches de la physiologie humaine, et plus précises que les modèles animaux, en font des outils prometteurs pour les études de drug screening. Ils seraient ainsi utilisés pour détecter les traitements efficaces et les effets indésirables. Les études de toxicité et de sécurité effectuées en amont des phases précliniques permettraient réellement de diminuer le nombre d'échecs dans les phases cliniques.

1.2. *Organoïdes multi-tissus*

L'objectif des organoïdes multi-tissus est de développer des organoïdes possédant différents types cellulaires ayant chacun des rôles différents, mais coexistant dans la même entité.

1.2.1. Le cas de la MAFLD

Le développement de la MAFLD repose sur l'interaction de nombreux types cellulaires. La création d'organoïdes multi-tissulaires ou multi-organes s'avère par conséquent plus pertinente pour les études de criblage de médicaments. Bien que l'utilisation de

modèles animaux ait contribué à une meilleure compréhension de la MAFLD au cours des dernières décennies, de nombreux médicaments ciblant l'inflammation (via l'inhibition de l'inflammasome), le métabolisme cellulaire (inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase), ou la mort cellulaire (antioxydants) n'ont pas tous abouti à une commercialisation [124].

Ouchi et al. ont réussi à développer des organoïdes hépatiques pour modéliser la MAFLD à partir des iPSC humaines [125]. Un des atouts des iPSC est leur capacité à se différencier en une grande diversité de lignées hépatocytaires, permettant ainsi l'étude de différentes lignées génétiques et épigénétiques, modulant diverses pathologies. De plus, la sensibilité des iPSC aux médicaments est similaire à celle des hépatocytes humains [126]. Cependant, leur utilisation comporte des limites, notamment l'instabilité génétique, modulant leurs capacités [126], [127]. Les protocoles de reprogrammation peuvent également favoriser l'apparition de nouvelles variations génétiques [127].

En s'appuyant sur l'organogenèse du foie, les organoïdes produits en une vingtaine de jours ont développé des cellules épithéliales mais également mésenchymateuses. Parmi ces cellules, des cellules stellaires hépatiques et des cellules de Kupffer impliquées dans le développement de la maladie se sont développées. Un séquençage de l'ARN unicellulaire a été réalisé afin de s'assurer de la présence des différents types cellulaires. Ainsi, cinq types cellulaires ont été identifiés dont les cellules stellaires et de Kupffer, des cellules fonctionnelles hépatocytaires et cholangiocytaires, ainsi que des cellules présentant des marqueurs biliaires. Pour vérifier la correspondance de ces organoïdes avec les hépatocytes primaires, un séquençage de l'ARN a été effectué. Ce dernier a révélé que les gènes liés au métabolisme des lipides dans les organoïdes produits présentaient des similitudes significatives avec ceux des hépatocytes primaires. De plus, les chercheurs ont constaté que la stimulation des différents types cellulaires permettait d'affirmer la fonctionnalité de leurs organoïdes, notamment avec l'activité du CYP450 3A4, essentielle au métabolisme des médicaments *in vivo*. Des organoïdes traités par de la rifampicine ont mis en évidence une activité 9,88 fois supérieure à celles des organoïdes non traités [125]. De plus, la mise en contact des organoïdes avec des acides gras libres, comme l'acide oléique, a induit l'accumulation de lipides dans les gouttelettes lipidiques et le gonflement des hépatocytes. Les analyses ont permis également de détecter une production de triglycérides dans les hépatocytes.

L'augmentation de cytokines inflammatoires liées aux cellules de Kupffer a engendré le développement de l'inflammation et de la fibrose, dus à l'activation des cellules stellaires. Le développement de la stéatose, associé à la présence de l'inflammation et de la fibrose, a ainsi pu être modélisé [125], [128]. Cette étude démontre encore une fois la capacité des organoïdes à modéliser des pathologies humaines, à reproduire des fonctions physiologiques et à en suivre l'évolution.

1.2.2. Cas des maladies rares

1.2.2.1. La maladie de Wolman

Il est possible de modéliser des maladies rares atteignant le foie grâce aux organoïdes. La maladie de Wolman est une « maladie rare de surcharge lysosomale autosomique récessive caractérisée par une accumulation progressive d'esters de cholestérol et de triglycérides dans le foie, la rate et d'autres organes » [129]. Elle est causée par un déficit en lipase acide lysosomale (LAL) résultant d'une mutation sur le gène *LIPA*, ce qui entraîne une accumulation lipidique lysosomale [130]. Cette mutation cause de nombreux troubles comme des dyslipidémies, une fibrose ou encore une atteinte des glandes surrénales, car l'enzyme joue un rôle important dans la dégradation des triglycérides et des esters de cholestérol. L'espérance de vie est très courte, inférieure à un an, en raison d'une mauvaise absorption, d'une malnutrition ou d'une insuffisance hépatique [131].

Ouchi et al. ont développé des organoïdes hépatiques à partir de cellules iPSC provenant de patients porteurs de la maladie de Wolman [125]. Un test de fibrose a révélé une augmentation significative du marqueur P3NP (propeptide N-terminal du procollagène de type III, biomarqueur pour mesurer la fibrose hépatique), et une analyse par microscopie à force atomique (utilisée pour examiner la structure physique et la rigidité des cellules et des tissus) a montré une rigidité accrue, suggérant des phénotypes de fibrose plus agressifs, ce qui est le cas des patients atteints de la maladie de Wolman. L'accumulation de lipides active la voie mTOR, augmentant l'expression de gènes lipogéniques. Il a été prouvé que l'activation du récepteur Farnésioïde X (FXR) diminuait la suractivation de mTOR. L'application de l'acide obéticholique, agoniste puissant du FXR, active le récepteur qui entraîne la production de FGF19 (facteurs de croissance des fibroblastes). Cette protéine possède des propriétés anti-fibrotiques et régule le métabolisme lipidique et glucidique. Au niveau des organoïdes, une diminution de l'accumulation de lipides et de la production de ROS a été observée après traitement, ainsi qu'une réduction significative de la rigidité

des organoïdes [125]. Les résultats obtenus avec l'agoniste du FXR sont semblables à ceux obtenus avec une LAL recombinante, servant de contrôle dans cette étude. Ainsi, la diminution de la fibrose met en évidence l'effet anti-fibrotique de FGF19 et le potentiel des organoïdes comme alternative aux études de drug screening avec les maladies monogéniques.

1.2.2.2. Le syndrome d'Alagille

La mutation du gène *JAG1* cause le syndrome d'Alagille, une maladie génétique autosomique dominante. Le diagnostic est compliqué car le gène est l'objet de nombreuses mutations, telles que des clivages protéiques ou des mutations faux-sens, entraînant chez certains patients des atteintes hépatiques et chez d'autres, des anomalies cardiaques sans atteintes du tissu hépatique [132]. Guan et al. ont développé des organoïdes à partir des iPSC possédant deux types cellulaires : des hépatocytes et des cholangiocytes. Les hépatocytes sont organisés en couches, tandis que les cholangiocytes se présentent sous forme d'épithélium entourant des structures ressemblant à des canaux biliaires [132]. Ils ont ainsi généré des structures distinctes, incluant des organoïdes principalement composés d'hépatocytes, des organoïdes canaux, ainsi que des organoïdes mixtes. Les protocoles de différenciation sont très importants pour orienter la différenciation vers l'un ou l'autre type cellulaire, les proportions variant selon les conditions de culture et les besoins spécifiques de l'étude.

L'analyse du transcriptome des organoïdes a été comparée à celui des iPSC, des hépatocytes humains primaires (PHH) et du tissu hépatique, afin de s'assurer de la présence des fonctions hépatiques. L'expression de gènes codant pour des enzymes hépatiques (*CYP3A*) ou des gènes de transport et de détoxification prouve que les différents organoïdes ont exprimé un profil génétique similaire à celui des PHH et du tissu hépatique, permettant ainsi d'imiter les fonctions essentielles hépatiques. Cependant, il existe des différences génétiques et fonctionnelles par rapport aux PHH qui ne possèdent pas certains ARNm présents dans ces organoïdes (*HNF1b*, *GGT* et *CFTR*). Cela suggère un profil hépatique embryonnaire plutôt qu'un profil adulte mature [132]. Les organoïdes sont de bons modèles physiopathologiques car ils reproduisent les fonctionnalités de biosynthèse et celles de biotransformation des xénobiotiques *in vitro*. Afin de caractériser les organoïdes, il est possible d'étudier différents paramètres spécifiques sur des durées définies. La production d'albumine hépatique fait partie des mesures de caractérisations possibles, tout comme les

activités enzymatiques [133]. Ici, une production élevée d'albumine a été détectée et la métabolisation de deux molécules par le CYP3A4 a permis de détecter des taux de métabolites supérieurs à ceux produits par les iPSC. Afin de prouver la capacité de culture à long terme des organoïdes et le maintien des fonctionnalités hépatiques, un taux de métabolites, produit après une culture de 50 jours, a été analysé. Ce taux a été égal au taux produit par des PHH après 24 heures de culture [132]. Ces organoïdes hépatiques ont validé la capacité de régénération tissulaire, retrouvée *in vivo* et indispensable à l'homéostasie hépatique.

Après avoir déterminé que la localisation de la protéine JAG1 était majoritaire au niveau des cholangiocytes, les chercheurs ont modélisé la maladie avec des organoïdes témoins et des organoïdes porteurs d'une mutation affectant le gène *JAG1* (iPSC de témoins ou de patients porteurs d'un codon stop ou d'un problème d'épissage). Les organoïdes témoins formaient des structures normales, tandis que les organoïdes atteints de la maladie présentaient des anomalies de structures tubulaires. Ces anomalies étaient beaucoup plus marquées chez les organoïdes portant la mutation introduisant un codon stop. De plus, les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire étaient réduits dans les organoïdes mutés.

En comprenant le mécanisme des mutations, les chercheurs ont souhaité corriger la mutation la plus délétère qui introduisait un codon stop, C829X. Grâce à la technologie de CRISPR-Cas9, ils ont introduit la mutation dans les iPSC témoins et ont corrigé celle des iPSC de patients atteints de la pathologie. L'analyse a révélé que les organoïdes des iPSC mutées possédaient moins d'hépatocytes et de cholangiocytes, ainsi qu'une structure altérée, contrairement aux organoïdes des iPSC corrigées. De plus, l'expression de *JAG1* a été fortement réduite dans les organoïdes mutés par rapport aux corrigés, soulignant l'impact de cette mutation sur le développement de la structure biliaire [132].

Ces études prouvent que l'utilisation d'organoïdes offre la possibilité de produire des modèles spécifiques, de modéliser des pathologies rares afin de comprendre leur mécanismes et d'explorer de nouvelles approches. Ces modélisations pourraient permettre d'orienter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques par des études de drug screening.

1.3. *Organoïdes multi-organes : les biopuces*

La modélisation des organoïdes peut être améliorée par le développement des « organ-on-chip », qui signifie en français, organe sur puce. Les biopuces sont des dispositifs miniaturisés. Cette technologie combine à la fois des connaissances en bioingénierie, en ingénierie tissulaire, en biologie cellulaire, en biomatériaux et en microfluidique, afin de reproduire les environnements physiologiques et le comportement des tissus humains. L'intégration des mouvements des fluides dans la recherche sur les organoïdes est innovante et redéfinit les approches expérimentales. Cette technologie est principalement développée pour mener des études de toxicité et de pharmacocinétique [134], mais elle apporte également des connaissances sur les interactions entre différents tissus.

1.3.1. Organ-on-chip

L'organogenèse repose généralement sur des interactions biochimiques et dynamiques entre les cellules et leur environnement. Par conséquent, la compréhension de ces facteurs, y compris la mécanique des fluides, est essentielle pour favoriser le développement optimal des organoïdes. [135]. En contrôlant à la fois les échanges de nutriments, la circulation des déchets métaboliques, mais également les forces de cisaillement dues à l'écoulement sur les cellules [40], la microfluidique contribue à la maturation et à la fonctionnalité des organoïdes. La microfluidique nécessite de nombreuses connaissances sur les propriétés des fluides et sur la géométrie des canaux. Ces notions permettent d'appliquer une force de cisaillement suffisante pour permettre les échanges, notamment d'oxygène, sans être nocive pour les cellules [136]. Ce contrôle permet également d'éviter des dommages cellulaires, tissulaires ou d'altérer le comportement physiologique des cellules. La microfluidique favorise à la fois la compréhension des interactions entre les cellules et les différents organes, le développement de métastases [40], et permet également d'étudier l'administration de molécules thérapeutiques. Ainsi, les recherches réalisées grâce aux organes sur puces permettraient de s'orienter vers une médecine personnalisée en réalisant directement des tests de toxicité, de sécurité et d'efficacité sur les cellules de patients [136].

Les biopuces apportent une technologie supplémentaire aux cultures 3D car la microfluidique est une caractéristique clé du développement cellulaire. Elles reposent sur trois composants : la puce, produite avec un matériau adapté et possédant des microcanaux et des microchambres, les cellules et le flux microfluidique [137]. Cette

technologie permet de créer des conduits microscopiques avec des structures particulières, favorisant à la fois l'apport de nutriments, d'oxygène ou de xénobiotiques en continu, tout en renforçant également l'organisation cellulaire tridimensionnelle [138]. La disposition des microcanaux permet de moduler l'environnement et d'imiter les conditions biologiques.

Comme pour les scaffolds produits par électrospinning, le choix du matériau de la biopuce est primordial. Le matériau, naturel ou synthétique, doit respecter différentes caractéristiques : il doit être transparent pour permettre une visualisation des cellules au microscope, avoir de bonnes propriétés mécaniques pour permettre l'écoulement des fluides, être perméable aux gaz, mais il doit également être biocompatible pour ne pas induire de toxicité cellulaire et être capable de supporter des stérilisations sans être endommagé [139]. De nombreux matériaux sont présents sur le marché, tels que le polyester thermodurcissable (TPE) ou le polyuréthane (PU). Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est le plus utilisé en raison de son faible coût et de ses excellentes propriétés (perméable à l'oxygène, élastique, facilement modulable, etc.) [118], [139]. Il possède cependant des limites, notamment une forte absorption des molécules hydrophobes et une inadaptabilité à la fabrication à grande échelle [134]. Il est toutefois possible de combiner différents polymères (par exemple PDMS et polycarbonate (PC)) pour obtenir un matériau performant avec peu de limites [118], [137].

Il existe de nombreuses techniques de microfabrication, adaptées à chaque type de matériau et possédant chacune des avantages et des inconvénients [139]. Nous pouvons ainsi utiliser « la photolithographie, la lithographie douce, la gravure laser et chimique, le microfraisage, le gaufrage à chaud, le moulage par injection et l'impression 3D ». Toutes ces méthodes sont détaillées dans les articles dédiés [137], [139]. Depuis quelques années, l'impression 3D s'est développée, permettant de produire couche par couche un objet en 3D avec de la résine. Cette synthèse additive est réalisée par une imprimante capable de se diriger dans les trois plans : x, y et z [139]. Ces impressions suscitent de l'intérêt car il est possible d'intégrer des vannes pneumatiques, des pompes voire des membranes [134] dans les structures.

Le foie, étant un organe très vascularisé, possède une structure influencée par les mouvements des fluides qui le traversent. Ainsi, la modélisation de foie sur puce est d'un intérêt majeur pour comprendre le fonctionnement de cet organe dans des conditions physiologiques et pathologiques. Elle favorise l'organisation cellulaire et

contribue également à l'augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la métabolisation [118], permettant de produire des modèles pertinents et prédictifs [137].

1.3.2. Interorgans

Le développement de systèmes d'organes connectés sur puce permet de simuler des interactions entre différents organes et de comprendre leurs influences réciproques. De plus, il permet d'améliorer la compréhension des profils pharmacologiques des nouvelles molécules, dont l'ADMET (absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité). Certains modèles peuvent inclure plusieurs organes interconnectés, comme un modèle intégrant quatre tissus, comprenant « le cœur, les os, le foie et la peau » [40]. Il est également possible de réaliser un modèle foie-intestin, permettant d'étudier le rôle de la barrière intestinale lorsqu'elle est altérée. Dans ces conditions, les bactéries intestinales nocives pénètrent plus facilement et favorisent l'inflammation et le stress oxydatif des hépatocytes, participant à l'aggravation de la MAFLD [117].

1.3.2.1. *Biopuce foie-intestin*

Un autre modèle foie-intestin a été développé pour étudier l'effet de premier passage des médicaments. Lors d'une administration par voie orale, les médicaments peuvent subir un effet de premier passage intestinal. Les intestins présentent une grande surface absorbante grâce aux microvillosités et sont, comme le foie, richement vascularisés. Possédant de nombreuses enzymes de métabolisation, dont les CYP450, ils peuvent métaboliser les xénobiotiques [140]. Choe et al. ont développé des biopuces microfluidiques foie-intestin contenant deux types cellulaires présents dans deux couches séparées [141]. La couche supérieure contient les cellules épithéliales intestinales Caco-2, tandis que la couche inférieure contient les cellules hépatiques HepG2. La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un carcinome du côlon et est très utilisée pour la modélisation de cellules intestinales [142]. Les HepG2 dérivent d'un carcinome hépatocellulaire [143]. Une membrane poreuse se situe entre les deux couches, permettant un échange entre les deux types cellulaires. Les biopuces ont été produites par soft-lithographie avec du PDMS. Des entrées et sorties ont été insérées dans les biopuces pour permettre l'administration du milieu avec ou sans traitement et récupérer ainsi les métabolites pour les analyser. Ils ont réalisé divers tests pour s'assurer de l'efficacité de leur biopuce. Les cellules possédaient une bonne viabilité cellulaire tout au long de la culture sur puce et se sont également bien organisées, avec un attachement relativement supérieur pour les Caco-2. Comme de nombreuses autres études, l'activité enzymatique a été évaluée avec un marqueur présent à la fois

dans le foie et les intestins, le CYP450 3A4. Grâce à un substrat fluorogénique, l'intensité de fluorescence a été mesurée pour quantifier l'activité enzymatique. Les résultats ont mis en évidence la présence d'une activité enzymatique des CYP450 significativement plus élevée dans les deux types de cellules dans des conditions de flux [141]. Ce test corrobore le fait que l'application d'un stimulus mécanique favorise considérablement la physiologie des cellules. Une différence d'activité a été perçue entre les deux types cellulaires et cela peut s'expliquer par l'origine des cellules, car nous savons que les HepG2 expriment moins bien les CYP450 [141].

Afin de reproduire les conditions physiologiques *in vivo*, la perméabilité de la membrane a été testée. La fluorescéine a été utilisée comme marqueur car, en tant que molécule hydrophile, c'est un bon marqueur du transport paracellulaire. Elle permet d'analyser à la fois l'intégrité de la barrière épithéliale et la qualité des jonctions serrées formées par les cellules Caco-2 dans la puce. Les chercheurs se sont ainsi rendu compte que la perméabilité des cellules Caco-2 cultivées sur puce dans les conditions de flux était beaucoup plus faible qu'en condition statique (*Figure 22*) [141]. Ceci s'explique, encore une fois, par l'application d'un stimulus mécanique qui entraîne un cisaillement fluide, augmentant ainsi la formation de jonctions serrées par stimulation de la physiologie cellulaire [141].

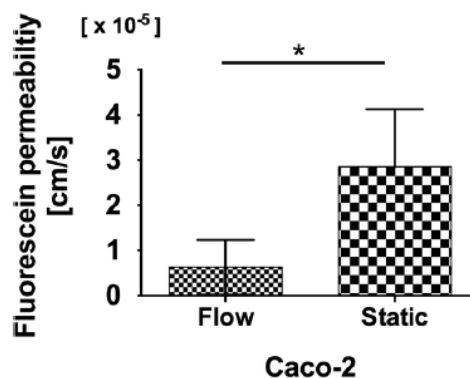


Figure 22 : Perméabilité de la fluorescéine dans les Caco-2 en condition de flux ou en statique ($p < 0.05$) - Choe et al. 2017

Choix de la molécule d'intérêt

Afin de valider leur modèle de biopuce foie-intestin, Choe et al. ont utilisé l'apigénine comme molécule pour modéliser l'effet de premier passage. Cette molécule est connue pour son fort métabolisme intestinal et hépatique. En tant que composé hydrophobe, elle a une tendance à s'adsorber sur les surfaces hydrophobes, dont le PDMS. Pour réduire cet effet, ils ont recouvert le PDMS de BSA (albumine sérique bovine) et ont fait circuler au préalable un milieu contenant la molécule, permettant de contrôler la dégradation de l'apigénine.

Métabolisme de l'apigénine

Deux conditions de culture différentes ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la biopuce et le rôle des différentes cellules : une culture avec des cellules intestinales seules et une co-culture avec les cellules hépatiques. Dans la première condition,

après 6 heures de culture, 33,5 μM d'apigénine ont été détectés dans la couche intestinale et 1,7 μM dans la couche hépatique. Après 24 heures, ces chiffres ont diminué à 5,4 μM dans l'intestin et 1,4 μM dans le foie. Cela suggère que les cellules Caco-2 métabolisent une quantité significative d'apigénine [141].

Dans la puce avec co-culture de cellules intestinales et hépatiques, après 6 heures de culture, 31,4 μM et 1,0 μM d'apigénine ont été détectés dans les couches intestinale et hépatique respectivement. Après 24 heures, les concentrations étaient de 2,6 μM et 2,0 μM . Cela indique les cellules Caco-2 réalisent la majorité de l'activité métabolique, tandis que les cellules HepG2 contribuent au métabolisme mais à moindre mesure [141].

Résultats

Une analyse temporelle des métabolites a été réalisée par HPLC (chromatographie liquide à haute performance), mettant en lumière les capacités enzymatiques des cellules. Les résultats soulignent le fait que les cellules Caco-2 métabolisent majoritairement l'apigénine en produits de sulfatation, alors que les HepG2 métabolisent la molécule en produits de sulfatation et en glucuronides [141]. En comparant leur étude avec une étude antérieure similaire réalisée chez des rats, ils se sont rendu compte que leur modèle de biopuce reproduisait un métabolisme de premier passage similaire à celui des rats, et supérieur à celui des biopuces en monoculture intestinale. Cependant, une légère différence a été observée avec la métabolisation *in vivo*. Cette divergence pourrait être améliorée en utilisant des cellules souches ou des cellules primaires, et en ajustant la proportion de chaque type cellulaire afin de reproduire les conditions *in vivo* [141].

Cette étude met en lumière le potentiel des biopuces interorgans à reproduire des interactions métaboliques entre les tissus intestinal et hépatique. Elle démontre que les organoïdes sont capables de modéliser des conditions d'études comparables à celles observées chez les animaux. Ces technologies soulignent l'intérêt de développer de tels modèles d'études pour mieux comprendre les mécanismes biologiques, tout en réduisant l'utilisation des modèles animaux. L'existence de certaines limites, telles que le type cellulaire choisi, le manque de vascularisation, les contraintes liées à la fabrication des biopuces, ou encore le manque de standardisation, contraignent leur capacité à reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. Malgré tout, ces modèles sont prometteurs et offrent une alternative aux modèles

animaux pour la recherche biomédicales. Ils pourront être utilisés pour modéliser des pathologies ou réaliser des études de drug screening.

1.3.2.2. *Biopuce foie-tissu adipeux*

D'autres modèles étudient l'axe foie-tissu adipeux. Des hépatocytes et des adipocytes ont été mis en culture dans un modèle à deux chambres pour étudier la relation entre la MAFLD, l'obésité et le diabète. Les chercheurs ont analysé les échanges entre des marqueurs spécifiques, comme les cytokines pro-inflammatoires ou l'adipokine. Cette étude a mis en évidence une diminution de la fonction effectrice des CYP3A4 dans les hépatocytes, due à un environnement pro-inflammatoire. Ainsi, en connaissant la fonction et l'importance des CYP3A4 dans la métabolisation des médicaments, l'étude a souligné la complexité de développer un médicament ciblant la MAFLD. La progression de la maladie et sa gravité entraîne une diminution de l'activité des cytochromes, et par conséquent, une mauvaise métabolisation des molécules thérapeutiques [144].

Ces conditions compromettent à la fois l'efficacité et la sécurité de nombreux traitements. Nous savons qu'une mauvaise métabolisation peut entraîner une inefficacité thérapeutique voire l'apparition d'effets indésirables. Un médicament dégradé de manière inappropriée peut s'accumuler dans l'organisme, provoquant ainsi une toxicité. Cette variabilité dans la réponse aux traitements renforce la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques personnalisées.

1.3.2.3. *Biopuce foie-tendon*

Dans cette optique, la co-culture foie-tendon a été pensée et développée au laboratoire BMBI afin simuler de manière réaliste les interactions biologiques entre ces deux tissus. Ce modèle vise à recréer les capacités du foie à métaboliser les substances actives et à étudier les effets des molécules ou de leurs métabolites sur les organoïdes de tendons. Les tendons sont des tissus sensibles aux effets de certaines classes thérapeutiques. De ce fait, ils pourraient servir de modèle pour prédire les effets d'une molécule après son passage au niveau hépatique, afin d'évaluer sa potentielle efficacité ou toxicité. Les technologies actuelles permettent de produire des organoïdes fiables et représentatifs de pathologies spécifiques. En modifiant les organoïdes de tendons, pour obtenir de tendons vieilliss ou diabétiques, le développement de tels organoïdes permettrait de prédire les effets thérapeutiques ou indésirables, mais également d'adapter et de personnaliser les traitements en fonction des caractéristiques biologiques individuelles de chacun.

2. Organoïdes hépatiques et autres applications biomédicales

Le changement de la stratégie médicamenteuse est primordial pour les années à venir. La prise en considération de l'identité biologique propre à chaque être humain permet de se rendre compte de l'importance de développer une approche de médecine personnalisée. La modélisation des pathologies qui modifient les profils pharmacologiques des médicaments est essentielle dans la mise au point de nouvelles thérapies fonctionnelles. Les différentes recherches menées sur les organoïdes permettent aujourd'hui de s'orienter vers des modèles fiables et pertinents, reproduisant, par exemple, pour le foie, des effets hépatotoxiques rencontrés *in vivo*.

2.1. Biobanques et plateformes

Les organoïdes offrent de nombreuses applications dans le domaine biomédical qui peuvent être développées par l'utilisation de biobanques. La création de biobanques a été facilitée par les avancées technologiques, jouant un rôle clé dans les recherches médicales et pharmaceutiques. En utilisant des échantillons de tissus de patients sains ou malades, ces biobanques, qui conservent *in vitro* des tissus d'intérêt, servent de base pour des études de toxicité, de sécurité et de dépistage de médicaments (Figure 23) [61]. Il est également possible de développer des plateformes avec des organoïdes pour effectuer des tests de toxicité, ou pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles en couplant la technologie CRISPR-Cas9 à la plateforme [119] pour différentes maladies. Les cancers représentent la deuxième cause de décès dans le monde avec quasiment 10 millions de morts en 2022. Le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) estime une augmentation de l'incidence du cancer de 77% d'ici 2050 [145]. Le développement des tumoroïdes est de rigueur afin d'identifier des cibles thérapeutiques personnalisées pour chaque patient. L'hétérogénéité génétique intratumorale ou interpatient est modélisée de manière fidèle grâce aux tumoroïdes. Ils conservent le phénotype cancéreux de la tumeur d'origine et permettent de reproduire les structures histologiques et fonctionnelles qui ne sont pas modélisables avec des cultures 2D [146]. Ainsi, ces modèles fiables représentent des plateformes pour le criblage de médicaments car l'hétérogénéité intratumorale et interpatient peut être cartographiée afin d'adapter le traitement, comme pour des cancers primaires du foie [147].

2.2. Régénération tissulaire et transplantation

Des tests de compatibilité peuvent être également effectués afin de réaliser des greffes allogéniques. Le traitement efficace pour une insuffisance hépatique en phase

terminale est la greffe. Cependant, la disponibilité de tissus sains adaptés à une greffe est difficile à garantir [148]. L'utilisation d'organoïdes permettra peut-être un jour de remplacer une partie des tissus [61], augmentant l'espérance de vie du patient, mais de nombreuses études sont encore à mener.

2.3. La médecine personnalisée

La modélisation des pathologies humaines permet de mieux comprendre leur fonctionnement et d'approfondir nos connaissances, favorisant le développement de nouvelles thérapies. La possibilité de reprogrammer des cellules facilite l'étude génétique des maladies. Les technologies d'édition du génome permettent de modéliser le génotype des cellules, contrôlant ainsi l'expression de gènes, de protéines, etc., ce qui permet de prédire la réponse à des traitements lors de tests. Ainsi, la médecine personnalisée, par le biais des organoïdes, offre la possibilité de mettre en place des thérapies géniques spécifiques aux patients (Figure 23) [61].

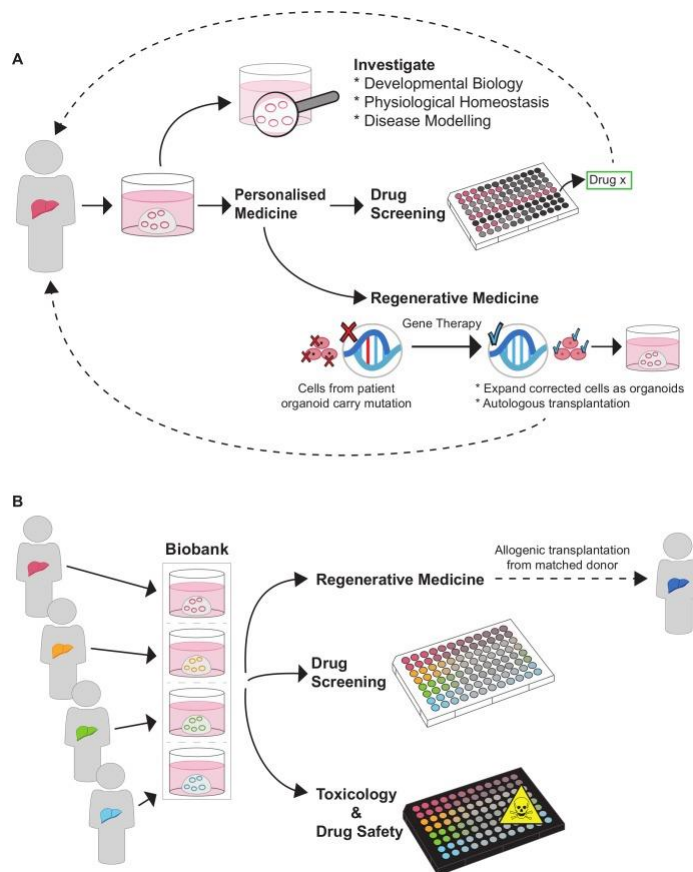


Figure 23 : Les différentes applications des organoïdes, A) à partir d'un seul individu, B) à partir de plusieurs individus - Prior et al. 2019

Les avancées technologiques ont permis de développer de nouveaux moyens de caractériser et d'identifier des substances actives, leurs rôles ainsi que leurs effets. En diversifiant leurs applications, nous pouvons continuer à nous orienter vers une médecine plus personnalisée et plus prédictive à plusieurs échelles. Les organoïdes peuvent par conséquent être utilisés dans différents domaines scientifiques pour étudier de manière plus approfondie les interactions entre tissus et molécules. Une étude a récemment été menée au laboratoire BMBI à laquelle j'ai participé. L'objectif était de développer des organoïdes de tendons afin de tester et d'analyser les effets indésirables de certains médicaments sur ces structures. Cette recherche représente une évaluation de la toxicité médicamenteuse, illustrant le potentiel des organoïdes dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques et dans la prévention des effets indésirables.

Partie 3 : Production d'organoïdes de tendons par électrospinning pour des études de toxicité

Comme mentionné précédemment, les organoïdes sont des structures biologiques longues à produire. Il est nécessaire qu'ils soient fiables et reproductibles pour être utilisés à des fins pharmacologiques ou médicales. Après la commercialisation d'un médicament, la phase IV, appelée pharmacovigilance, se met en place. Elle consiste à surveiller sur du long terme, dans les conditions réelles d'utilisation, les effets indésirables, graves ou non, des nouveaux médicaments qui n'ont pas été détectés à temps ou qui n'apparaissent qu'après une longue période d'utilisation, en fonction du patient. Cette phase permet également d'améliorer la prescription, la posologie, les voies d'administration, etc., [23], [149]. Certains traitements ont provoqué l'apparition d'effets indésirables au niveau des tissus tendineux lors de leurs administration, se traduisant par des altérations des tendons et conduisant à des tendinopathies. Il est possible, à l'aide des organoïdes, de détecter l'apparition d'effets indésirables [150]. Un des projets de l'équipe CBB du laboratoire BMBI est de développer un modèle d'organoïdes de tendons par électrospinning. La réussite de la production d'un modèle représentatif du tissu tendineux humain nous offrirait la possibilité de tester des molécules et d'observer, ou non, l'absence d'altération du tissu ainsi que leurs potentiels effets. Actuellement, nous n'en sommes qu'aux prémices du développement du prototype et de la compréhension du comportement des cellules choisies par le laboratoire. En connaissant l'importance du foie dans la métabolisation des médicaments, un projet de co-culture d'organoïdes de tendons couplés à une biopuce contenant des cellules hépatiques a été conçu pour prendre en considération la métabolisation hépatique des médicaments. Cette dernière partie de la thèse présente la mise en place de la production d'organoïdes de tendon par électrospinning et la co-culture foie-tendon.

Chapitre 1 : Organisation du tendon et développement

1. La physiologie du tendon

Les tendons, ne représentant qu'une petite fraction de la masse corporelle totale chez l'Homme, ont une place prépondérante dans la physiologie du corps humain. Leurs rôles sont multiples et indispensables dans le mouvement et la stabilité de ce dernier [151], [152]. Les tendons constituent un tissu conjonctif fibreux, dense, faisant partie du système musculosquelettique. Ils relient les muscles aux os et permettent ainsi de

transmettre les forces exercées des muscles aux os et de résister aux contraintes générées par les muscles. Ils jouent également un rôle dans le stockage et la restitution de l'énergie élastique. Pour accomplir ces fonctions, les tendons présentent une structure distinctive hiérarchisée autour du collagène [152], [153], [154].

1.1. Structure et composants

1.1.1. La matrice extracellulaire

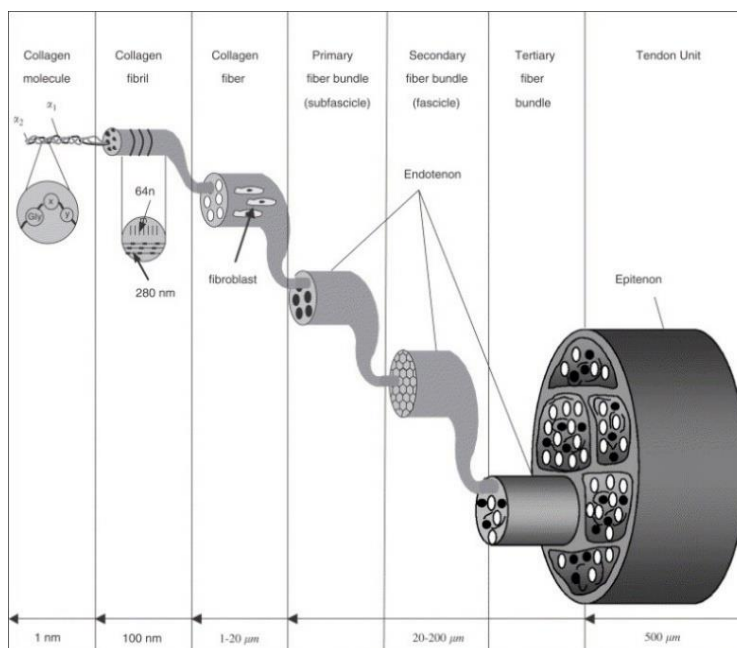


Figure 24 : Illustration de la structure d'un tendon - Wang J, 2006

La structure des tendons repose principalement sur le collagène, qui constitue la majeure partie de la MEC (Figure 24) [155]. Cette MEC est composée de divers éléments, parmi lesquels l'eau, dont l'absence influe sur la rigidité des tendons [156], ainsi que l'élastine, la fibronectine et les glycosaminoglycanes. Nous trouvons également des protéoglycanes tels que la décorine [152], [157], [158], [159], des glycoprotéines telles que la ténascine-C (qui se comporte comme une protéine élastique) [151], [160] et des composants anorganiques [151]. Le collagène demeure le composant principal, représentant 85% du poids sec du tissu tendineux. Parmi les différents types de collagène présents dans la MEC, nous retrouvons notamment les types III, V, XI, XII et XIV, mais le collagène de type I est le plus abondant, représentant environ 95% du collagène total dans un tendon normal [152], [153], [161], [162]. Le collagène est une protéine structurale fibreuse formée de longues chaînes polypeptidiques. Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes polypeptidiques enroulées en une triple hélice de collagène stabilisée par des liaisons hydrogènes. La structure est invariable : un acide aminé prédominant, la glycine, apparaît tous les trois acides aminés, suivi des acides aminés X et Y, qui sont souvent

la proline et l'hydroxyproline [154], [163]. Ce procollagène immature est clivé par des enzymes spécifiques pour donner du tropocollagène soluble, forme mature du collagène [157], [163]. Ce dernier s'associe avec d'autres molécules de tropocollagènes pour former des fibrilles de collagène insolubles stabilisées par des liaisons covalentes. Ces dernières s'associeront entre elles pour former des fibres de collagène (primaires, secondaires, tertiaires) puis des fascicules ou faisceaux [151], [152][154], ce qui permettra de former le tendon (*Figure 24*).

La majorité des fibres de collagène sont orientées parallèlement à l'axe os-muscle. Cependant, certaines seront orientées perpendiculairement. Cette structure hiérarchique permet aux tendons de résister aux forces de traction élevées appliquées lors des mouvements [153], [163], [164]. Entre différentes espèces et en fonction de la localisation des tendons, le nombre et la taille des fibres vont être différents, pouvant aller de 30µm chez le rat à 300 µm chez l'Homme [163]. Chaque faisceau est enveloppé d'un tissu conjonctif appelé endoténon, formant ainsi des faisceaux plus volumineux. Ces derniers sont à leur tour entourés d'une autre gaine de tissu conjonctif, l'épiténon, qui abrite les nerfs, les vaisseaux sanguins et les cellules souches/progénitrices tendineuses [154]. La dernière couche sera le paraténon, formant le tendon.

1.1.2. Les composants cellulaires

Le tissu tendineux est globalement hypocellulaire et se compose de deux composants cellulaires primaires : les ténocytes et les ténoblastes. Ces cellules tendineuses, situées dans la MEC, jouent un rôle central dans différents processus, dont la croissance, le maintien et la régénération de cette matrice mais également dans l'homéostasie et la réorganisation en réponse à des changements tissulaires [154]. Les tendons matures vont contenir majoritairement ces deux types de cellules, soit environ 90 à 95% de la population cellulaire [151], [153], [157], [163]. Les ténoblastes sont des cellules immatures et rondes avec un noyau ovoïde [153], qui vont se différencier au cours de la maturation et du vieillissement [154] en ténocytes matures avec une activité métabolique réduite [151]. Les cellules effectrices dans le tissu tendineux sont les ténocytes. Ces cellules, qui ont une forme de fuseau avec un noyau fusiforme, sont de type fibroblastes [154], [164]. Elles synthétisent du collagène et d'autres éléments constituant la MEC qui leur sert de support [152]. La matrice extracellulaire évolue parallèlement à la différenciation cellulaire : elle devient mature et s'organise progressivement avec des fibres de collagène structurées [165]. Depuis

quelques années, des cellules souches/progénitrices tendineuses (TSPC) ont été découvertes et caractérisées dans des tendons de diverses espèces. Elles constitueraient 1 à 4% des cellules résidentes du tendon et possèdent des caractéristiques similaires à celles des cellules souches mésenchymateuses adultes [153], [154], [157]. Les 5 à 10% de composants cellulaires restants sont des chondrocytes, des cellules synoviales de la gaine tendineuse mais aussi des cellules endothéliales capillaires et des cellules musculaires lisses des artérioles [151], [153].

1.2. *Le développement et l'homéostasie du tendon, source de bioinspiration pour l'ingénierie tissulaire*

Diverses recherches ont été menées pour mieux comprendre le mécanisme de développement du tissu tendineux. C'est un processus complexe qui débute dès la vie embryonnaire à partir du mésoderme [157], [166], plus précisément à partir du syndétome [167]. Il se poursuivra tout au long de la croissance et ce, jusqu'à l'âge adulte. Il subira des processus de maturation et de remodelage, guidés par des signaux biochimiques et mécaniques [154].

1.2.1. Les signaux biochimiques

La découverte de plusieurs marqueurs spécifiquement associés aux tendons primitifs et matures a contribué à cette compréhension [163], [166], en particulier l'expression génique de *Scleraxis* (SCX). Il correspond à un facteur de transcription hélice-boucle-hélice, qui joue un rôle clé dans la différenciation des ténocytes [168] et par conséquent dans le développement des tendons [169] : des études avec des souris knock out *Scx* ont prouvé que la perte de ce gène entraînait une altération des tissus tendineux [164], [170]. Cette protéine transcriptionnelle est activée par des facteurs de transcription tels que le TGF- β 1 et des voies de régulation comme *Pea3/Ern*. Ces mécanismes régulent positivement et directement le gène de la ténomoduline, et indirectement la production de collagène, principalement de type I [163], [165]. La ténomoduline est une protéine membranaire située à la surface des ténocytes [169] et elle est exprimée principalement dans les tendons et ligaments. Elle contrôle la multiplication des ténocytes ainsi que le développement des fibres de collagène [171]. Avec la *Scleraxis* et le collagène de type I, ces marqueurs sont spécifiques du tissu tendineux et permettent de différencier les cellules tendineuses des autres types cellulaires. D'autres marqueurs existent et sont analysés dans diverses études pour affirmer la présence ou la synthèse de tendons *in vitro* et/ou *in vivo*, tels que la décorine et la ténascine-C [152], [170], [171].

Parallèlement à l'action des facteurs génétiques, de nombreux facteurs de croissance impactent le processus de ténogénèse et de nombreuses études ont mis en évidence leurs rôles. Les facteurs de croissance favorisent la prolifération cellulaire et l'expression des marqueurs génétiques dans les tendons [152]. Parmi eux, nous retrouvons les facteurs de croissance fibroblastique (bFGF), de l'endothélium vasculaire (VEGF) ou encore du tissu conjonctif (CTFG) [152], [172], [173]. L'un des facteurs qui nous a particulièrement intéressés, en raison de ses propriétés et des recherches récentes à son sujet, est le TGF- β 1, exprimé par les cellules inflammatoires et les ténocytes [172]. Ce facteur de croissance appartient à une famille de protéines composée de trois isoformes (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ayant différents rôles dans l'homéostasie cellulaire [173]. Le TGF- β , tout comme le FGF, fait partie des molécules en amont de *Scleraxis* (*Scx*). Il influence de manière coordonnée le développement des progéniteurs des tendons axiaux et des membres : la perte de l'un des signaux entraîne une perte de tendon [172]. Les récepteurs du TGF- β étant exprimés dans les cellules progénitrices des tendons [157], ses isoformes jouent un rôle central dans la ténogénèse en modulant la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire, ainsi que l'activité cellulaire en augmentant la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) [157], [171], [172]. Cela améliore les propriétés mécaniques et histologiques des tissus tendineux, notamment en culture 3D [164]. Le TGF- β 1 augmente de manière plus prononcée l'expression génique du procollagène de type I et III, notamment lors du processus de guérison car il organise les fibres de collagène [152], [173].

Dans le but de développer du tissu tendineux *in vitro*, différentes études ont exploré l'association de diverses molécules pour favoriser une meilleure ténogénèse. Une attention particulière a été portée à la supplémentation en acide ascorbique (*Figure 25*) en raison de son rôle primordial dans la synthèse de collagène.

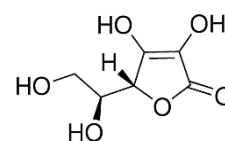


Figure 25 : Molécule d'acide ascorbique

Comme mentionné précédemment, la molécule de collagène est constituée de glycine, de proline et d'hydroxyproline la plupart du temps. La présence d'un acide aminé hydroxylé est essentielle car il confère la résistance à la traction des fibres de collagène. L'hydroxylation de la proline ou de la lysine en hydroxyproline et hydroxylysine respectivement, est catalysée par des enzymes spécifiques appelées hydroxylases. Ces enzymes utilisent l'acide ascorbique comme cofacteur, ce qui permet de stabiliser la triple hélice de collagène [154], [174]. Certaines études ont mis

en évidence que la supplémentation en acide ascorbique a permis d'améliorer la prolifération cellulaire des ténocytes de lapin cultivés. Elle a également augmenté le dépôt de collagène de type I. Cette situation a entraîné une densité plus élevée de la MEC par rapport au TGF- β 1 [171].

1.2.2. Les signaux dynamiques

Un autre élément indispensable pour maintenir l'homéostasie des tendons est la stimulation mécanique, que ce soit chez les animaux ou chez les humains. Elle consiste en une application de forces et de mouvements sur les tendons [164]. Deux situations différentes sont observées dans ce processus. Au stade embryonnaire, les tendons commencent à se développer en l'absence de toute force mécanique. Cependant, avec le temps, l'embryon grandit et se développe entraînant la formation et le mouvement des muscles de manière fréquente et intense. Ces mouvements apportent les forces mécaniques nécessaires au renforcement et à la maturation des tendons [164]. Le tendon, étant un tissu mécanosensible, doit être soumis à une action continue de charge mécanique pour permettre aux cellules de conserver leur morphologie et leur phénotype tendineux [175]. De plus, cette stimulation favorise la production d'une matrice extracellulaire de qualité et est nécessaire pour maintenir l'expression stable de facteurs de transcriptions spécifiques aux tendons, tels que la ténascine-C, la scléraxis [173] et la ténomoduline [164]. L'étude a montré que l'étirement uniaxial des TSPC induisait leur différenciation en cellules tendineuses et osseuses, tandis que l'étirement biaxial favorisait une différenciation en cellules osseuses, graisseuses et cartilagineuses [173]. Pour un bon développement *in vitro*, il est indispensable de connaître « la durée, la fréquence et l'amplitude des forces mécaniques pour imiter les forces mécaniques physiologiques » [118].

Les forces mécaniques ordinaires sont essentielles et sont converties en signaux biochimiques par le biais de processus de mécanotransduction [154], [155], pouvant engager la différenciation d'une lignée cellulaire sans facteurs solubles [176]. Toutefois, l'exposition à des forces mécaniques anormales peut provoquer l'apparition de conditions pathologiques [177]. Des recherches ultérieures ont démontré l'importance de stimuler mécaniquement les cellules pour encourager leur différenciation et leur prolifération *in vitro*, en imitant les processus naturels *in vivo* [178] (Figure 26). Il est indispensable de

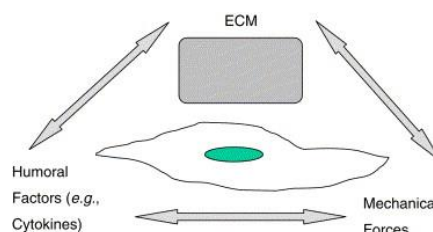


Figure 26 : Illustration de la relation entre la MEC, les forces mécaniques et les facteurs humoraux (comprenant par exemple les cytokines, les facteurs de croissance, etc.) - Wang et al. 2006

prendre en compte ce paramètre lors d'une culture dynamique uniaxiale en bioréacteur, tout en évitant d'atteindre la zone de rupture des tendons. En effet, selon la force de traction appliquée à un matériau élastique, trois zones se distinguent dans la courbe contrainte-déformation : la zone élastique, où le matériau peut revenir à sa forme initiale ; la zone plastique, où le matériau subit une déformation permanente et ne revient pas à sa forme initiale ; puis la zone de distension, où le matériau est distendu et risque de se rompre [179] (*Figure 27*). Les tendons humains se rompent à 8% de déformation ce qui peut entraîner une différenciation cellulaire précoce et le phénomène d'apoptose [152], [154]. L'application continue d'une déformation peut entraîner des microdéchirures, pouvant éventuellement conduire à une tendinopathie [152]. Il est important de prendre en compte que l'emplacement des tendons joue un rôle sur la capacité à supporter des déformations plus ou moins importantes.

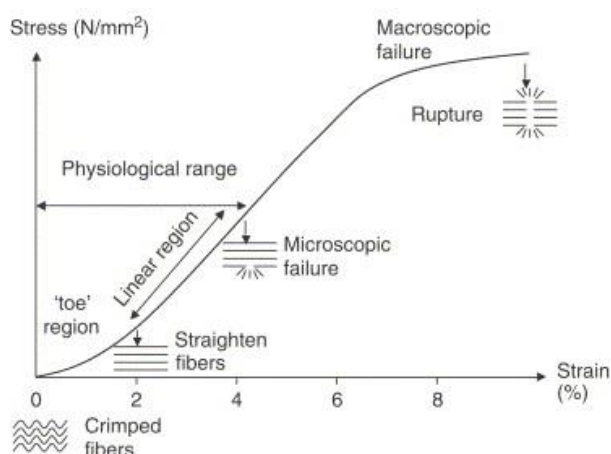


Figure 27 : Représentation de la courbe contrainte-déformation. Les fibres tendineuses présentent une structure « frisée » en l'absence de contraintes, qui se tendra lorsqu'une contrainte sera appliquée - Wang et al. 2006

D'autres études ont été menées et ont montré que des taux de déformations allant de 3% à 5%, avec une fréquence d'étirement mécanique de 0.5 à 1 Hz, amélioreraient à la fois la prolifération et la différenciation cellulaire, mais également l'orientation cellulaire [152], [176]. Ainsi, la production de MEC par les ténocytes augmente en raison de la stimulation de leur activité métabolique ce qui peut renforcer les propriétés mécaniques des tendons, telles que « la rigidité, le module de Young et la contrainte de traction maximale » [175].

Les données recueillies de certaines études ont prouvé que l'ajout de phases de repos permettait de rétablir la sensibilité mécanique des cellules soumises à un étirement. Cette période influence plusieurs paramètres dont l'augmentation de la prolifération cellulaire et la formation de tissu néo-tendineux. Des études ont mis en évidence qu'un étirement à 0,5 ou 1 Hz pendant 2 à 3 heures par jour, augmentait l'expression des marqueurs ténogéniques [152]. Malgré tous les mécanismes physiologiques favorisant

la production de tendon, une diminution de la production et de la résistance des tissus tendineux peut survenir, augmentant les risques de ruptures partielles ou totales, et constituant une forme possible de tendinopathie. Parmi ces formes, nous trouvons une tendinopathie causée par la prise de certains médicaments qui altèrent la qualité des tendons.

2. La tendinopathie

La tendinopathie est un terme général désignant toute affection affectant un tendon [180], englobant diverses causes et origines, y compris celles induites par la prise de médicaments. Cette dernière est liée à l'usage systémique ou locale de divers médicaments [181]. Certains médicaments associés à cette pathologie incluent les quinolones, les statines et les glucocorticoïdes [182]. Les quinolones, quelle que soit la voie d'administration, sont reconnues pour entraîner des altérations de la structure des tendons [183], de manière plus ou moins prononcée, favorisant le risque de ruptures tendineuses partielles ou totales. Cependant, en raison de leurs propriétés moléculaires, les fluoroquinolones seront présentes en concentrations plus élevées dans les tissus après une administration par voie orale, en raison de leur volume de distribution apparent élevé associé à une faible liaison aux protéines plasmatiques [159]. Les statines, molécules hypolipémiantes prescrites pour abaisser le taux de cholestérol sanguin [184], entraînent des douleurs musculaires et tendineuses par l'affaiblissement de ces tissus à cause d'une intense augmentation locale de métalloprotéinases matricielles [185] (endopeptidases remodelant la MEC par une destruction enzymatique de cette matrice [186]). La dernière classe thérapeutique entraînant des tendinopathies concerne les corticoïdes. Délivrés pour réduire l'inflammation, un de leurs effets indésirables est la dégradation des fibres de collagène [183], compromettant ainsi la résistance tendineuse. La tendinopathie médicamenteuse associée à cette classe thérapeutique est fréquente chez les patients atteints de maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (LES) et la polyarthrite rhumatoïde (PR) [182]. Il est à noter que la prise concomitante de ces différentes familles de médicaments constitue un facteur de risque plus élevé que leur utilisation individuelle [182].

Les tendons sont des tissus hypocellulaires [158], caractérisés par une faible densité cellulaire et une faible vascularisation [156]. De plus, au cours du temps, le fonctionnement cellulaire du tissu tendineux change en passant d'une métabolisation aérobie à une métabolisation anaérobie. Ces particularités procurent aux tendons la

capacité de pallier à des charges très importantes d'une part, et d'autre part, elles permettent au tissu tendineux de supporter des faibles taux d'oxygène. Cet atout permet d'éviter les phénomènes d'ischémie et de nécrose durant des périodes prolongées de stress [153]. Malgré ces avantages, lorsqu'une blessure survient, comme avec l'apparition d'une tendinite, cette différence d'environnement cellulaire par rapport aux autres tissus entraîne une capacité de guérison lente et réduite [153]. En vieillissant, l'équilibre cellulaire s'altère ce qui provoque une diminution de la production d'énergie et de la synthèse des composants de la MEC, accentuant les difficultés de régénération tissulaire et rendant les tendons plus vulnérables aux tendinopathies. Ainsi, à partir d'un certain âge, les populations vieillissantes possèdent des tendons plus fragiles et deviennent des patients à risque de tendinopathie, risque aggravé par la prise de certains traitements.

3. L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est une discipline inter- et pluridisciplinaire car elle vise à créer des tissus et des organes fonctionnels à visée médicale. Elle repose sur différents principes tels que l'ingénierie, la biologie et la médecine, en intégrant des connaissances et des compétences de la chimie, de la physiologie, ou encore du génie mécanique et de la science des matériaux. Divers spécialistes de domaines différents collaborent pour un même but, l'avancée médicale. L'ingénierie tissulaire s'appuie sur l'association de 3 piliers : les cellules, les biomatériaux mis en forme sous forme d'échafaudage (de scaffolds) et l'environnement (biochimique ou physique) (*Figure 28*).

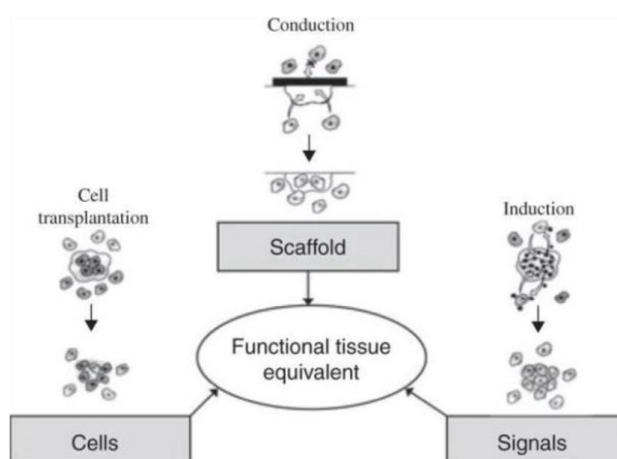


Figure 28 : Représentation de la triade de l'ingénierie tissulaire qui prend en compte les cellules, les biomatériaux et l'environnement

3.1. L'électrospinning

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, l'électrospinning ou électrofilage émerge comme une technique prometteuse, pour mettre en forme le scaffold nécessaire à l'intégrité mécanique et physique de l'assemblage. Cette technique permet de produire des fibres de l'ordre du nanomètre et ainsi de se rapprocher de la structure de la MEC des tissus natifs tendineux [187], [188]. De nombreuses études ont prouvé que l'obtention d'un scaffold composé de fibres alignées fournit aux cellulesensemencées une structure topographique similaire à celle retrouvée *in vivo* et favorise ainsi leur différenciation et leur prolifération [152]. En fonction des besoins, il existe des techniques différentes pour produire des fibres micrométriques ou nanométriques, dont, parmi tant d'autres, l'électrospinning conventionnel, pratiqué au laboratoire, l'impression par jet électrohydrodynamique, l'électrospinning humide ou encore la bioimpression 3D [172]. Il est également possible de faire varier de nombreux paramètres qui influenceront le scaffold, tels que le nombre d'aiguilles employées pour l'électrospinning. L'électrospinning implique plusieurs éléments : une solution de polymère dissout dans des solvants, un capillaire dans lequel transite la solution, une source d'électricité à haute tension reliée à une pointe métallique, plus précisément une aiguille, et un collecteur mis à la terre.

3.1.1. Fonctionnement

La solution de polymère est propulsée à travers d'une seringue à l'aide d'un pousse-seringue qui exerce une pression contrôlée continue. Sous l'effet de la haute tension appliquée et d'une différence de potentiel entre l'aiguille et le collecteur, cette solution est accélérée vers le collecteur [172]. Le champ électrique induit des charges électriques à la surface de la solution de polymère. Lorsque la force électrique appliquée dépasse la tension de surface, c'est-à-dire la force de cohésion superficielle de la solution, cela entraîne l'extrusion des fibres nanométriques qui se déposent sur le collecteur (Figure 29). L'organisation et l'alignement des nanofibres jouent un rôle crucial dans la manière dont les cellules se forment et expriment les molécules de la MEC, éléments déterminants pour la structure et la fonction mécanique du néo-tendon [172].

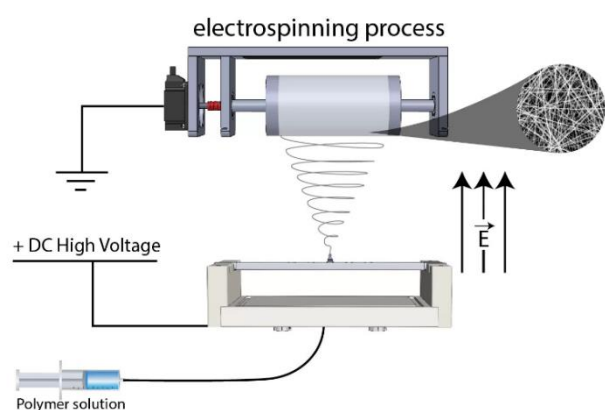


Figure 29 : Représentation du processus d'électrospinning - Inovenso

3.1.2. Paramètres influençant la fabrication des fibres

La fabrication d'un scaffold est complexe et dépend de nombreux paramètres qui sont plus ou moins modifiables, impactant les propriétés et les caractéristiques des nanofibres électrofilées.

Le choix du collecteur, le diamètre de l'aiguille ou encore la distance entre ces deux éléments influencent les fibres. En fonction du type de dépôt souhaité, la géométrie du collecteur, sa taille et sa mise en mouvement vont différer. Un collecteur statique, comme un disque, permettra de collecter des fibres disposées de manière aléatoire, tandis qu'avec un collecteur cylindrique, le résultat dépendra de sa vitesse de rotation (*Figure 30*) [152].

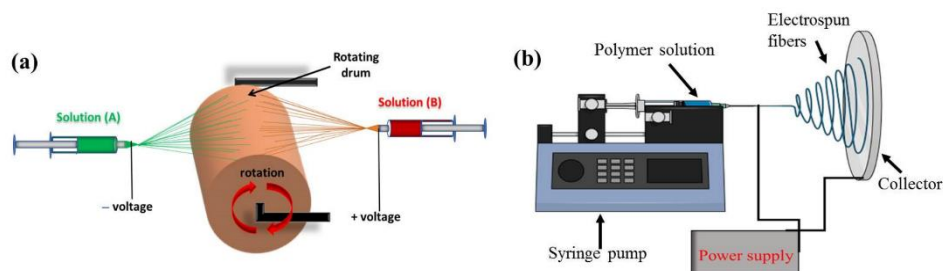


Figure 30 : Schéma d'électrospinning représentant a) cylindre rotatif, b) collecteur statique - Govindaraju et al. 2023

Un collecteur tournant à basse vitesse permettra d'obtenir des fibres disposées de manière aléatoire, tandis qu'un collecteur cylindrique tournant à haute vitesse générera des fibres alignées (*Figure 31*). Lors de la culture cellulaire, cette dernière disposition, de par sa structure similaire à celle de la MEC, favorisera une meilleure différenciation des cellules en ténoocytes et une expression accrue des gènes spécifiques des tendons. Dans notre étude, le collecteur est un cylindre qui tourne à une vitesse rapide comprise entre 1900 et 2000 rotations par minute (rpm).

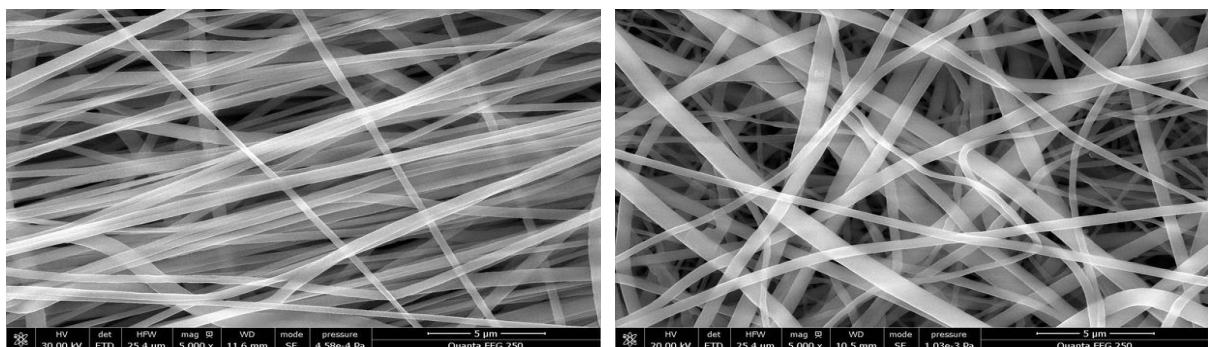


Figure 31 : Images au microscope électronique à balayage de scaffolds possédant des fibres alignées (gauche) et disposées de manière aléatoire (droite) - BMBI 2024

Un autre exemple de paramètres, le diamètre de l'aiguille, exprimé en Gauge, et la distance entre son extrémité distale et le collecteur. Les deux influencent l'épaisseur des fibres : plus le diamètre est petit, plus la fibre est étroite ; plus la distance est courte, plus les fibres sont épaisses. Ainsi, pour obtenir le matériau approprié, les

paramètres doivent être définis à l'avance. Ces paramètres comprennent également la tension appliquée, le débit et la durée de projection. Cependant, certains facteurs sont plus difficilement configurables car ils nécessitent des pièces dédiées à la pratique de l'électrospinning. C'est le cas de la température et de l'hygrométrie, qui ne peuvent pas être ajustées pour le moment au laboratoire mais qui sont mesurées. Une augmentation de la température impacte les propriétés du matériau car il réduit le temps d'évaporation, conduisant à un raccourcissement des fibres par réduction du temps d'allongement avant la solidification. Le processus sera inversé lors d'une augmentation de l'hygrométrie [189]. Ces conditions influent sur les propriétés du matériau choisi, il est donc primordial de sélectionner le constituant le plus adapté.

3.2. Choix du matériau

Comme nous le savons, la matrice tendineuse *in vivo* est organisée en une structure hiérarchique de fibres de collagènes alignées. Cette particularité impose de créer des matériaux ayant une structure similaire à celle retrouvée *in vivo*, afin de favoriser la différenciation et la prolifération cellulaire.

Avant de commencer un projet, il est primordial de choisir un polymère adapté car la structure topographique influence la différenciation et la prolifération des cellules souches [173]. Les polymères peuvent être d'origine naturelle, comme la cellulose, le chitosan, le collagène ou d'origine synthétique, comme l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) ou le polycaprolactone (PCL) [152], [172]. Par conséquent, chacun possède des caractéristiques qui permettent de sélectionner le plus adapté aux recherches menées. Les polymères naturels possèdent une composition semblable aux macromolécules retrouvées *in vivo* [152]. De par leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leurs groupes fonctionnels se liant aux facteurs de croissance, ils favorisent la prolifération et l'attachement des cellules [152], [172]. Malgré leurs caractéristiques avantageuses, les polymères naturels présentent une variabilité en fonction de leurs origines, ce qui affecte leur reproductibilité, leur pureté et leur poids moléculaire. De plus, leurs propriétés mécaniques sont inférieures à celles des polymères synthétiques.

Les polymères synthétiques sont plus facilement modifiables car ils possèdent des propriétés chimiques et physiques contrôlables afin de répondre aux mieux aux diverses exigences, c'est notamment le cas du PCL. Le PCL est défini comme un polymère hydrophobe linéaire apprécié pour ses remarquables propriétés mécaniques [152]. Il est largement utilisé en biomédecine pour diverses applications chez l'Homme, et notamment pour la fabrication de scaffolds fibreux pour l'ingénierie tissulaire.

Approuvé par la FDA, le PCL est utilisé dans le comblement osseux, les dispositifs de libération de médicaments, les sutures et dans d'autres applications médicales [152], [190], [191]. De plus, ce matériau est couramment utilisé et maîtrisé dans le laboratoire BMBI en raison de ses performances pour diverses applications. Il est donc choisi pour sa capacité à former des structures nanométriques définies grâce à l'électrospinning, améliorant ainsi la différenciation et la prolifération cellulaire lorsque les cellules sontensemencées dessus.

3.3. Le choix cellulaire

Un aspect clé de l'ingénierie tissulaire tendineuse consiste à sélectionner une source cellulaire et un système de culture adéquats pour faciliter la régénération du tendon endommagé. Bien que les cellules souches dérivées des tendons représentent une option intéressante, elles ne sont pas les seules viables. Le choix des cellules à ensemercer dans un scaffold doit être fait avec soin, en fonction du type de tissu souhaité. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (hBM MSC) sont particulièrement prometteuses dans ce domaine. Grâce à divers signaux biochimiques et mécaniques, ces cellules peuvent se différencier en ostéoblastes (cellules osseuses), en chondrocytes (cellules cartilagineuses), en ténocytes (cellules tendineuses), en myocytes (cellules musculaires squelettiques) ou en adipocytes (cellules graisseuses) [152], [153], [187]. Il est donc essentiel d'identifier et de définir les mécanismes nécessaires à la différenciation cellulaire pour obtenir des ténocytes actifs capables de produire et de sécréter du collagène : l'utilisation de facteurs de croissance et d'une culture dynamique est cruciale pour la différenciation en ténocytes [164], [174]. Les hBM MSC sont prélevées à partir de la crête iliaque de manière invasive et couramment utilisées comme point de comparaison dans les recherches sur la caractérisation des cellules souches tendineuses. Elles expriment divers marqueurs spécifiques aux tendons, tels que le scléraxis, la ténomoduline, les collagènes de types I, II et III, ainsi que la décorine et le biglycane, mais ce, de manière moins prononcée que les cellules progénitrices des tendons (TSPC) [172].

Pour produire un tendon fonctionnel, il est fondamental de comprendre les processus biochimiques et mécaniques qui interviennent dans la production des organoïdes tendineux. Maîtriser la physiologie du tendon est essentiel pour pouvoir cultiver *in vitro* un organoïde de tendon de manière efficace. Il est également important de sélectionner les bons composants cellulaires et de tenir compte des processus de

développement naturels *in vivo* pour obtenir une différenciation et une prolifération cellulaire *in vitro* qui imitent celles du corps, favorisant ainsi la synthèse de collagène.

L'objectif est de développer un organoïde de tendon *in vitro* destiné à tester des médicaments impliqués dans les tendinopathies. Il s'agit également de confirmer l'authenticité et la reproductibilité de ce modèle afin d'obtenir une alternative aux animaux de laboratoire utilisés dans le criblage de médicaments. Grâce à l'ingénierie tissulaire, nous avons développé des dispositifs permettant de produire du tissu tendineux. Nous avons supposé que l'exposition des organoïdes à des molécules connues pour provoquer des lésions tendineuses entraînerait des dommages similaires à ceux observés *in vivo*. Si les résultats confirment cette hypothèse, cela validerait la pertinence et la fiabilité du modèle *in vitro* pour examiner les effets des nouveaux traitements pharmacologiques sur les tendons.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Processus de fabrication et de caractérisation des scaffolds

1.1. Préparation de la solution de PCL

La préparation de la solution de polycaprolactone est la première étape de production des scaffolds. Dans un flacon en verre, du dichlorométhane (DCM) a été mélangé à du diméthylformamide (DMF) dans les proportions 60/40% respectivement. Des granules de polycaprolactone (Sigma-Aldrich, USA) ont été pesés à l'aide d'une balance tarée et versés dans le mélange. Le flacon contenant la solution a été agité intensivement toute la nuit sur un agitateur (IKA MS 3 basic) à une intensité de 750 tr/min pour permettre au polycaprolactone de se dissoudre dans les solvants [190]. Le flacon a été recouvert de Parafilm pour éviter toute évaporation durant la nuit.

1.2. Electrospinning

Les différents matériaux ont été réalisés à l'aide de la Spinbox by Bioinicia, qui est un appareil à la fois d'électrofilage et d'électropulvérisation, conçu pour la fabrication de fibres et de particules micro ou nanostructurées dans les laboratoires. L'électrospinning a été réalisé sur un cylindre rotatif en mouvement à une vitesse de 1900 à 2000 rpm (rotation par minute). La distance entre la pointe de l'aiguille de 19 Gauge et le collecteur était de 15 centimètres. Une haute tension de 12.5 kV a été appliquée pour créer une différence de potentiel. Le pousse seringue était réglé à un débit moyen de 13 μ L/min et les fibres ont été collectées sur du papier aluminium [190]. Ces paramètres définis ont été sélectionnés sur l'expertise du laboratoire et des

données bibliographiques afin d'obtenir des fibres alignées sans « perles » ou « billes », afin de permettre de créer un matériau imitant la structure morphologique naturelle, toujours dans un objectif de promouvoir la meilleure croissance cellulaire [190].

1.3. *Analyse au microscope électronique à balayage (MEB)*

La morphologie des fibres de chaque scaffolds produits a été examinée au SAPC, (Service d'analyses physico-chimiques) à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Quanta FEG 250). Cette étape nous a permis de vérifier l'alignement des fibres et de déterminer le diamètre des fibres. Les diamètres sont analysés à l'aide du logiciel Image J.

1.4. *Analyse des propriétés du matériau électrospinné*

1.4.1. Mesure de l'épaisseur

Chaque scaffold produit a été analysé pour déterminer ses caractéristiques. La première analyse permet d'estimer l'épaisseur du matériau à l'aide d'une jauge d'épaisseur (EV 06B, Elastocon, Suède) selon la norme ISO 5084 pour les textiles. Deux lames de verre ont été placées l'une contre l'autre pour effectuer la tare, puis le scaffold d'intérêt a été positionné entre deux autres lames de verre avant de mesurer son épaisseur. Les tests ont été réalisés avec des scaffolds secs et humides, soit en présence de PBS (« Phosphate Buffered Saline », une solution tampon phosphate-saline) pendant une heure, soit en présence de milieu complet standard pendant 24 heures pour analyser l'impact de la chaleur sur le matériau.

1.4.2. Mesure de la résistance à la traction

Pour calculer la résistance à la traction des différents matériaux, une machine d'essai de traction MTS Synergie 400 (MTS System, USA) et une machine Bose Biodynamic 5100 (TA Electroforce®, USA) ont été utilisées. La première a permis d'analyser des scaffolds secs et humides non ensemencés. La seconde machine, possédant une chambre hermétique, a permis d'analyser des scaffolds ensemencés avec des cellules vivantes. Dans les deux cas, les scaffolds étaient maintenus par des mors et soumis à des forces de traction à l'aide d'un capteur de force de 100 Newtons pour la machine MTS Synergie 400 et de 200 Newtons pour la machine de traction Bose Biodynamic 5100, avec une vitesse de l'ordre de 0.1 mm.s^{-1} à température ambiante. Les valeurs obtenues ont permis de calculer le module de Young et cela a pu être possible à l'aide d'un logiciel GraphPad InStat.

Le module de Young, également appelé module d'élasticité, mesure la rigidité d'un matériau. Un module de Young élevé indique un matériau rigide résistant à la déformation élastique sous une charge, alors qu'un module de Young faible indique un matériau plus élastique et moins rigide. Le module de Young est calculé en utilisant la relation entre la contrainte (σ) et la déformation (ϵ) du matériau.

Où :

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad \sigma = \frac{F}{A_0} \quad \epsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

- **E** représente le module de Young en pascals (Pa), souvent exprimé en gigapascals (GPa).
- **σ** est la contrainte normale appliquée sur le matériau, calculée comme la force par unité de surface, où F est la force appliquée et A_0 est la section transversale initiale du matériau.
- **ϵ** est la déformation unitaire du matériau, définie comme le changement relatif de longueur, où ΔL est le changement de longueur du matériau et L_0 est la longueur initiale.

1.5. Préparation du matériau pour la culture cellulaire

Le scaffold produit a ensuite été préparé pour pouvoir être ensemencé dans le bioréacteur dynamique. Pour ce faire, le matériau a d'abord été découpé à l'aide de pinces et d'un scalpel pour obtenir des morceaux de scaffolds de 0.9x6cm, s'insérant parfaitement bien dans le bioréacteur et facilitant sa manipulation. Dans un second temps, sous un PSM II, les scaffolds ont été stérilisés en étant entièrement immergés dans de l'alcool à 70 degrés pendant 45 minutes avant de subir trois lavages de PBS successifs de 10 minutes chacun. Lorsque la stérilisation est terminée, les scaffolds sont placés dans un incubateur à 37°C, qui correspond à une atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂ en présence de milieu complet toute la nuit pour avoir une adsorption de protéines adhésives du SVF (sérum de veau fœtal) sur le matériau et ainsi favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire.

2. Préparation des cultures cellulaires

2.1. La congélation et la décongélation cellulaire

Les cellules que nous utilisons proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection), qui est à la fois une société privée américaine à but non lucratif et un centre mondial de ressources biologiques. Ces cellules sont des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (PCS-200-012) multipotentes

isolées de la moelle osseuse d'un donneur. Après réception, ces cellules doivent être stockées dans des ampoules et placées dans un récipient contenant de l'azote. La cryoconservation permet de préserver les échantillons biologiques tels que des tissus, des cellules, à une température extrêmement basse, inférieure à -180°C . Ce processus stoppe toutes les activités biologiques et chimiques permettant de conserver les échantillons à long terme et sans aucune dégradation. La conservation des cellules se fait en présence d'un agent cryoprotecteur, le diméthyle sulfoxyde (DMSO) qui est un composé organique chimique qui a la capacité de pénétrer les membranes cellulaires. Il permet d'éviter le stress cellulaire lors du processus de congélation-décongélation car il aide à prévenir la formation de cristaux de glace, pouvant entraîner des dommages sur les échantillons lorsqu'ils sont congelés.

Les cellules sont cultivées puis centrifugées lorsqu'elles ont atteint la densité cellulaire souhaitée. Le culot doit être resuspendu dans 1 mL de solution de congélation (10% de DMSO, 40% de SVF et 50% de milieu de culture complet) avant d'être stérilisé par filtration sur filtre seringue de $2\mu\text{m}$ pour éliminer tous les débris et agrégats cellulaires. Après le transfert des cellules dans les ampoules étiquetées, il faut les fermer hermétiquement pour éviter toute contamination ou fuite. Les ampoules sont placées dans un récipient spécifique qui contient de l'isopropanol, appelé Mister Froster, lui-même placé dans un congélateur à -80°C . Ce dernier permettra une congélation en douceur des cellules avec une baisse de 1 degré toutes les une minutes et trente secondes. Après quelques heures ou quelques jours, les ampoules pourront être transférées à l'azote liquide à -180°C .

La décongélation quant à elle doit être extrêmement rapide car le DMSO, qui est à une concentration de 10%, est toxique pour les cellules à température ambiante. Chaque ampoule décongelée au bain marie solide à 37°C est mis en culture le plus rapidement possible dans du milieu complet.

Les cellules possèdent un nombre limité de passages. De ce fait, il est important de congeler les cellules lorsqu'elles ont été peu de fois repiquées pour que lors de leur décongélation, nous puissions les utiliser plusieurs fois, évitant la réduction de leur capacité de prolifération et de différenciation.

2.2. *La culture cellulaire*

Les deux types cellulaires utilisés ont été cultivés dans des flacons (T75) traités pour culture cellulaire (surface 75cm^2 , FALCON, ThermoFisher) en présence de milieux standards DMEM 1X (milieu Eagle modifié de Dulbecco, GIBCO) complétés à

10% de sérum de veau fœtal (SVF qualifié, GIBCO), 1% de Pénicilline/Streptomycine (10,000 Units/mL Pénicilline et 10,000 µg/mL, GIBCO) et 1% de L-Glutamine 200mM (100X, GIBCO) et ce, jusqu'à 80% de confluence. Les cellules étaient repiquées à une densité de 2000 cellules à 8000 cellules par centimètres carrés en suivant le protocole de repiquage classique des laboratoires. Ce protocole inclut une étape de trypsinisation (utilisant une solution de Trypsine-EDTA 0,05 %, 1x, GIBCO) des cellules pendant 5 minutes dans un incubateur à 37°C et 5% de concentration CO². La trypsinisation est arrêtée par l'ajout de SVF, puis la suspension cellulaire est transférée dans un tube Falcon et centrifugée à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans un volume défini de milieu de culture standard avant d'être compté à l'aide d'une plaque de Malassez. Les cellules sont ensuite placées dans une nouvelle flask T75 à la densité souhaitée et incubées à 37°C avec une concentration de 5 % en CO². Elles sont surveillées et entretenues régulièrement, avec des changements de milieu fréquents, tous les deux à trois jours, et repiquées lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence.

2.3. La culture dynamique

Les scaffolds ont été placés dans un bioréacteur dynamique, le MechanoCulture T6 (CellsScale, Canada) (*Figure 32*), permettant une stimulation uniaxiale de haute force pour six échantillons simultanément. Le laboratoire dispose de deux modèles de ce bioréacteur, dont l'un permet de séparer les scaffolds dans six chambres distinctes, facilitant ainsi les tests sous différentes conditions de culture ou de traitement. Les paramètres de stimulation ont été définis en se basant sur la littérature et les connaissances du laboratoire, notamment grâce aux thèses menées au sein du laboratoire. Le protocole expérimental comprenait deux jours de culture statique, suivis de 5 ou 12 jours de stimulation dynamique selon un modèle de rampe : une heure de traction à 5 % de déformation à une fréquence de 1 Hertz, puis 11 heures de repos. Ce cycle a été répété deux fois par jour pendant les périodes de traction. La T6 se compose d'une cuve en acier inoxydable, recouverte d'une fine couche de PDMS (polydiméthylsiloxane) à 10 % que nous réalisons pour éviter l'adhésion des cellules.

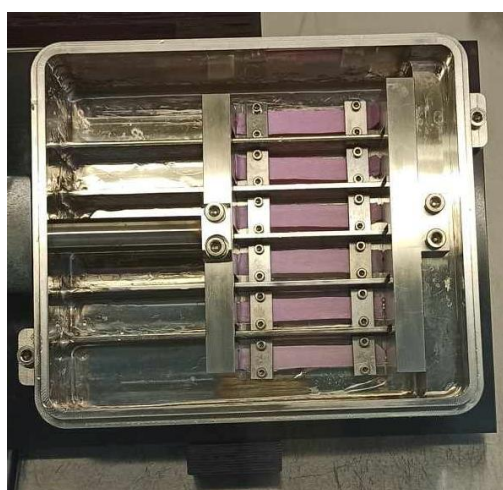


Figure 32 : Photographie de la cuve du bioréacteur contenant 6 scaffolds ensemenés - BMBI 2024

Elle est équipée de deux mors, l'un statique et l'autre mobile, qui permettent de fixer les scaffolds à l'aide de plaquettes et de vis. Un bras relie le mors mobile au moteur, permettant ainsi le mouvement de traction. Une fois les scaffolds fixés et ensemencés (*Figure 32*), un couvercle est placé sur le haut de la cuve pour garantir la stérilité tout en restant partiellement perméable pour permettre la diffusion des gaz.

2.4. La conservation

A la suite des cultures dynamiques ou statiques, les échantillons sont fixés afin de les conserver. Cette opération est réalisée à l'aide du paraformaldéhyde (PAF) à 4%, un poly-acétal formé à partir de la polymérisation du formaldéhyde qui lui, est un gaz. Des ampoules contenant 10mL de PAF à 16% sont diluées dans 30mL de PBS et les aliquotes produits sont stockés au congélateur. A l'arrêt de chaque manipulation, le milieu de culture dans lequel étaient présents les scaffolds ensemencés a été retiré et les scaffolds ont été placés dans des plaques à puits permettant leur transport sous la hotte. Le produit étant classé comme substance CMR (cancérogène, mutagène et toxique pour la reproduction) quelques millilitres de PAF ont été versés dans chaque puits de manière à ce que chaque échantillon soit entièrement recouvert de la solution pendant 20 à 30 minutes en fonction de l'épaisseur du matériau produit préalablement. Trois rinçages consécutifs avec du PBS pendant 10 minutes chacun ont été effectués après cette étape, avant de placer les échantillons au réfrigérateur dans du PBS.

3. Tests réalisés de manière générale

3.1. Analyses statistiques

Le test paramétrique ANOVA à un facteur a été utilisé. Ce test peut être utilisé si les données respectent les hypothèses de normalité et d'homogénéité. La normalité a été vérifiée par un test de SHAPIRO WILK. L'homogénéité a été vérifiée par un test de LEVENE modifié, nommé test de BROWN-FORSYTHE, basée sur les valeurs de la médiane, permettant d'améliorer la robustesse. La médiane est moins sensible aux valeurs aberrantes que la moyenne. Puis les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel InStat3.

3.2. Immunomarquage

3.2.1. Protocole d'immunomarquage

Les échantillons fixés dans du PAF et stockés au frais peuvent être utilisés pour faire de l'immunomarquage. Après 10 minutes de perméabilisation dans une solution de de PBS-TRITON X-100 à 0.5% (v/v) (VWR, Royaume-Uni) et trois lavages successifs de PBS, les échantillons ont été mis au contact d'une solution de BSA 2% (Bovine Serum

Albumin, Sigma-Aldrich, États-Unis) pendant une heure afin de bloquer les sites cellulaires non spécifiques. Afin de pouvoir observer les différents marqueurs d'intérêts, les constructions cellulaires ont été traités avec des anticorps primaires de lapin dirigés contre le collagène de type I (1 :100, AB138492, ABCAM), le collagène de type III (1 :100, AB7778, ABCAM), la ténomoduline (1 :100, AB203676, ABCAM), la scléroxis (1 :100, AB58655), la décorine (1 :100, AB175404, ABCAM), la ténascine-C (1 :100, AB108930) et l'ostéocalcine (1 :100, AB10911, ABCAM) pendant toute une nuit à 4°C. Les constructions cellulaires ont été ensuite mises au contact d'une solution d'anticorps secondaires de chèvre (A0545, SIGMA-ALDRICH) dirigés contre les immunoglobulines de type G de lapin et couplés à un fluorochrome Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). Pour observer la morphologie des cellules, de la rhodamine-phalloïdine et du 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, USA) ont été ajoutés à la solution d'anticorps secondaires. Les échantillons ont ensuite été montés entre lame et lamelle à l'aide du Mowiol (Calbiochem, USA) et les lamelles ont été scellées sur les lames avec du vernis à ongles pour éviter le dessèchement et le mouvement sous le microscope [169]. Les lames sont conservées au réfrigérateur jusqu'à l'observation.

3.2.2. Microscope confocal à balayage laser

Les lames marquées sont analysées au microscope confocal à balayage laser LSM980. Nous utilisons des lasers à différentes longueurs d'onde pour exciter différentes protéines d'intérêt marquées. Cela nécessite la configuration précise des paramètres d'acquisition tels que la résolution spatiale, les filtres d'émission et les paramètres de photodétection pour chaque marqueur spécifique. La technique de fluorescence à balayage laser permet de produire des images en trois dimensions des échantillons, garantissant une séparation nette des signaux fluorescents provenant des différentes cibles biologiques.

3.2.3. Microscope à fluorescence

Pour capturer des images avec un microscope à épifluorescence, nous utilisons des sources lumineuses à différentes longueurs d'onde pour exciter les protéines marquées d'intérêt. Ce processus nécessite de configurer plusieurs paramètres, y compris la sélection des filtres d'excitation et d'émission adaptés à chaque fluorophore, le réglage de l'intensité de la lumière, et l'ajustement du temps d'exposition. La technique d'épifluorescence permet de générer des images en deux dimensions des

échantillons marqués, ce qui facilite l'analyse de la localisation et de l'expression des protéines d'intérêt dans les cellules ou les tissus.

3.3. *Dosage de l'hydroxyproline*

Des dosages d'hydroxyproline ont été réalisés pour quantifier la teneur totale en collagène produite par les cellules sur un support en PCL électrospinné à l'aide d'un kit de dosage commercial (MAK008, Sigma-Aldrich, USA) selon un protocole établi au préalable et adapté à l'étude. Les structures ont été hydrolysées dans de l'acide chlorhydrique 12M (Sigma-Aldrich, USA) une nuit à 120°C. Les produits de l'hydrolyse sont centrifugés à 10 000 g durant 3 minutes et les surnageants de chaque condition ont été déposés dans des puits d'une plaque 96 puits et évaporés à l'étuve à 60°C pendant 3 heures. Deux solutions ont été préparées en quantités adéquates : l'une contenant 6 % de chloramine T complétée par du tampon d'oxydation, et l'autre constituée d'un mélange à parts égales de concentré de DMAB (para-diméthylaminobenzaldéhyde) et de solution d'acide perchlorique/isopropanol. Pour chaque puits contenant des échantillons et des standards, 100 µL de la solution de chloramine T/tampon d'oxydation ont été ajoutés. Les plaques ont été incubées à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, 100 µL de réactif DMAB dilué ont été ajoutés à chaque puits, suivis d'une incubation de 90 minutes à 60 °C. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 560 nm (A560) pour déterminer les résultats (Hydroxyproline Assay Kit, Catalog Number MAK008, SIGMA-ALDRICH).

3.4. *Mesure de l'absorbance de la LDH*

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la réaction de conversion du lactate déshydrogénase en pyruvate dans le cadre du métabolisme anaérobie. Il faut verser 12mL du tampon substrat dans un mélange de substrat puis secouer doucement. En parallèle, il faut centrifuger les aliquotes puis déposer 50µL de chaque surnageants en double exemplaire au fond des puits d'une plaque 96 puits non traitée pour la culture (Falcon, USA) à l'aide d'une pipette multipuits et ajouter 50µL de la solution préparée en amont. Après 30 minutes à température ambiante, verser 50µL de la solution STOP et analyser l'absorbance à 490 nanomètres à l'aide des lecteurs de microplaques multimode SPARK 10M (TECAN Trading AG, Suisse) et de iMark (Bio-Rad, USA).

4. Tests réalisés de manière spécifique

Cette partie apporte plus de détails pour deux parties du « Chapitre 3 » des organoïdes de tendons, respectivement pour la section 2 et 3.

4.1. Cultures dynamiques pour l'optimisation et la reproductibilité des résultats

4.1.1. Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène

Les tests de traction sont essentiels pour évaluer les propriétés mécaniques des scaffolds, notamment leur résistance et leur déformation sous charge. Dans cette partie de l'étude, des scaffolds en conditions sèches et dans des conditions humides (en présence de PBS pendant 24 heures à 37°C ou de milieu complet standard pendant une semaine à 37°C) ont été soumis à des tests de traction afin d'évaluer l'effet de l'humidité et des conditions de culture dans l'incubateur sur les propriétés mécaniques des scaffolds. Les tests de traction ont été réalisés à l'aide de la machine d'essai de traction MTS Synergie 400 (MTS System, USA) (Figure 33) pour calculer la résistance du collagène produit par les hBM MSC. Pour l'analyse temporelle de la production de collagène, un kit de test pour l'hydroxyproline a été employé.



Figure 33 : Photographie d'un scaffold lors d'un test de traction avec la MTS 400 - BMBI 2024

4.1.2. La résistance du collagène produit par les hBM MSC

Après une culture dynamique de 7 jours dans deux conditions différentes (supplémentation avec acide ascorbique et TGF- β 1 contre la dexaméthasone), la résistance à la traction des scaffolds produits a été mesurée dans la machine d'essai de traction Bose Biodynamic 5100 (TA Electroforce®, USA) qui possède une enceinte hermétique évitant la propagation d'éléments cellulaires lors des tests dans le laboratoire (Figure 34).



Figure 34 : Photographies de scaffolds lors de tests de traction avec la machine Bose Biodynamic 5100 - BMBI 2024

4.2. Co-cultures statiques en présence de médicaments

6 scaffolds ont étéensemencés pendant 8 jours dans du milieu complet supplémenté en acide ascorbique et TGF- β 1. Les biopuces utilisées ont été fabriquées par Rachid Jellali, ingénieur de recherche au laboratoire BMBI et appartenant à la fois à l'équipe CBB mais également à IFSB (Interactions Fluides Structures Biologiques). Avec son aide, les cellules hépatiques ont étéensemencées dans les biopuces la veille du contact avec les matériaux électrospinnés. Les biopuces sont fabriquées en résine en monocouche selon des protocoles déjà établis [138], [192].

Les scaffolds sont placés dans des inserts à membrane poreuse avant d'être installés dans des puits. Du milieu de culture est ajouté dans les deux compartiments mais seul le milieu présent dans le puits est en mouvement grâce à une pompe péristaltique. Ce dispositif protège les hBM MSC contre la circulation du fluide tout en optimisant un échange de nutriments grâce à la membrane poreuse. Le milieu de culture en mouvement ne nuit en aucun cas aux cellules hépatiques présentes dans les biopuces (Figure 35).

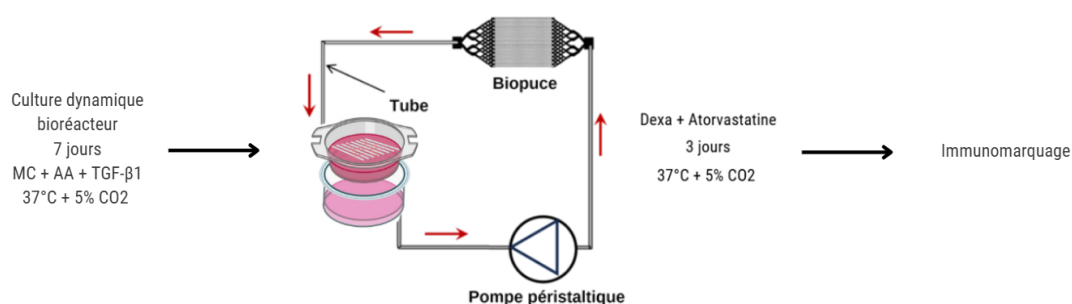


Figure 35 : Schéma récapitulatif de la co-culture foie-tendon

Les statines ont été solubilisées dans du DMSO, de la même manière que les constructions ont été traitées avec une concentration de DMSO de 0,02 %. Cette concentration correspond à celle observée lors des traitements à 0,5 μ M [193]. Les scaffolds sont restés 3 jours dans le système de co-culture ou en statique puis ont été fixés dans du PAF. Ils ont été par la suite immunomarqués et analysés.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

L'étude menée sur les organoïdes de tendon s'est organisée en trois étapes. La première a permis de déterminer les conditions optimales de culture en sélectionnant le milieu de culture le plus adapté lors de cultures statiques. Ensuite, des cultures dynamiques ont été réalisées pour optimiser et reproduire nos organoïdes. Enfin, lorsque nos organoïdes ont été finalisés, nous avons effectué une co-culture avec une biopuce hépatique afin de tester des molécules impliquées dans l'apparition de tendinopathies.

1. Cultures statiques pour déterminer les conditions optimales de culture

1.1. Objectifs

Différentes cultures statiques ont été réalisées afin de déterminer quelles étaient les conditions optimales de culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (hBM MSC). D'après les recherches effectuées dans la bibliographie, l'ajout d'acide ascorbique dans le milieu de culture complet favoriserait

la sécrétion de collagène par les cellules [174]. L'hypothèse initiale a été de comparer, dans des conditions de culture statique, des scaffolds ensemencés dans un milieu de culture complet standard avec ceux ensemencés dans un milieu de culture complet standard supplémenté en acide ascorbique. Des recherches bibliographiques concomitantes ont révélé le rôle du TGF- β 1 dans la ténogénèse et la synthèse de la matrice extracellulaire [157], [171], [172]. Cette information nous a incités à explorer les avantages potentiels de cultiver des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine en présence d'acide ascorbique et de TGF- β 1 à 5 μ g/ml. Le PCL a été sélectionné en raison de ses caractéristiques spécifiques et de sa facilité de manipulation, qui permettent d'obtenir des fibres alignées reproduisant une topographie similaire à celle d'un tendon *in vivo* [152].

Cette étape a eu pour but de comparer le comportement cellulaire des hBM MSC ensemencées sur du PCL comportant des fibres alignées en condition statique, en présence soit du milieu standard complet, soit supplémenté en acide ascorbique ou TGF- β 1 soit les deux et ce, à différents temps (J7 et J14). Nous avons entrepris d'analyser la morphologie des cellules, en particulier la forme des noyaux et du cytosquelette afin de vérifier si la différenciation des cellules souches en cellules tendineuses avait lieu même en l'absence de traction uniaxiale. En parallèle, nous avons étudié la répartition du collagène de type I produit par les ténocytes. De plus, nous avons cherché à détecter la présence d'un marqueur spécifique, la ténomoduline, et ce, à différents temps.

Les scaffolds produits ont donc été ensemencés et placés dans des plaques à 6 puits contenant du milieu complet seul, ou enrichi avec soit 50 μ M d'acide ascorbique, soit 5 μ g/ml de TGF- β 1, soit les deux. Les milieux ont été préparés à chaque changement de milieu. La culture a été interrompue à J7 pour la moitié des échantillons et à J14 pour l'autre moitié. Après fixation dans du PAF, les échantillons ont été immunomarqués pour visualiser le collagène de type I et la ténomoduline. Les analyses des deux marquages en épifluorescence ont été réalisées en maintenant les mêmes paramètres pour chaque échantillon tout au long des différentes analyses.

Au cours de cette manipulation, nous avons prévu de doser la LDH à différents moments de l'expérience pour évaluer la cytotoxicité et la viabilité des cellules hBM MSC cultivées dans les différentes conditions expérimentales. Des aliquotes de 300 μ L des milieux de culture ont été prélevés à chaque changement de milieu (J0, J1, J4, J7, J11 et J14) et ont été analysés à l'aide de l'iMark (Bio-Rad, USA) selon la méthode détaillée dans la partie « Matériels et méthodes ». Malheureusement, les résultats

n'ont pas abouti. Certaines valeurs étaient trop faibles par rapport aux témoins, voire négatives. Il est possible qu'une erreur de détection ou de manipulation se soit produite lors de la préparation. La LDH est une enzyme cytoplasmique. Lorsqu'elle est présente dans le milieu de culture, cela peut indiquer des dommages cellulaires ou une cytotoxicité, résultant d'un stress cellulaire, comme lors d'une supplémentation en facteurs de croissance à une dose trop élevée. Dans ce contexte, l'analyse devait apporter des informations sur le comportement des cellules face à nos conditions de culture expérimentales.

1.2. Résultats obtenus

Suite à la manipulation, nous avons pu observer les signaux de fluorescence des hBM MSC ensemencées sur des scaffolds dans différentes conditions (*Figure 36*). Pour cette étude, nous avons comparé les images obtenues dans différents milieux de culture par rapport à une condition de base. Cette dernière est définie comme la culture réalisée dans le milieu de culture complet standard. Toutes les cultures ont été analysées avec les mêmes paramètres de fluorescence. Bien que l'absence d'un contrôle négatif puisse limiter notre capacité à distinguer la fluorescence spécifique du bruit de fond, la comparaison directe avec la condition de base nous fournit un point de référence cohérent. Toutes les variations observées sont interprétées par rapport à cette condition standard, permettant d'évaluer les effets des différents milieux de culture de manière relative.

À J7, nous observons une légère augmentation de fluorescence dans deux conditions : avec de l'acide ascorbique seul et avec l'acide ascorbique associé au TGF- β 1. À J14, la fluorescence augmente visiblement lorsque les cellules sont cultivées avec le TGF- β 1 seul ou avec l'acide ascorbique et le TGF- β 1 combinés. Nous remarquons également que sans TGF- β 1, la production et la sécrétion de collagène de type I semblent plus élevées à J7 qu'à J14. Concernant l'échantillon traité avec du TGF- β 1 à J7, nous n'avons malheureusement pas pu analyser correctement les résultats car la lame présentait des problèmes de fluorescence. Il est possible que cela soit dû à une mauvaise manipulation de l'expérimentateur lors de l'immunomarquage ou du montage dans le MOWIOL, rendant les données inexploitable. Cependant, l'analyse de la fluorescence de l'anticorps dirigé contre la phalloïdine a montré que la présence de TGF- β 1 induisait une orientation plus marquée et plus prononcée du cytosquelette en comparaison avec les conditions sans TGF- β 1.

D'un autre côté, l'analyse de la ténomoduline n'a pas permis d'obtenir des résultats analysables pour plusieurs raisons possibles. Cela peut être causé par une potentielle absence de détection de la ténomoduline, une inefficacité de l'anticorps utilisé, ou une erreur lors de la manipulation. Selon la littérature, la présence de la ténomoduline est généralement observée au quatorzième jour de culture dynamique, ce qui suggère qu'en culture statique, son apparition pourrait être plus lente voire absente, étant donné que sa production est souvent stimulée par des contraintes mécaniques. La culture statique ayant constitué la base de mes recherches, nous nous sommes rendu compte des limites qu'elle présentait, ce qui nous a conduits à entreprendre les cultures en bioréacteur dynamique.

En conclusion, malgré que la fluorescence à J14 soit plus intense avec du TGF- β 1 seul qu'avec de l'acide ascorbique et du TGF- β 1 combinés, nous avons choisi cette dernière condition. Ce choix s'explique par les effets connus de l'acide ascorbique sur le collagène, notamment l'augmentation de son dépôt [171], ainsi que par l'influence du TGF- β 1 sur l'orientation du cytosquelette. Cette orientation favorise à la fois la production et la sécrétion de collagène, mais également la différenciation et la prolifération cellulaire [157], [172]. Notre objectif est de produire des cultures ayant une topographie similaire à celles que nous retrouvons *in vivo*, ce qui est crucial pour obtenir des résultats biomimétiques significatifs. Il est cependant important de noter que ces résultats sont préliminaires et basés sur des observations visuelles non quantifiées. Déterminer avec certitude quelle condition est la plus favorable entre l'utilisation d'acide ascorbique seul ou en combinaison avec le TGF- β 1 reste difficile. Néanmoins, les résultats obtenus avec la combinaison d'acide ascorbique et de TGF- β 1 semblent plus prometteurs que ceux obtenus avec le milieu complet seul.

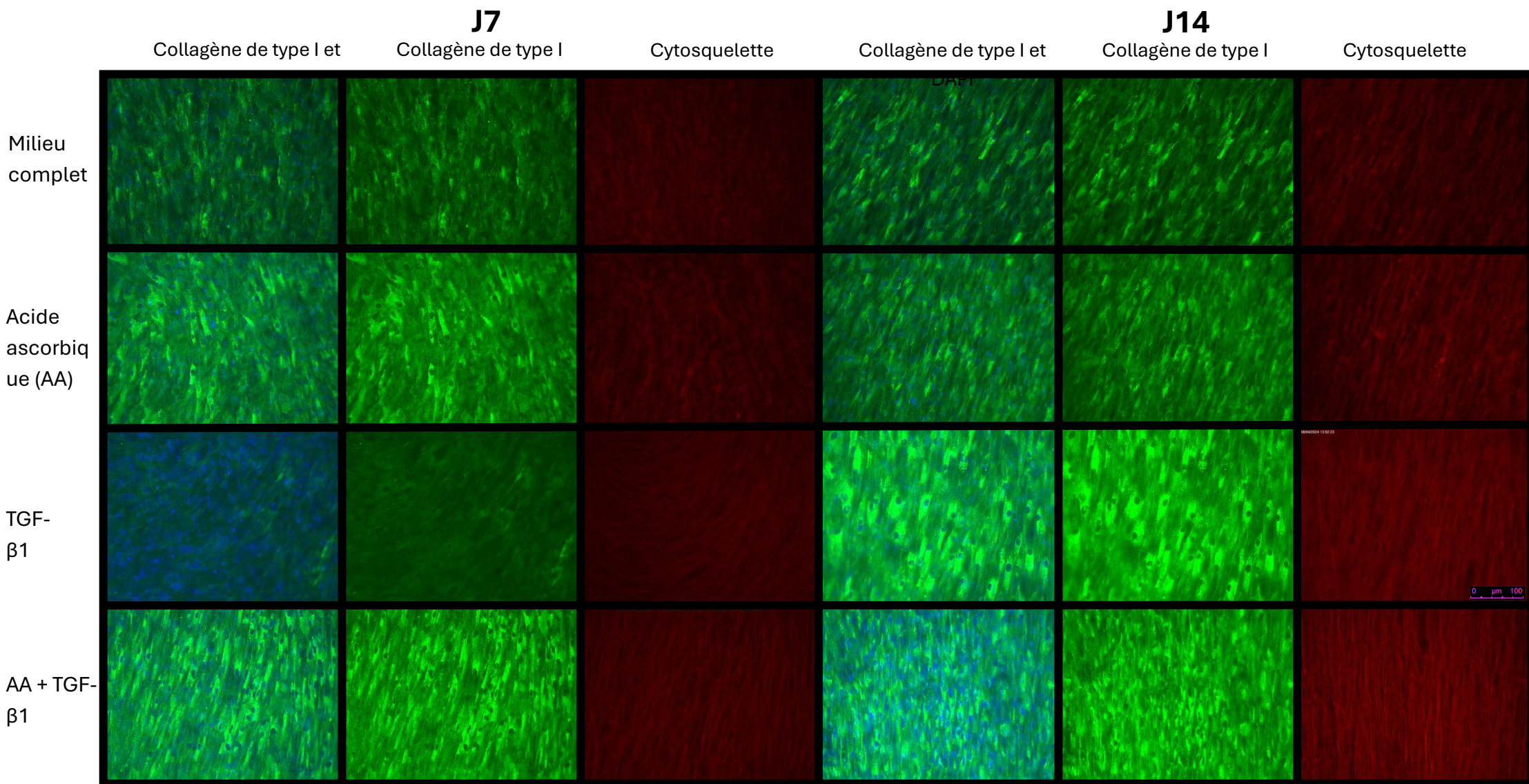


Figure 36 : Images du microscope à fluorescence (objectif x20) : analyse du collagène de type I (vert), du cytosquelette (rouge) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024

2. Cultures dynamiques pour l'optimisation et la reproductibilité des résultats

2.1. Objectifs

La production d'organoïdes de tendon vise à être reproductible. La reproductibilité tissulaire est essentielle pour tester différents médicaments dans des conditions identiques. Pour l'assurer, il est crucial de définir précisément et clairement les bases de production, ainsi que d'identifier les conditions qui nuisent à une production optimale et à l'obtention de résultats fiables. La culture dynamique requiert des matériaux suffisamment épais et rigides pour résister aux forces exercées par le bioréacteur et pour faciliter leur manipulation.

2.1.1. Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène

Des analyses de l'épaisseur et de la résistance à la traction des scaffolds en PCL ont été réalisées (voir « Matériels et méthodes : 1.4.2. et 4.1 »), ainsi que l'identification temporelle de la production maximale de collagène par les cellulesensemencées.

Les scaffolds doivent avoir une topographie et des propriétés similaires aux tendons *in vitro* afin de reproduire des conditions adéquates à la culture et à la différenciation cellulaire. Les études bibliographiques et celles du laboratoire ont mis en évidence l'avantage d'utiliser des fibres alignées plutôt que des fibres disposées de manière aléatoire, afin d'obtenir une topographie facilitant la production de collagène le long de l'axe de l'alignement des fibres [172]. Des scaffolds possédant des fibres disposées de manière aléatoire et produits par un doctorant nous ont été fournis pour les analyses afin de pouvoir mettre en évidence les différences de propriétés mécaniques entre ces deux dispositions de fibres. Les manipulations réalisées ont permis de déterminer quelle épaisseur était la plus appropriée pour réaliser les différentes expériences. Initialement, il était possible de juger intuitivement si cela fonctionnerait ou non, mais ces observations n'étaient que subjectives. Une mise en évidence des constatations a été réalisée par des données chiffrées.

Pour l'analyse temporelle de la production de collagène par les hBM MSC, les cellules souches ont été cultivées sur des fibres alignées en PCL. Les scaffolds ont ensuite été placés dans le bioréacteur dynamique avec des conditions de traction identiques et dans un milieu de culture complet standard. Trois points temporels (J5, J7 et J14) ont été prédéfinis afin de comparer et d'analyser le moment où la production de collagène était la plus élevée. Ces analyses nous ont permis de mieux comprendre la dynamique

de la production de collagène et d'optimiser les conditions de culture pour maximiser la qualité et la fonctionnalité des scaffolds produits.

2.1.2. La résistance du collagène produit par les hBM MSC

Une campagne visant à comparer la résistance à la traction de scaffoldsensemencés par les hBM MSC après 7 jours de culture dans deux conditions distinctes a été menée. La première condition comprend un milieu enrichi en facteurs de croissance comme défini lors de la culture statique et un autre contenant de la dexaméthasone à une dose toxique de 1000 nM [162]. L'objectif de cette étude était de comprendre l'impact des facteurs de croissance par rapport à un environnement stressant, induit par la dexaméthasone, sur la qualité et la résistance mécanique du collagène produit par les hBM MSC. Les facteurs de croissance sont connus pour favoriser la prolifération et la différenciation des cellules, ce qui peut conduire à une meilleure production de collagène tout en améliorant sa qualité. En revanche, la dexaméthasone à une dose toxique peut induire un stress cellulaire et altérer la synthèse de collagène : même à faibles doses, la dexaméthasone provoque une différenciation en cellules non tendineuses et stimule leur prolifération, ce qui peut conduire à la formation de tissus inappropriés dans les tendons traités [162]. En comparant ces deux conditions, nous espérons comprendre comment les hBM MSC se comportent face à des environnements favorables et stressants, afin de déterminer si le stress induit par la dexaméthasone compromet significativement la résistance à la traction du collagène produit. Cette comparaison nous permettra de mieux comprendre les conditions optimales pour la culture des organoïdes de tendons et d'améliorer les protocoles de production pour des applications thérapeutiques. Il est crucial d'être précis dans la préparation des milieux de culture et de maintenir des conditions expérimentales identiques pour chaque échantillon.

2.2. Résultats obtenus

2.2.1. Propriétés des scaffolds et analyse temporelle de la production de collagène

2.2.1.1. Propriétés des scaffolds

Dans notre étude sur la synthèse d'organoïdes de tendon, l'analyse des résultats du module de Young des scaffolds produits est essentielle. Les scaffolds doivent imiter les propriétés mécaniques spécifiques des tendons naturels et supporter des forces mécaniques. Le choix d'utiliser des scaffolds avec des fibres alignées par rapport aux fibres aléatoires est mis en évidence dans cette étude. Nous observons une différence extrêmement significative de tous les scaffolds produits avec des fibres alignées et

utilisés lors des manipulations, par rapport aux scaffolds produits avec des fibres disposées de manière aléatoire (*Figure 37*). Cette distinction souligne l'impact critique de l'organisation structurale des fibres sur les propriétés mécaniques des scaffolds. Les scaffolds fabriqués avec des fibres alignées montrent une rigidité plus soulignée, plus proche des propriétés des tendons naturels, ce qui les rend potentiellement plus adaptés pour supporter des charges mécaniques élevées et plus aptes à favoriser la différenciation et la prolifération des cellules souches.

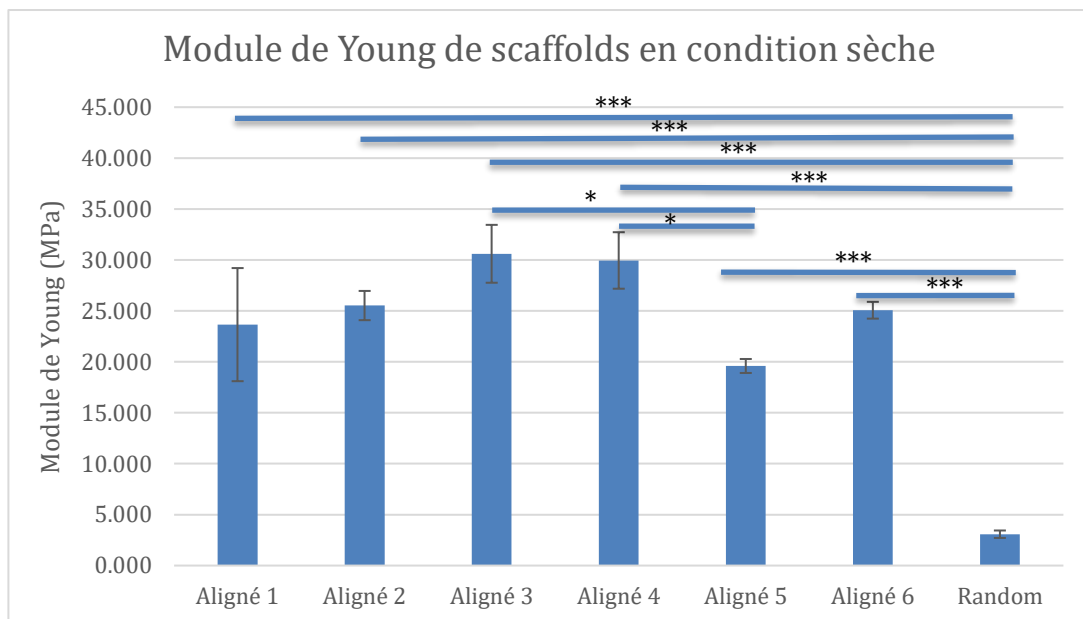


Figure 37 : Graphique représentant les différents modules de Young de différents scaffolds produits en conditions sèches, avec : * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$; ns = $p > 0.05$ - BMBI 2024

Nous avons observé des résultats similaires lorsque les tests de traction ont été effectués dans des conditions humides. Des différences significatives existaient entre les scaffolds produits avec des fibres alignées et ceux produits avec des fibres aléatoires. Cette différence peut s'expliquer par des variations de la taille des fibres et par des paramètres non ajustables au laboratoire (température et humidité). À titre indicatif, les analyses des épaisseurs des différents scaffolds utilisés pour les cultures dans le bioréacteur ont montré que l'épaisseur moyenne employée est de $347 \mu\text{m} \pm 51 \mu\text{m}$, ce qui nous permet d'obtenir des scaffolds épais et maniables pour réaliser la culture cellulaire, et suffisamment rigides pour résister aux tractions sans être totalement inétirables. En deçà, il devient compliqué de manipuler les scaffolds et leur module de Young peut diminuer. Il est donc primordial de garder les mêmes paramètres de production des scaffolds en PCL afin d'assurer la reproductibilité, car au sein même des productions, nous obtenons des variations.

2.2.1.2. Analyse temporelle de la production de collagène

Dans un autre temps, l'analyse temporelle de la production de collagène, mesurée par le dosage de l'hydroxyproline, a révélé une concentration de collagène nettement plus élevée après 7 jours de culture, de manière significative, comparée au contrôle et aux autres conditions. Cette constatation est en adéquation avec une étude précédente utilisant le phosphate d'ascorbyle de magnésium (MAP), un dérivé de l'acide ascorbique obtenu par modification chimique, qui a prouvé que la production était plus prononcée à J7 plutôt qu'à J14 ou J21 [174]. Cette observation nous a conduit à réduire les temps de culture des scaffoldsensemencés à 7 jours afin d'améliorer la productivité et le rendement.

Le graphique de la *Figure 38* illustre cette tendance. Nous observons une quantité plus importante de collagène au septième jour de culture. En optimisant la durée de culture à cette période, nous maximisons non seulement la production de collagène, mais nous réduisons également la consommation de milieux et de réactifs nécessaires pour des périodes de culture plus longues, augmentant ainsi l'efficacité globale du processus.

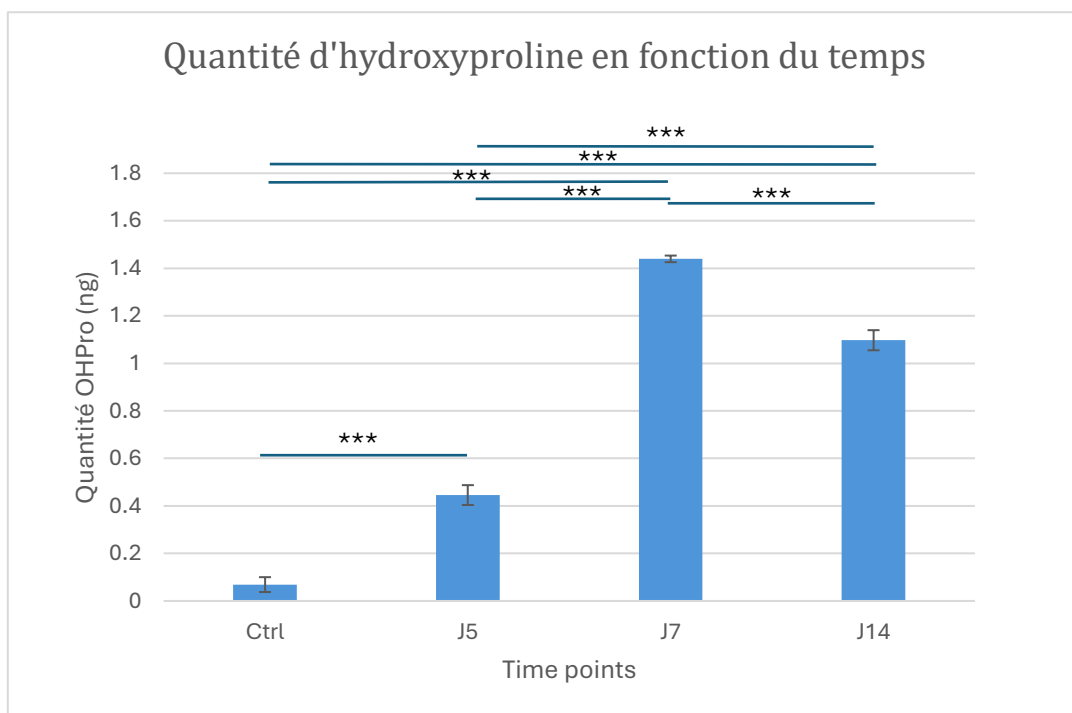


Figure 38 : Graphique représentant la quantité d'hydroxyproline en fonction du temps - BMBI 2024

Un immunomarquage a été réalisé sur des échantillons de scaffolds pour observer cette différence entre les différents time points (*Figure 39*). Comme nous pouvons le constater, une différence de fluorescence est visible et confirme visuellement ce que le dosage de l'hydroxyproline a révélé : la fluorescence du collagène de type I à J7 est plus intense comparée aux autres conditions. L'immunomarquage a également révélé une production de collagène de type III, un des collagènes présents dans les tendons, à partir de J7 et toujours présent à J14. Nous observons également un cytosquelette en rouge plus dense et plus présent, ce qui corrobore à la fois la forte activité cellulaire, la production et la sécrétion accrue de collagène à ce stade de culture.

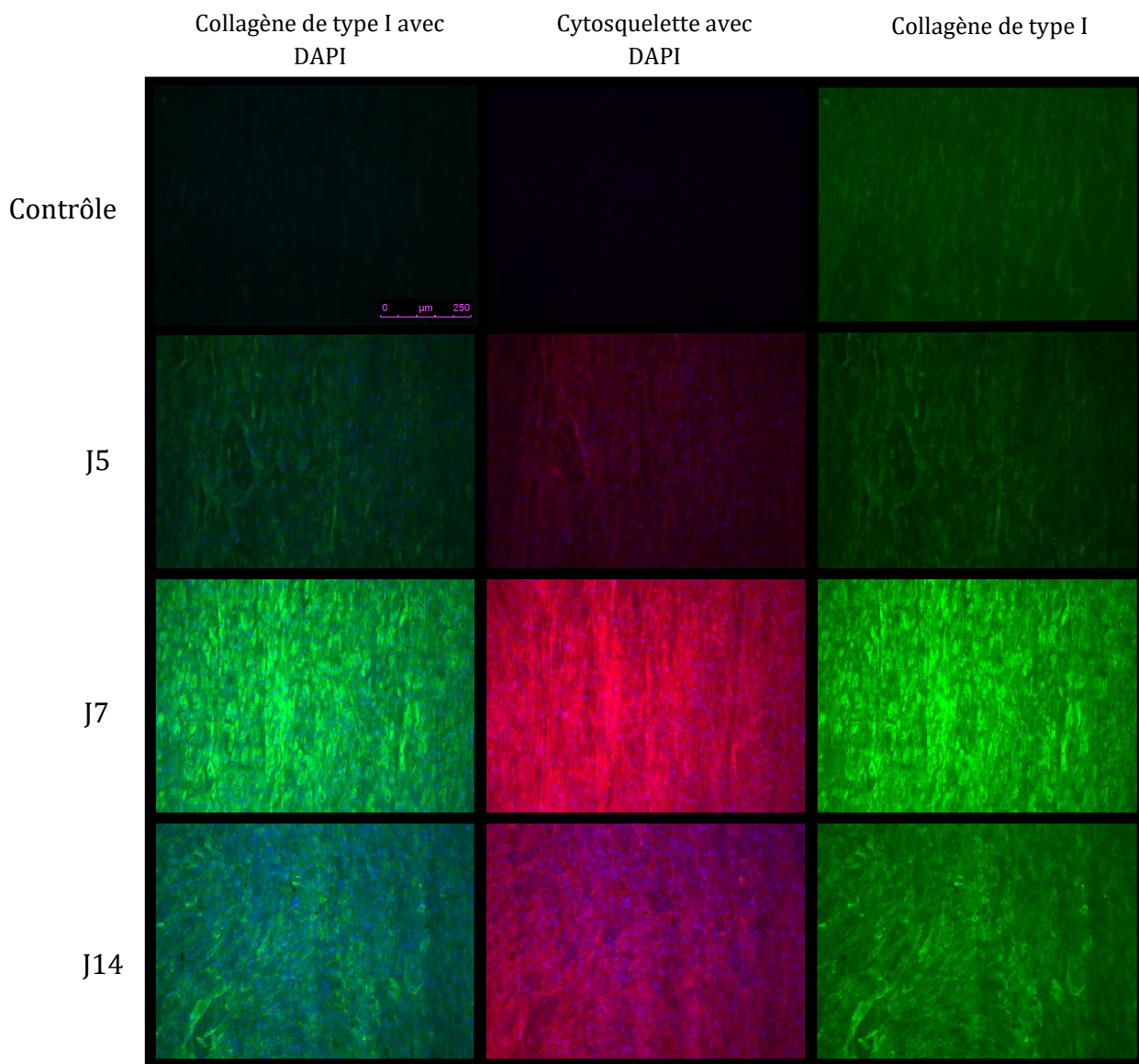


Figure 39 : Images du microscope à fluorescence, objectif x10 : analyse du collagène de type I (vert), du cytosquelette (rouge) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024

Une autre observation peut être faite lorsque nous analysons l'organisation du cytosquelette et du collagène de type I à J14 : nous constatons une désorganisation des fibres par rapport à J7. Cela pourrait suggérer une possible dégradation par des métalloprotéinases matricielles (MMP) ou une réorganisation structurelle possible du collagène et du cytosquelette à mesure que la culture progresse au-delà de 7 jours de culture. Les cellules subissent des changements impactant la composition et la structure de la MEC au cours du temps. Ces processus sont normaux et ils reflètent la complexité de la régulation de la MEC dans les cultures.

Afin de s'assurer que notre expérience avait produit des cellules tendineuses, nous avons réalisé un immunomarquage supplémentaire en parallèle pour analyser les potentiels marqueurs tendineux présents (*Figure 40*).

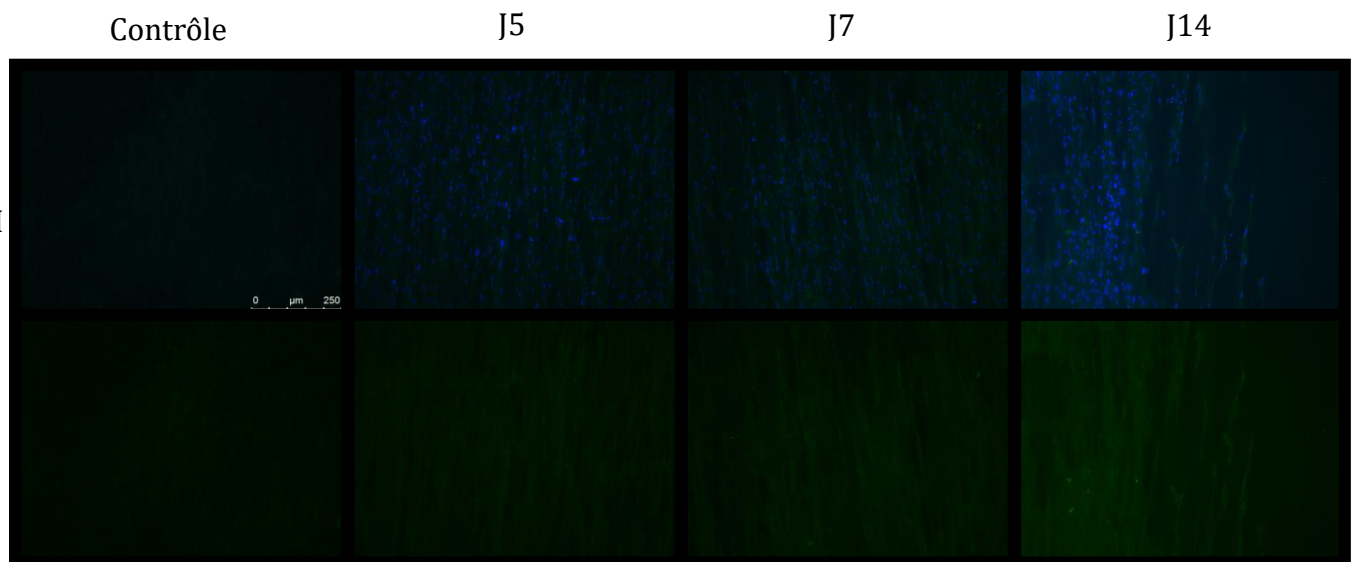


Figure 40 : Images du microscope à fluorescence (objectif x10) : analyse du scléroxis (vert) et des noyaux (bleu) - BMBI 2024

La ténomoduline et le scléroxis servent de référence dans les différentes études afin de prouver une différenciation en cellules tendineuses. Les résultats sont en faveur d'une différenciation cellulaire tendineuse positive lorsque les cellules sont soumises à des forces de traction uniaxiale. L'analyse n'étant pas quantitative, elle nous permet de s'assurer de la présence de ces marqueurs lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu complet standard.

Cette étude a mis en évidence que nous produisons bien des ténocytes à partir des cellules souches mésenchymateuses dans du milieu de culture complet, avec une sécrétion de collagène plus importante à J7. D'autres études dynamiques ont suivi afin

de comparer et de s'assurer de la différenciation en ténocytes dans le milieu choisi lors de l'étude statique et de la production de collagène.

2.2.2. La résistance du collagène produit par les hBM MSC

Des immunomarquages ont été réalisés sur les scaffolds dans les deux conditions définies précédemment. Les résultats étaient difficilement interprétables concernant le collagène de type I car il était présent dans les deux conditions. Cependant, l'analyse d'un marqueur ténocytaire dans les deux conditions tendait à montrer une diminution de l'expression de la ténomoduline en présence de dexaméthasone à une dose toxique. À l'issue de l'analyse, la quantité de cellules présentes dans la condition non toxique semblait plus élevée que dans la condition toxique.

Parallèlement, le calcul du module de Young a été effectué. Le graphique de la *Figure 41* présente les différents modules de Young calculés pour le même matériau en PCL mais dans des conditions expérimentales différentes. Les deux premières conditions (acide ascorbique avec du TGF- β 1 et dexaméthasone seule) représentent des scaffoldsensemencés avec des hBM MSC pendant une semaine dans le bioréacteur placé dans l'incubateur, tandis que les trois autres conditions (sec, humide et une semaine dans du milieu complet en statique dans l'incubateur) concernent des scaffolds sans cellules.

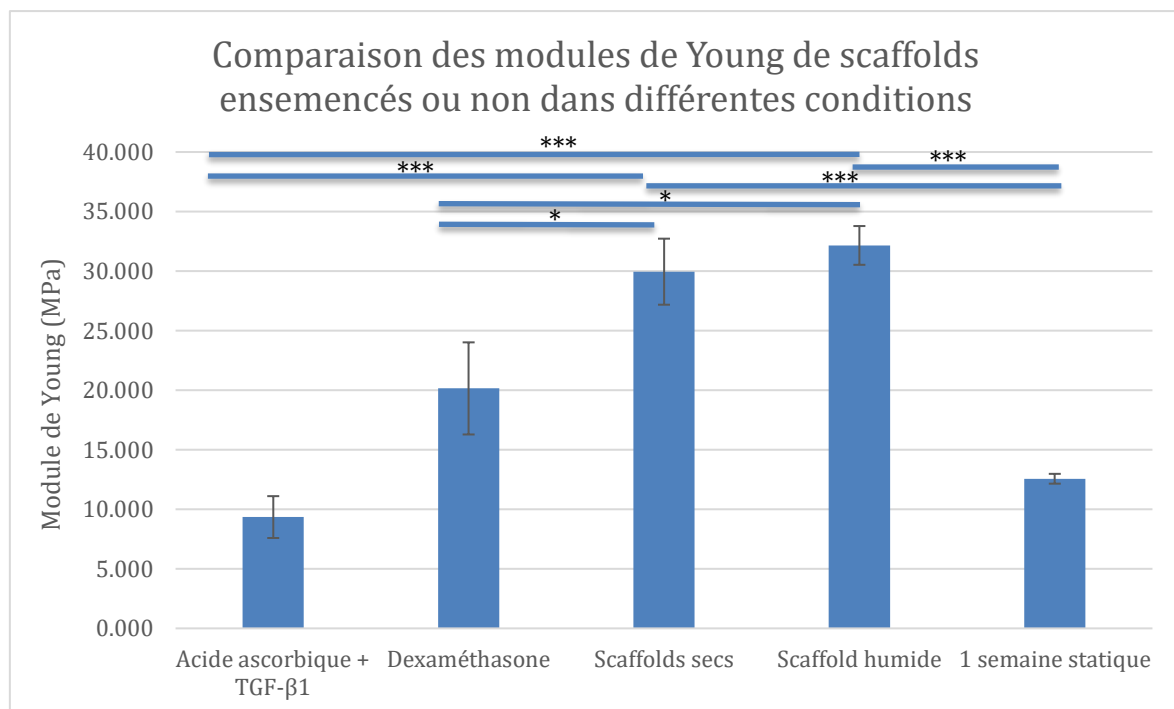


Figure 41 : Graphique comparant les modules de Young du même scaffolds dans différentes conditions avec : * = $p < 0.05$ – BMBI 2024

Pour les scaffolds non ensemencés, il n'y a pas de différences significatives entre la condition sèche (25,73 MPa) et la condition humide (22,433 MPa). Cependant, nous avons observé une différence significative ($p < 0.001$) de ces deux conditions avec le matériau présent dans le milieu de culture complet standard à 37°C pendant une semaine en statique. Cette différence pourrait s'expliquer par une possible dégradation du matériau due à la chaleur, étant donné qu'il n'y a pas de différence significative entre les scaffolds soumis à des tractions et ceux restés en condition statique 1 semaine dans le milieu de culture. Cette réduction peut être attribuée à une dégradation du PCL sous l'effet combiné de l'humidité et de la chaleur à 37°C. Ces conditions favorisent probablement des processus d'hydrolyse qui affaiblissent les liaisons polymériques, diminuant ainsi la rigidité du matériau.

Pour les scaffolds ensemencés, ceux traités avec de l'acide ascorbique et du TGF- β 1 possèdent la rigidité la plus basse (9,347 MPa) mais il n'y a pas de différence significative avec les scaffolds traités avec de la dexaméthasone comme nous le pensions. Malgré le fait que l'analyse statistique ne soit pas concluante, nous observons une tendance à une différence des résultats observés. Cette tendance pourrait ne pas atteindre la significativité en raison d'une puissance statistique insuffisante, probablement causée par la taille limitée des échantillons.

Il serait pertinent de répéter ces expériences en utilisant un plus grand nombre d'échantillons pour assurer la représentativité et la reproductibilité des résultats. L'effet de la dexaméthasone sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse favoriserait un phénotype ostéoblastique et permettrait d'organiser la matrice extracellulaire de manière à favoriser la minéralisation *in vitro* [194]. La dexaméthasone est reconnue pour stimuler la différenciation des cellules mésenchymateuses vers des lignées ostéoblastiques, induisant ainsi une augmentation de la production de collagène et d'autres protéines de la matrice osseuse, telles que l'ostéocalcine ou la phosphatase alcaline [195]. L'utilisation de la dexaméthasone pourrait impacter les cellules ensemencées sur les scaffolds en PCL. Elle pourrait indirectement inhiber la différenciation des cellules souches en ténocytes, ce qui expliquerait la quasi-absence de la ténomoduline et la présence de collagène, composant indispensable du tissu osseux. Cette condition pourrait également entraîner des ruptures. Il serait également judicieux d'analyser la taille des pores des scaffolds, car s'ils sont trop petits, l'infiltration cellulaire ne sera pas optimale [187].

3. Co-cultures statiques en présence de médicaments

3.1. Objectifs

Dans le cadre de nos recherches, nous avons réussi à développer des précurseurs d'organoïdes de tendon afin de les utiliser pour analyser les effets indésirables de certains médicaments. Afin de valider ce modèle, nous nous sommes appuyés sur des molécules déjà connues pour induire des lésions tendineuses. En exposant nos organoïdes à ces médicaments, nous avons émis l'hypothèse que la présence d'altérations tendineuses confirmerait la pertinence et la fiabilité de notre modèle *in vitro*. Cela nous permettrait de continuer à développer et à améliorer nos modèles pour l'étude des effets des nouveaux traitements pharmacologiques sur les tendons.

De nombreux médicaments sont administrés par voie orale, ce qui induit que l'application d'un traitement par contact direct avec les cellules tendineuses n'est pas représentative du trajet et de l'effet du médicament dans le corps humain. La prise orale d'un médicament entraîne, après une absorption dans le tractus gastro-intestinal, un passage de la substance active par le foie avant qu'elle ne soit présente dans la circulation systémique. Ce passage, détaillé précédemment, est l'effet de premier passage hépatique. Des réactions enzymatiques modifient le principe actif entraînant la formation de métabolites hydrosolubles facilement éliminables par les voies urinaires. Étant donné notre connaissance détaillée de la physiologie du foie et de ses rôles métaboliques, nous avons jugé pertinent de coupler nos organoïdes de tendons avec des biopuces hépatiques pour mieux imiter cet effet de premier passage. Nous avons donc développé un modèle de co-culture avec des cellules HepG2, cellules tumorales hépatiques qui expriment les cytochromes CYP1A2 et CYP3A4 [196]. Ces cytochromes permettent la métabolisation des trois médicaments appartenant aux classes thérapeutiques responsables de lésions tendineuses recensées. Cependant, par manque de temps, nous avons décidé de n'utiliser que la dexaméthasone et l'atorvastatine. Comme mentionné précédemment, il est possible de présenter une tendinopathie médicamenteuse à la suite de la prise concomitante de certaines classes thérapeutiques [182]. En combinant ces deux molécules, notre objectif était d'analyser leur impact potentiel sur la structure du collagène dans nos organoïdes tendineux.

L'objectif initial étant d'analyser les effets des molécules et/ou de leurs métabolites sur le tissu tendineux après passage hépatique, nous espérons qu'en mimant l'effet de

premier passage hépatique, les cellules HepG2ensemencés sur des biopuces permettraient de métaboliser les médicaments sélectionnés afin d'obtenir une altération du collagène et de notre tapis cellulaire. Par exemple, l'atorvastatine, médicament hypolipémiant, qui a une biodisponibilité de 12%, entraîne la production de métabolites responsables d'effets indésirables à l'encontre de nombreux tissus dont le tissu tendineux après sa métabolisation.

Nom de la molécule	Dexaméthasone	Atorvastatine
Classe thérapeutique	Glucocorticoïde	Hypolipémiant
Cytochrome métabolisant les molécules	CYP450 3A4	CYP450 3A4 et 3A5
Métabolites	6β-hydroxydexaméthasone	Ortho-hydroxyatorvastatine Para-hydroxyatorvastatine
Biodisponibilité	80%	12%
Forme active responsable des effets indésirables	Dexaméthasone	Atorvastatine et ses métabolites en ortho et para

Tableau 1 : Caractéristiques de la dexaméthasone et de l'atorvastatine

Trois conditions de culture ont été établies afin d'évaluer des potentiels effets indésirables : une culture statique de scaffoldsensemencés dans du milieu complet sans biopuce ; une culture statique de scaffoldsensemencés avec du milieu complet supplémenté avec la dexaméthasone et l'atorvastatine sans biopuce ; et une coculture dynamique scaffold-biopuce avec du milieu complet supplémenté avec de la dexaméthasone diluée au 1000^{ème} et de l'atorvastatine à une concentration de 5µM, comme la condition précédente.

3.2. Résultats obtenus

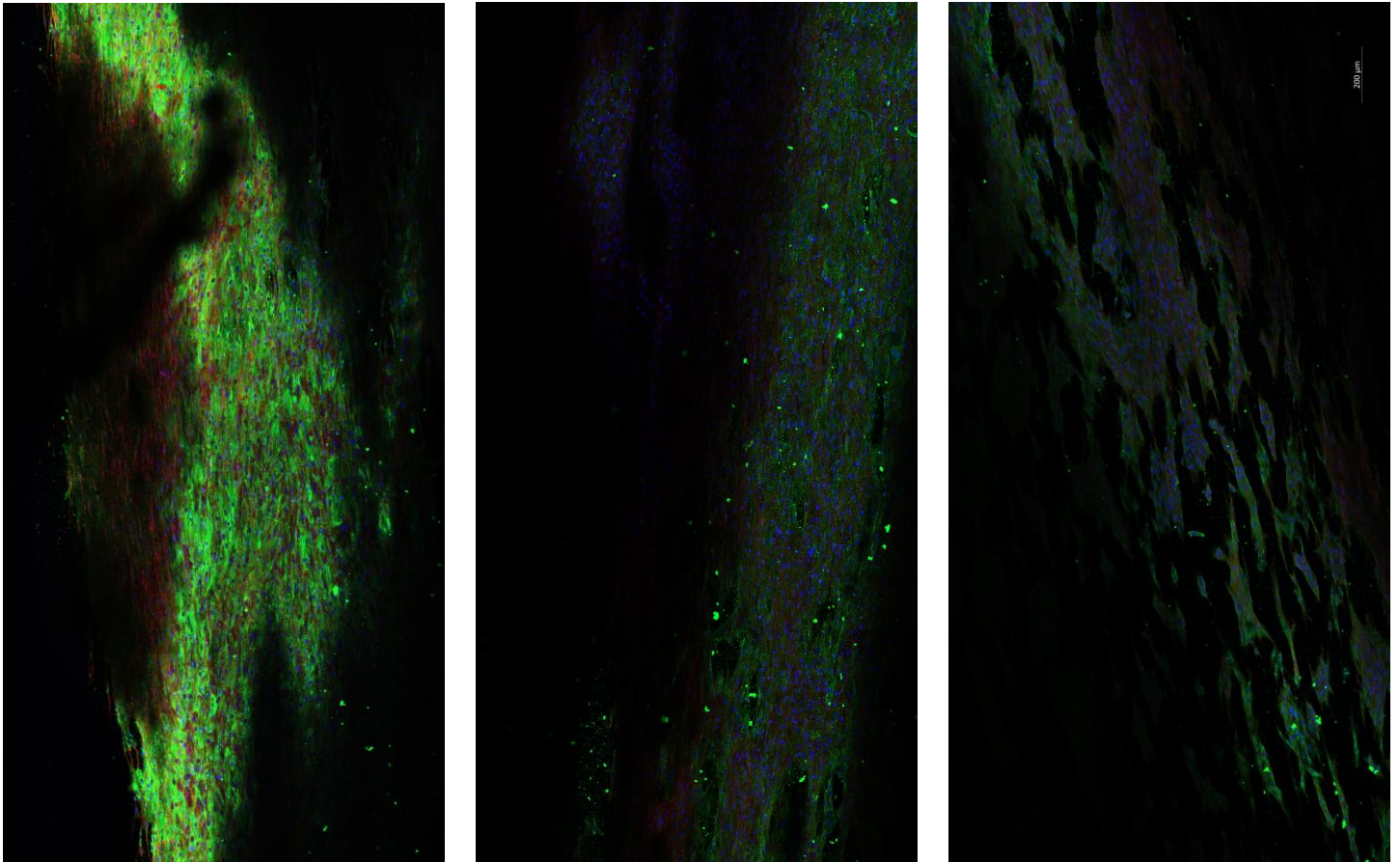


Figure 42 : Images du microscope confocal des organoïdes de tendons après la co-culture. La fluorescence en vert représente le collagène, en rouge le cytosquelette et en bleu les noyaux – BMBI 2024

L'analyse de la fluorescence des images obtenues au microscope confocal met en évidence une altération du tapis cellulaire (*Figure 42*). Dans la première condition, dans laquelle il n'y avait pas le système de co-culture mais seulement les scaffolds ensemencés en présence de milieu complet, nous remarquons une intensité fluorescente soutenue pour le collagène de type I : le tapis cellulaire semble uniforme. Dans la deuxième condition, sans la biopuce mais avec les molécules thérapeutiques présentes dans le milieu, nous observons une diminution du signal fluorescent du collagène, associée à une altération du tapis cellulaire par rapport à la première condition. Enfin, dans la troisième condition qui correspond à la co-culture dynamique, nous observons un faible signal fluorescent et une altération soutenue du tapis cellulaire. Il est donc probable que la métabolisation hépatique mimée par les HepG2 ait permis d'obtenir des métabolites actifs entraînant une altération de la MEC par une atteinte du collagène de type I. Étant donné que le milieu de culture circule dans le

puits inférieur à l'insert, il est peu probable que l'altération du tapis cellulaire soit due aux cisaillements du fluide.

Nous avons conscience que ces analyses sont qualitatives et nécessitent d'être reproduites, mais elles nous orientent vers le développement et l'amélioration de cette co-culture afin de mieux reproduire la physiologie humaine.

4. Discussion

La culture d'organoïdes de tendon sur un matériau électrospinné nécessite de nombreuses connaissances, notamment sur la physiologie et le développement *in vivo* du tissu tendineux, afin d'optimiser la culture de cellules souches mésenchymateuses *in vitro*. Des études ont mis en évidence que la supplémentation en acide ascorbique et en TGF- β 1 favorisait la ténogenèse, incluant une stimulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire en plus de favoriser une production accrue de collagène de type I, améliorant ainsi la qualité de la MEC [157], [171], [174]. Les cultures statiques réalisées au laboratoire nous ont permis de mettre en évidence de manière subjective cette amélioration avec une augmentation du taux de collagène au septième jour de culture et une meilleure orientation du cytosquelette, visible grâce au microscope à fluorescence. Nous savions que la supplémentation en acide ascorbique et en TGF- β 1 ne suffirait pas à obtenir des organoïdes de tendons de qualité : nous voulions mettre en évidence que cette supplémentation associée à une stimulation mécanique uniaxiale serait idéale pour synthétiser des tendons. En tenant compte des risques de rupture des tendons connus grâce à la bibliographie et aux expériences réalisées au sein du laboratoire, l'utilisation d'un programme cyclique d'une heure de traction à 5 % de déformation, à une fréquence de 1 Hertz et suivi de 11 heures de repos, nous a permis d'atteindre nos objectifs et ainsi d'obtenir une prolifération et une différenciation cellulaire adéquates [152], [176]. Cette hypothèse s'est révélée juste par la mise en évidence d'une augmentation de la production de collagène de manière significative au septième jour de culture dynamique en présence d'un milieu complet standard. De ce fait, nous espérons que la combinaison de ces deux expériences nous permettrait d'obtenir des scaffolds possédant une grande quantité de MEC, améliorant leurs propriétés mécaniques [175]. L'hypothèse d'obtenir un module de Young avec une valeur faible dans ces conditions, traduisant de meilleures propriétés élastiques que des scaffolds mis en culture dans des milieux sans facteurs de croissance ou traités par des drogues, n'a pu malheureusement pas être mis en évidence. Le manque de

scaffolds ensemencés nous a contraints à limiter le nombre d'échantillons utilisés pour des tests de tractions avec des cellules vivantes, ne nous permettant pas d'affirmer cette hypothèse. Malgré tout, ces tests n'étant qu'expérimentaux, n'attendent qu'à être reproduits afin de confirmer ou infirmer nos hypothèses. De plus, un dosage d'hydroxyproline a été réalisé afin de comparer la quantité de collagène produit sur des scaffolds ensemencés et traités avec un milieu de culture supplémenté en acide ascorbique et TGF- β 1 ou supplémenté en dexaméthasone à des doses toxiques. Cette expérience devra être répétée ultérieurement.

L'objectif initial étant de tester des médicaments sur les organoïdes de tendons, une première campagne de recherche a pu être entreprise avec l'aide de l'équipe du laboratoire d'IFSB afin de mettre en place des co-cultures foie-tendon. Les résultats de cette expérience ont mis évidence que la co-culture a entraîné une altération du collagène et du tapis cellulaire, probablement en raison de la métabolisation hépatique réussie et des effets indésirables des médicaments sur le tissu tendineux. Ces observations permettront d'orienter les décisions futures en lien avec le projet.

L'importance de développer des organoïdes est de pouvoir modéliser des organes ou des tissus possédant des propriétés et des fonctions identiques à l'*in vivo*. Que ce soit dans des conditions saines ou pathologiques, cette modélisation permet également de comprendre les mécanismes cellulaires et d'approfondir nos connaissances. L'utilisation des organoïdes comme alternatives aux animaux de laboratoires pour des études de drug screening ou pour d'autres applications biomédicales, offre une liberté dans le choix d'études. Par exemple, les scaffolds ensemencés pourront être glyqués pour simuler des tendons de patients diabétiques et/ou vieillissants afin de prendre en considération toutes les conditions possibles lors de tests de dépistage de médicaments.

Conclusion

Au vu du nombre élevé d'échecs lors des études cliniques et l'utilisation massive d'animaux au cours des phases précliniques, il était primordial de développer des modèles *in vitro* capables de reproduire fidèlement la physiologie humaine. Les organoïdes ont ainsi permis de mettre en place une alternative aux animaux de laboratoire pour différentes applications biomédicales. Ils peuvent être utilisés pour la modélisation de maladies, les études de drug screening, de toxicité, d'efficacité et de sécurité des médicaments, mais également pour des études de toxicité des produits chimiques [118]. Que ce soit pour reproduire un tissu sain ou malade, les organoïdes offrent la possibilité d'étudier la biologie cellulaire d'une autre manière et d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires. Un de leurs avantages est la possibilité de créer des structures biologiques tridimensionnelles à partir de n'importe quel patient, en utilisant des cellules souches ou à partir de biopsies tissulaires cancéreuses ou non [27]. Ces cellules peuvent être modifiées à l'aide de protocoles ou par des technologies d'édition du génome comme CRISPR-Cas9, permettant d'obtenir des organoïdes avec des modifications spécifiques, afin d'étudier leurs effets ou pour réparer des mutations [27]. Il est ainsi possible de modifier et d'analyser le génotype cellulaire pour comprendre la physiopathologie des maladies.

Les organoïdes permettent de reproduire la morphologie cellulaire et les fonctions des organes *in vivo*, participant ainsi à la découverte et au développement de médicaments car ils sont utilisés pour réaliser des études de toxicité, d'efficacité et de sécurité des candidats médicaments [33]. Ils permettent de prédire avec plus de précision les réponses des médicaments par rapport aux modèles animaux, voire de prédire les potentiels effets indésirables. Cependant, des limites existent et peuvent restreindre le développement d'un tel modèle d'étude. En fonction du type cellulaire choisi, il existe différentes limites comme la biodisponibilité des cellules, la variabilité entre les donneurs, la capacité à reproduire des fonctions spécifiques [137] mais également l'instabilité génétique des cellules [127]. Ces limites peuvent être accentuées par l'utilisation de composants animaux, indispensables aux fonctionnements cellulaires. Par exemple, l'utilisation de matrice extracellulaire d'origine animale de certains milieux de culture ou du sérum bovin, constituent des sources d'immunogénicité pouvant entraîner des réponses indésirables et des différences fonctionnelles par rapport aux organes natifs [40]. Une alternative à ces produits d'origine animale serait

de « synthétiser des produits chimiques purs et [d']extraire, purifier et propager des cellules ou des biocomposants dérivés de patients », ce qui favoriserait encore plus la ressemblance avec les conditions *in vivo* [40]. Des études sont encore à mener pour résoudre ces problèmes et consolider leurs utilisations.

Les avancées dans la bioingénierie ont permis de développer des modèles d'organoïdes sur puce. Ces modèles intègrent la microfluidique, technologie permettant de mieux reproduire l'environnement cellulaire et de favoriser le développement et la physiologie des cellules en culture, de manière plus représentative des conditions *in vivo* [139]. Tout comme les autres types d'organoïdes, les biopuces peuvent être utilisées pour la modélisation de maladies, le criblage de médicaments et la médecine régénérative [127], [139], mais elles présentent également leurs limites. L'origine et la variabilité des cellules sont toujours présentes mais il existe, par ailleurs, une diversité de fabrication au sein des différents laboratoires [139]. De plus, il est nécessaire de réussir à maintenir le dispositif intact sur du long terme. D'autres variabilités peuvent être surmontées par l'amélioration des processus de fabrication et l'intégration de nouveaux systèmes : impression 3D, ajouts de réseaux vasculaires, de composants de la MEC ainsi que l'intégration de sites immunisés pour répondre aux problèmes immunologiques [40]. Toutes ces modifications permettraient de diminuer l'écart physiologique avec le corps humain, rendant les biopuces prometteuses pour les différentes applications biomédicales des organoïdes.

De telles avancées favoriseraient davantage la commercialisation des biopuces afin de développer une médecine personnalisée, préventive, prédictive et participative. Actuellement, les grandes entreprises pharmaceutiques s'associent avec des start-ups afin de développer des plateformes d'organes sur puces pour le domaine de la recherche et du développement. Pfizer, GlaxoSmithKline, Sanofi et Roche ont collaboré avec Mimetas pour créer des modèles de cerveau et de rein sur puce, destinés à l'évaluation de la toxicité [118]. La réussite de ces modélisations est primordiale pour promouvoir l'intérêt de tels outils, d'autant plus par la possibilité de développer et de commercialiser des systèmes d'organes connectés. Ces systèmes permettent de mieux comprendre les interactions physiopathologiques entre différents organes et offrent la possibilité de prédire leurs comportements vis-à-vis de substances actives. Le foie est un organe clé dans le métabolisme des médicaments

et des toxines. En modélisant les fonctions hépatiques, en conditions saines ou pathologiques à travers de cultures multi-organes, il est possible de prédire la biotransformation et la toxicité des composés, ainsi que de suivre la formation de métabolites et les potentiels effets indésirables sur les autres organes connectés. Cette vision plus complète pourrait révolutionner le processus de développement pharmaceutique : elle pourrait réduire le nombre d'échecs cliniques en améliorant à la fois la sécurité et l'efficacité des nouvelles molécules mises sur le marché. Pour réussir à commercialiser des biopuces, il est primordial que la fabrication soit sophistiquée et fiable mais également compatible avec les systèmes de base que les laboratoires biotechnologiques utilisent habituellement. Avant d'être commercialisés, ces systèmes devront être validés par des autorités réglementaires, en s'assurant que les résultats soient robustes et reproductibles [118]. Ainsi, afin de favoriser cette dynamique et de continuer à reconnaître le potentiel de ces technologies à l'international [137], de nombreuses collaborations se créent entre différentes entreprises et institutions, réunissant de nombreux spécialistes, tels que des bioingénieurs, des pharmacologues, des biologistes, des toxicologistes et des physiciens [118], [127].

Bibliographie

- [1] LEEM - Les Entreprises du Médicament, "LEEM - Bilan économique - Secteur pharmaceutique dans le monde et en France en 2022 et 2023.," 2023.
- [2] ATRADIUS, "Pharmaceutiques, tendances en France et dans le monde." Accessed: Sep. 19, 2024. [Online]. Available: <https://atradius.fr/rapports/les-tendances-du-secteur-pharmaceutique-en-france-et-dans-le-monde-en-2022.html>
- [3] M. de l'Économie, des F. et de la S. industrielle et numérique Ministère de l'Europe et des Affaires étrangères, "Résultats du commerce extérieur français au premier semestre 2024." Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.tresor.economie.gouv.fr/Articles/2024/08/07/resultats-du-commerce-exterieur-francais-au-premier-semester-2023>
- [4] Entreprises Occitanie, "La première usine européenne de production de paracétamol s'installe près de Toulouse." Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.entreprises-occitanie.com/actualites/la-premiere-usine-europeenne-de-production-de-paracetamol-sinstalle-pres-de-toulouse>
- [5] des F. et de la S. industrielle et numérique, M. de la S. et de la P. M. de l'Économie, "FRANCE 2030 Relocalisation de médicaments innovants - Dossier de presse 13/06/2023."
- [6] MASTER 2 IBIS - Dr. Anne-Dominique LAJOIX, "Pharmaceutical Innovation," Montpellier, 2024.
- [7] LEEM, "L'industrie pharmaceutique : portrait d'un secteur stratégique pour la France," Sep. 2024. Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: www.leem.org
- [8] LEEM - Les entreprises du médicament, "Le médicament et son écosystème d'innovation. Innovation ouverte : pourquoi est-elle devenue incontournable ?" Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.leem.org/100-questions/innovation-ouverte-pourquoi-est-elle-devenue-incontournable?q=innovation%20pharmaceutique&hPP=5&idx=questions&p=1>
- [9] LEEM - Les Entreprises du Médicament, "Le marché pharmaceutique - Contexte économique." Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.leem.org/le-marche-pharmaceutique>
- [10] Légifrance - République française, "Code de la Santé Publique - Articles L5111-1 à L5111-4. Version en vigueur depuis le 22 mars 2022." Accessed: Sep. 13, 2024. [Online]. Available: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/
- [11] IMD - International Institute for Management Development, "Behind the design of the COVID vaccine was one company pivoting at lightning speed and taking leaps of faith - 2021." Accessed: Sep. 14, 2024. [Online]. Available: <https://www.imd.org/research-knowledge/entrepreneurship/articles/behind-the-design-of-the-covid-vaccine-was-one-company-pivoting/>
- [12] EFPIA - European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, "Commission européenne. 2015. Inventaire des mesures incitatives de l'Union et des États membres pour soutenir la recherche, le développement et la disponibilité des médicaments orphelins — état des lieux en 2015."
- [13] ORPHANET, "Les médicaments orphelins aux Etats-Unis d'Amérique." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.orpha.net/fr/other-information/about-orphan-drugs?stapage=usa#:~:text=Lorsque%20le%20m%C3%A9dicament%20obtient%20le%20statut%20de%20m%C3%A9dicament>
- [14] EUR-Lex, "Règlement (CE) no 141/2000 concernant les médicaments orphelins." Accessed: Sep. 14, 2024. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/LSU/?uri=CELEX:32000R0141#:~:text=R%C3%A8glement%20%28CE%29%20n%20o%20141%2F2000%20concernant%20les%20m%C3%A9dicaments,de%20diagnostiquer%20et%20de%20traiter%20les%20affections%20rares.>

- [15] European Commission, "Horizon Europe." Accessed: Sep. 14, 2024. [Online]. Available: https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe_en
- [16] M. C. Chemtob Concé, "Le médicament orphelin: un cadre juridique incitatif," *Medecine et Droit*, no. 81, pp. 176–184, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.meddro.2006.10.002.
- [17] BPI France, "Récapitulatif des principales aides spécifiques aux projets innovants." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://bpifrance-creation.fr/encyclopedie/aides-a-creation-a-reprise-dentreprise/aides-a-linnovation/recapitulatif-principales>
- [18] LABTOO, "Contract Research Organization : Comment bien choisir son prestataire de services en R&D ? ." Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.labtoo.com/fr/blog/contract-research-organization>
- [19] IQVIA, "Emerging Biopharma's Contribution to Innovation - 2022."
- [20] F. Guan *et al.*, "Integrative omics of schizophrenia: from genetic determinants to clinical classification and risk prediction," Jan. 01, 2022, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41380-021-01201-2.
- [21] P. Yang *et al.*, "Safety and efficacy of ATSN-101 in patients with Leber congenital amaurosis caused by biallelic mutations in GUCY2D: a phase 1/2, multicentre, open-label, unilateral dose escalation study." [Online]. Available: www.thelancet.com
- [22] ATSENA THERAPEUTICS, "ATSENA THERAPEUTICS."
- [23] La Ligue contre le cancer, "Les différentes phases des essais cliniques."
- [24] "Addressing unmet needs in extremely rare and paediatric-onset diseases: how the biopharmaceutical innovation model can help identify current issues and find potential solutions," 2021. [Online]. Available: www.dolon.com
- [25] EFPIA - European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, "Challenges and facilitators in the development of orphan and paediatric medicines."
- [26] V. D. Mouchlis *et al.*, "Advances in de novo drug design: From conventional to machine learning methods," Feb. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22041676.
- [27] J. Kondo and M. Inoue, "Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy," May 01, 2019, *MDPI*. doi: 10.3390/cells8050470.
- [28] N. Berdigaliyev and M. Aljofan, "An overview of drug discovery and development," May 01, 2020, *Future Medicine Ltd*. doi: 10.4155/fmc-2019-0307.
- [29] J. Lyu, J. J. Irwin, and B. K. Shoichet, "Modeling the expansion of virtual screening libraries," *Nat Chem Biol*, vol. 19, no. 6, pp. 712–718, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41589-022-01234-w.
- [30] G. A. Van Norman, "Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?," *JACC Basic Transl Sci*, vol. 4, no. 7, pp. 845–854, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008.
- [31] C. Liu, T. Qin, Y. Huang, Y. Li, G. Chen, and C. Sun, "Drug screening model meets cancer organoid technology," Nov. 01, 2020, *Neoplasia Press, Inc*. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100840.
- [32] Institut national du cancer, "Incidence nationale des cancers en 2023 - Panorama des cancers en France," Jul. 2023.
- [33] S. Yang *et al.*, "Organoids: The current status and biomedical applications," *MedComm (Beijing)*, vol. 4, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1002/mco2.274.
- [34] Z. Li *et al.*, "Human Lung Adenocarcinoma-Derived Organoid Models for Drug Screening," *iScience*, vol. 23, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101411.

- [35] H. H. N. Yan *et al.*, “A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening,” *Cell Stem Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 882-897.e11, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.09.016.
- [36] S. Rauth, S. Karmakar, S. K. Batra, and M. P. Ponnusamy, “Recent advances in organoid development and applications in disease modeling,” Apr. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188527.
- [37] A. Barbáchano *et al.*, “Organoids and colorectal cancer,” Jun. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/cancers13112657.
- [38] H. Takeda *et al.*, “CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 31, pp. 15635–15644, Jul. 2019, doi: 10.1073/pnas.1904714116.
- [39] B. M. Baker and C. S. Chen, “Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues,” *J Cell Sci*, Jan. 2012, doi: 10.1242/jcs.079509.
- [40] N. Roberto de Barros *et al.*, “Engineered organoids for biomedical applications,” Dec. 01, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.addr.2023.115142.
- [41] L. Wu, D. Vllasaliu, Q. Cui, and B. T. Raimi-Abraham, “In Situ Self-Assembling Liver Spheroids with Synthetic Nanoscaffolds for Preclinical Drug Screening Applications,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 16, no. 20, pp. 25610–25621, May 2024, doi: 10.1021/acsami.3c17384.
- [42] Association canadienne des victimes de la thalidomide, “Qu’est-ce que la thalidomide?” Accessed: Oct. 01, 2024. [Online]. Available: <https://thalidomide.ca/quest-ce-que-la-thalidomide/>
- [43] VIDAL, “THALIDOMIDE ACCORD 50 mg gél.” Accessed: Oct. 01, 2024. [Online]. Available: https://evidal-vidal-fr.gorgone.univ-toulouse.fr/medicament/thalidomide_accord_50_mg_gel-208812.html#contre_indications
- [44] G. A. Van Norman, “Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?,” *JACC Basic Transl Sci*, vol. 4, no. 7, pp. 845–854, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008.
- [45] T. B. Andersson, “Evolution of Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates,” Oct. 01, 2017, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/bcpt.12804.
- [46] Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche, “Utilisation d’animaux à des fins scientifiques dans les établissements français-Enquête statistique 2022,” 2024.
- [47] International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC), “International Knockout Mouse Consortium (IKMC).” Accessed: Sep. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.mousephenotype.org/about-impcc/about-ikmc/>
- [48] V. K. Singh and T. M. Seed, “How necessary are animal models for modern drug discovery?,” 2021, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/17460441.2021.1972255.
- [49] European Commission, “Animals in science.” Accessed: Sep. 25, 2024. [Online]. Available: https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/animals-science_en
- [50] Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche, “Utilisation d’animaux à des fins scientifiques dans les établissements français-Enquête statistique 2022,” 2014.
- [51] EUR-Lex, “Règlement (UE) 2019/1010 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019,” 2019.
- [52] W. M. S. Russell and R. L. Burch, “The Principles of Humane Experimental Technique THE SOURCES, INCIDENCE, AND REMOVAL OF INHUMANITY The Removal of Inhumanity: The Three R’s.”
- [53] Y. Hu *et al.*, “Research progress and application of liver organoids for disease modeling and regenerative therapy,” Jul. 01, 2024, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00109-024-02455-3.

- [54] S. Bartfeld and H. Clevers, "Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment," *J Mol Med*, vol. 95, no. 7, pp. 729–738, Jul. 2017, doi: 10.1007/s00109-017-1531-7.
- [55] C. Corrà, L. Novellademunt, and V. S. W. Li, "A brief history of organoids," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 319, no. 1, pp. C151–C165, Jul. 2020, doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [56] W. Li *et al.*, "Recent Advances in Electrospinning Techniques for Precise Medicine," Jan. 01, 2024, *American Association for the Advancement of Science*. doi: 10.34133/cbsystems.0101.
- [57] C. Xinaris, V. Brizi, and G. Remuzzi, "Organoid Models and Applications in Biomedical Research," *Nephron*, vol. 130, no. 3, pp. 191–199, 2015, doi: 10.1159/000433566.
- [58] MASTER 2 IBIS - Karima Mezghenna, "Médecine personnalisée ou médecine de précision," Montpellier, 2024.
- [59] K. Slim, M. Selvy, and J. Veziat, "Conceptual innovation: 4P Medicine and 4P surgery," Jun. 01, 2021, *Elsevier Masson s.r.l.* doi: 10.1016/j.jviscsurg.2021.01.003.
- [60] F. Bessaguet and A. Desmoulière, "Le foie," *Actualites Pharmaceutiques*, vol. 60, no. 605, pp. 57–61, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.actpha.2021.02.013.
- [61] N. Prior, P. Inacio, and M. Huch, "Liver organoids: From basic research to therapeutic applications," Dec. 01, 2019, *BMJ Publishing Group*. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319256.
- [62] S. Tran *et al.*, "Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis," *Immunity*, vol. 53, no. 3, pp. 627–640.e5, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.003.
- [63] S. J. Park, J. Garcia Diaz, E. Um, and Y. S. Hahn, "Major roles of kupffer cells and macrophages in NAFLD development," 2023, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fendo.2023.1150118.
- [64] D. R. Kamm and K. S. McCommis, "Hepatic stellate cells in physiology and pathology," *Journal of Physiology*, vol. 600, no. 8, pp. 1825–1837, Apr. 2022, doi: 10.1113/JP281061.
- [65] E. Trefts, M. Gannon, and D. H. Wasserman, "The liver," Nov. 06, 2017, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [66] Le Manuel MSD, "Structure et fonction du foie."
- [67] M. Ogawa *et al.*, "Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-26764-0.
- [68] Centre Hépatobiliaire Paul Brousse, "Le Foie et les Voies biliaires : Anatomie." Accessed: Sep. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html>
- [69] AFEF - Société française d'hépatologie, "Anatomie de mon foie." Accessed: Sep. 28, 2024. [Online]. Available: <https://afef.asso.fr/anatomie-de-mon-foie/>
- [70] Centre Hépatobiliaire Paul Brousse, "Les Dosages sanguins liés aux maladies hépatiques." Accessed: Sep. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/soin-traitement/examens/dosage-sanguin.html>
- [71] A. O. 3, P. G. Paolo Caraceni, "Long-term albumin treatment in patients with cirrhosis and ascites," vol. Volume 76, Issue 6, pp. 1306–1317, Jun. 2022.
- [72] N. Wu *et al.*, "Albumin, an interesting and functionally diverse protein, varies from 'native' to 'effective' (Review)," Feb. 01, 2024, *Spandidos Publications*. doi: 10.3892/mmr.2023.13147.
- [73] P. Ge *et al.*, "Albumin Binding Function: The Potential Earliest Indicator for Liver Function Damage," *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/5120760.

- [74] L. Sun *et al.*, “Albumin binding function is a novel biomarker for early liver damage and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease,” *Endocrine*, vol. 69, no. 2, pp. 294–302, Aug. 2020, doi: 10.1007/s12020-020-02319-z.
- [75] D. Santolero and P. M. Titchenell, “Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance,” Jan. 01, 2019, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.016.
- [76] P. M. Titchenell, M. A. Lazar, and M. J. Birnbaum, “Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin,” Jul. 01, 2017, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.tem.2017.03.003.
- [77] E. Bruckert and W. Le Goff, “LES FONDAMENTAUX Physiologie du métabolisme des lipoprotéines Physiology of lipoprotein metabolism Déclaration d’intérêt,” 2018.
- [78] Le manuel MSD, “Revue générale du métabolisme des lipides.” Accessed: Oct. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-endocriniens-et-m%C3%A9taboliques/dyslipid%C3%A9mies/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-du-m%C3%A9tabolisme-des-lipides>
- [79] Centre Hépatobiliaire Paul Brousse, “Les Fonctions du Foie.” Accessed: Sep. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/fonctions-hepatiques.html#:~:text=A%20partir%20des%20prot%C3%A9ines%20et%20acides%20amin%C3%A9s%20issus,globuline%20et%20les%20facteurs%20de%20la%20coagulation.>
- [80] X. Jiang, B. Du, and J. Zheng, “Glutathione-mediated biotransformation in the liver modulates nanoparticle transport,” *Nat Nanotechnol*, vol. 14, no. 9, pp. 874–882, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41565-019-0499-6.
- [81] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna, “Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis,” Feb. 2009. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
- [82] D. M. Grant, “Detoxification Pathways in the Liver,” 1991.
- [83] O. A. Almazroo, M. K. Miah, and R. Venkataramanan, “Drug Metabolism in the Liver,” Feb. 01, 2017, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
- [84] Le Manuel MSD, “Biodisponibilité des médicaments.” Accessed: Sep. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacocin%C3%A9tique/biodisponibilit%C3%A9-des-m%C3%A9dicaments>
- [85] R. A. DeBose-Boyd, “A Helping Hand for Cytochrome P450 Enzymes,” Feb. 07, 2007. doi: 10.1016/j.cmet.2007.01.007.
- [86] Le Manuel MSD, “Métabolisme des médicaments.” Accessed: Sep. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacocin%C3%A9tique/m%C3%A9tabolisme-des-m%C3%A9dicaments>
- [87] Le Manuel MSD, “Absorption des médicaments.” Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacocin%C3%A9tique/absorption-des-m%C3%A9dicaments>
- [88] D. W. Nebert and D. W. Russell, “Clinical importance of the cytochromes P450 Search strategy and selection criteria,” 2002. [Online]. Available: www.thelancet.com
- [89] M. Eslam *et al.*, “A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement,” Jul. 01, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
- [90] American Liver Foundation, “Maladie du foie gras.” Accessed: Sep. 27, 2024. [Online]. Available: <https://liverfoundation.org/fr/%C3%A0-propos-de-votre-foie/faits-sur-la-maladie-du-foie/st%C3%A9atose-h%C3%A9patique/#:~:text=La%20NAFLD%20est%20la%20cause%20la%20plus%20fr%C3%A9quente,de%2090%20des%20personnes%20souffrant%20d%27ob%C3%A9sité%20s%C3%A9v%C3%A8re.>

- [91] L'Assurance Maladie, "Définition et causes de la stéatose hépatique et de la stéato-hépatite non alcooliques." Accessed: Sep. 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/steatose-hepatique/definition-facteurs-risque>
- [92] R. K. Hoffman *et al.*, "Adult obesity treatment and prevention: A trans-agency commentary on the research landscape, gaps, and future opportunities," *Obesity Reviews*, vol. 25, no. 9, Sep. 2024, doi: 10.1111/obr.13769.
- [93] NIH : National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, "Definition & Facts of NAFLD & NASH." Accessed: Sep. 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/nafl-d-nash/definition-facts>
- [94] Z. M. Younossi, P. Golabi, J. M. Paik, A. Henry, C. Van Dongen, and L. Henry, "The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review," *Hepatology*, vol. 77, no. 4, pp. 1335–1347, Apr. 2023, doi: 10.1097/HEP.0000000000000004.
- [95] Y. Sakurai, N. Kubota, T. Yamauchi, and T. Kadowaki, "Role of Insulin Resistance in MAFLD," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 8, p. 4156, Apr. 2021, doi: 10.3390/ijms22084156.
- [96] World Obesity, "Global Obesity Observatory - États-Unis." Accessed: Sep. 27, 2024. [Online]. Available: <https://data.worldobesity.org/country/united-states-227/>
- [97] A. Gangopadhyay, R. Ibrahim, K. Theberge, M. May, and K. L. Houseknecht, "Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and mental illness: Mechanisms linking mood, metabolism and medicines," Nov. 15, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fnins.2022.1042442.
- [98] W. Jonas and A. Schürmann, "Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk," Aug. 01, 2021, *Elsevier GmbH*. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101111.
- [99] A. Zarrinpar, S. Gupta, M. R. Maurya, S. Subramaniam, and R. Loomba, "Serum microRNAs explain discordance of non-alcoholic fatty liver disease in monozygotic and dizygotic twins: A prospective study," *Gut*, vol. 65, no. 9, pp. 1546–1554, Sep. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2015-309456.
- [100] L. Petagine, M. Gulrez Zariwala, and V. B. Patel, "Non-alcoholic fatty liver disease: Immunological mechanisms and current treatments," 2023, *Baishideng Publishing Group Inc*. doi: 10.3748/wjg.v29.i32.4831.
- [101] L'Assurance Maladie, "Surpoids et obésité : calcul d'IMC et bilan médical." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/surpoids-obesite-adulte/calcul-imc-bilan-medical#:~:text=Votre%20surpoids%20est%20%C3%A9voqu%C3%A9%20lors%20d'un%20bilan%20de>
- [102] S. Huang and M. P. Czech, "The GLUT4 Glucose Transporter," Apr. 04, 2007. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.
- [103] P. Rada, Á. González-Rodríguez, C. García-Monzón, and Á. M. Valverde, "Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver?," *Cell Death Dis*, vol. 11, no. 9, p. 802, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-03003-w.
- [104] J. Liu, X. Jin, C. H. Yu, S. H. Chen, W. P. Li, and Y. M. Li, "Endoplasmic reticulum stress involved in the course of lipogenesis in fatty acids-induced hepatic steatosis," *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, vol. 25, no. 3, pp. 613–618, 2010, doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06086.x.
- [105] M. Hu, F. Phan, O. Bourron, P. Ferré, and F. Fougère, "Steatosis and NASH in type 2 diabetes," Dec. 01, 2017, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.019.
- [106] R. Amorim, C. C. Magalhães, F. Borges, P. J. Oliveira, and J. Teixeira, "From Non-Alcoholic Fatty Liver to Hepatocellular Carcinoma: A Story of (Mal)Adapted Mitochondria," *Biology (Basel)*, vol. 12, no. 4, p. 595, Apr. 2023, doi: 10.3390/biology12040595.
- [107] F. Idalsoaga, A. V. Kulkarni, O. Y. Mousa, M. Arrese, and J. P. Arab, "Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities," Aug. 20, 2020, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmed.2020.00448.

- [108] Z. Moayedfard, F. Sani, A. Alizadeh, K. Bagheri Lankarani, M. Zarei, and N. Azarpira, "The role of the immune system in the pathogenesis of NAFLD and potential therapeutic impacts of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles," Dec. 01, 2022, *BioMed Central Ltd.* doi: 10.1186/s13287-022-02929-6.
- [109] B. Dewidar, C. Meyer, S. Dooley, and N. Meindl-Beinker, "Tgf- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019," Nov. 01, 2019, *MDPI*. doi: 10.3390/cells8111419.
- [110] Centre Hépatobiliaire Paul Brousse, "Les Maladies du Foie et des Voies Biliaires." Accessed: Oct. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie.html>
- [111] American Liver Foundation, "Liver Diseases." Accessed: Oct. 05, 2024. [Online]. Available: <https://liverfoundation.org/liver-diseases/>
- [112] American Liver Foundation, "Rare Liver Diseases." Accessed: Oct. 02, 2024. [Online]. Available: <https://liverfoundation.org/about-your-liver/facts-about-liver-disease/rare-liver-diseases/>
- [113] ORPHANET, "Maladie de Wilson," 2021. Accessed: Oct. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/905?name=wilson&mode=name>
- [114] Orphanet, "Déficit en alpha-1-antitrypsine." Accessed: Oct. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/60#:~:text=Maladie%20m%C3%A9tabolique%20h%C3%A9r%C3%A9ditaire%20rare%20caract%C3%A9ris%C3%A9e%20par%20des%20taux>
- [115] Centre Hépatobiliaire Paul Brousse, "Le Syndrome d'Alagille." Accessed: Oct. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.centre-hepato-biliaire.org/content/le-syndrome-dalagille>
- [116] ORPHANET, "Syndrome d'Alagille," 2009. Accessed: Oct. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/52?name=alagille&mode=name>
- [117] D. W. Han *et al.*, "Customized liver organoids as an advanced in vitro modeling and drug discovery platform for non-alcoholic fatty liver diseases," 2023, *Ivyspring International Publisher*. doi: 10.7150/ijbs.85145.
- [118] S. Ahadian *et al.*, "Organ-On-A-Chip Platforms: A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies," Jan. 24, 2018, *Wiley-VCH Verlag*. doi: 10.1002/adhm.201700506.
- [119] D. Hendriks *et al.*, "Engineered human hepatocyte organoids enable CRISPR-based target discovery and drug screening for steatosis," *Nat Biotechnol*, vol. 41, no. 11, pp. 1567–1581, Nov. 2023, doi: 10.1038/s41587-023-01680-4.
- [120] ORPHANET, "Hypobétalipoprotéïnémie." Accessed: Oct. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/31154?name=Hypob%C3%AAtalipoprot%C3%A9in%C3%A9mie&mode=name>
- [121] D. Lindén *et al.*, "Pnpla3 silencing with antisense oligonucleotides ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in Pnpla3 I148M knock-in mice," *Mol Metab*, vol. 22, pp. 49–61, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.molmet.2019.01.013.
- [122] J. Friemel *et al.*, "Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 8, pp. 1951–1961, Apr. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0122.
- [123] G. Gambardella, G. Viscido, B. Tumaini, A. Isacchi, R. Bosotti, and D. di Bernardo, "A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-29358-6.
- [124] K. C. Reimer, A. Wree, C. Roderburg, and F. Tacke, "New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic," Jan. 01, 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s12072-019-10001-4.
- [125] R. Ouchi *et al.*, "Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids," *Cell Metab*, vol. 30, no. 2, pp. 374–384.e6, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.007.
- [126] C. H. Beckwitt *et al.*, "Liver 'organ on a chip,'" Feb. 01, 2018, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.023.

- [127] M. Chang, M. S. Bogacheva, and Y. R. Lou, "Challenges for the Applications of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Liver Organoids," Oct. 01, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fcell.2021.748576.
- [128] S. Liu *et al.*, "Liver organoids: updates on generation strategies and biomedical applications," Dec. 01, 2024, *BioMed Central Ltd.* doi: 10.1186/s13287-024-03865-3.
- [129] Ž. Reiner *et al.*, "Lysosomal acid lipase deficiency - An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction," 2014, *Elsevier Ireland Ltd.* doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003.
- [130] F. Aguisanda, N. Thorne, and W. Zheng, "Targeting Wolman Disease and Cholesteryl Ester Storage Disease: Disease Pathogenesis and Therapeutic Development," *Curr Chem Genom Transl Med*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, Feb. 2017, doi: 10.2174/2213988501711010001.
- [131] M. Pericleous, C. Kelly, T. Wang, C. Livingstone, and A. Ala, "Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency," Sep. 01, 2017, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/S2468-1253(17)30052-3.
- [132] Y. Guan *et al.*, "Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases," *JCI Insight*, vol. 2, no. 17, Sep. 2017, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.94954.
- [133] S. H. Au, M. D. Chamberlain, S. Mahesh, M. V. Sefton, and A. R. Wheeler, "Hepatic organoids for microfluidic drug screening," *Lab Chip*, vol. 14, no. 17, pp. 3290–3299, Sep. 2014, doi: 10.1039/c4lc00531g.
- [134] L. A. Milton, M. S. Viglione, L. J. Y. Ong, G. P. Nordin, and Y. C. Toh, "Vat photopolymerization 3D printed microfluidic devices for organ-on-a-chip applications," Jul. 06, 2023, *Royal Society of Chemistry.* doi: 10.1039/d3lc00094j.
- [135] Y. Wang *et al.*, "In situ differentiation and generation of functional liver organoids from human iPSCs in a 3D perfusable chip system," *Lab Chip*, vol. 18, no. 23, pp. 3606–3616, Dec. 2018, doi: 10.1039/c8lc00869h.
- [136] P. Kanabekova, A. Kadyrova, and G. Kulsharova, "Microfluidic Organ-on-a-Chip Devices for Liver Disease Modeling In Vitro," Mar. 01, 2022, *MDPI.* doi: 10.3390/mi13030428.
- [137] T. Messelmani *et al.*, "Liver organ-on-chip models for toxicity studies and risk assessment," Jun. 01, 2022, *Royal Society of Chemistry.* doi: 10.1039/d2lc00307d.
- [138] R. Baudoin, G. Alberto, P. Paullier, C. Legallais, and E. Leclerc, "Parallelized microfluidic biochips in multi well plate applied to liver tissue engineering," Oct. 2012. doi: 10.1016/j.snb.2012.06.050.
- [139] U. M. N. Cao, Y. Zhang, J. Chen, D. Sayson, S. Pillai, and S. D. Tran, "Microfluidic Organ-on-A-chip: A Guide to Biomaterial Choice and Fabrication," Feb. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* doi: 10.3390/ijms24043232.
- [140] S. Mouly, M. Morgand, A. Lopes, C. Lloret-Linares, and J. F. Bergmann, "Drug-food interactions in internal medicine: What physicians should know?," Aug. 01, 2015, *Elsevier Masson s.r.l.* doi: 10.1016/j.revmed.2014.12.010.
- [141] A. Choe, S. K. Ha, I. Choi, N. Choi, and J. H. Sung, "Microfluidic Gut-liver chip for reproducing the first pass metabolism," *Biomed Microdevices*, vol. 19, no. 1, Mar. 2017, doi: 10.1007/s10544-016-0143-2.
- [142] K. Lenaerts, F. K. Bouwman, W. H. Lamers, J. Renes, and E. C. Mariman, "Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium," *BMC Genomics*, vol. 8, Apr. 2007, doi: 10.1186/1471-2164-8-91.
- [143] V. A. Arzumanyan, O. I. Kiseleva, and E. V. Poverennaya, "The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise," Dec. 01, 2021, *MDPI.* doi: 10.3390/ijms222313135.
- [144] V. L. Slaughter *et al.*, "Validation of an adipose-liver human-on-a-chip model of NAFLD for preclinical therapeutic efficacy evaluation," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-92264-2.

- [145] Fondation pour la recherche sur le cancer, "Le cancer en chiffres (France et monde)." Accessed: Oct. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.fondation-arc.org/cancer/le-cancer-en-chiffres-france-et-monde#:~:text=Dans%20le%20monde,%20le%20cancer%20constitue%20la%20deuxi%C3%A8me>
- [146] L. Broutier *et al.*, "Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening," *Nat Med*, vol. 23, no. 12, pp. 1424–1435, 2017, doi: 10.1038/nm.4438.
- [147] L. Li *et al.*, "Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity," *JCI Insight*, vol. 4, no. 2, Jan. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.121490.
- [148] L. Sun and L. Hui, "Progress in human liver organoids," Aug. 01, 2020, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/jmcb/mjaa013.
- [149] INSERM, "Les essais cliniques (Recherches interventionnelles portant sur un produit de santé)." Accessed: Sep. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante/>
- [150] C. Rae, F. Amato, and C. Braconi, "Patient-derived organoids as a model for cancer drug discovery," Apr. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22073483.
- [151] J.-F. Kaux and J.-M. Crielaard, "Tendon et tendinopathie," *Journal de Traumatologie du Sport*, vol. 31, no. 4, pp. 235–240, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jts.2014.07.008.
- [152] D. T. Govindaraju, C.-H. Chen, K. T. Shalumon, H.-H. Kao, and J.-P. Chen, "Bioactive Nanostructured Scaffold-Based Approach for Tendon and Ligament Tissue Engineering," *Nanomaterials*, vol. 13, no. 12, p. 1847, Jun. 2023, doi: 10.3390/nano13121847.
- [153] M. Schneider, P. Angele, T. A. H. Järvinen, and D. Docheva, "Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 129, pp. 352–375, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2017.12.016.
- [154] M. R. Citeroni *et al.*, "In Vitro Innovation of Tendon Tissue Engineering Strategies," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 18, p. 6726, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21186726.
- [155] J. H.-C. Wang, "Mechanobiology of tendon," *J Biomech*, vol. 39, no. 9, pp. 1563–1582, 2006, doi: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011.
- [156] L. Jiang *et al.*, "Mesenchymal stem cells: An efficient cell therapy for tendon repair (Review).," *Int J Mol Med*, vol. 52, no. 2, Aug. 2023, doi: 10.3892/ijmm.2023.5273.
- [157] M. Lin *et al.*, "Growth factors in the treatment of Achilles tendon injury," 2023, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fbioe.2023.1250533.
- [158] R. Costa-Almeida, I. Calejo, and M. E. Gomes, "Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies.," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 12, Jun. 2019, doi: 10.3390/ijms20123002.
- [159] F. Kaleagasioglu and E. Olcay, "Fluoroquinolone-induced tendinopathy: etiology and preventive measures.," *Tohoku J Exp Med*, vol. 226, no. 4, pp. 251–8, Apr. 2012, doi: 10.1620/tjem.226.251.
- [160] L. A. Hockaday, M. D. Saeger, F. W. Karanja, and C. K. Kuo, "Mechanobiology of Embryonic and Adult Tendons," in *Tendon Regeneration*, Elsevier, 2015, pp. 77–110. doi: 10.1016/B978-0-12-801590-2.00003-X.
- [161] K. Kashiwagi, Y. Mochizuki, Y. Yasunaga, O. Ishida, M. Deie, and M. Ochi, "Effects of transforming growth factor- β 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model," *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, vol. 38, no. 4, pp. 193–197, 2004, doi: 10.1080/02844310410029110.
- [162] J. Zhang, C. Keenan, and J. H. C. Wang, "The effects of dexamethasone on human patellar tendon stem cells: Implications for dexamethasone treatment of tendon injury," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 31, no. 1, pp. 105–110, Jan. 2013, doi: 10.1002/jor.22193.

- [163] B. B. Rothrauff, Guang Yang, and R. S. Tuan, "Tendon Resident Cells—Functions and Features in Section I—Developmental Biology and Physiology of Tendons," in *Tendon Regeneration*, Elsevier, 2015, pp. 41–76. doi: 10.1016/B978-0-12-801590-2.00002-8.
- [164] G. Nourissat, F. Berenbaum, and D. Duprez, "Tendon injury: From biology to tendon repair," Apr. 01, 2015, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrrheum.2015.26.
- [165] B. H. Koo *et al.*, "Characterization of TGFβ1-induced tendon-like structure in the scaffold-free three-dimensional tendon cell culture system," *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-60221-4.
- [166] R. Schweitzer, E. Zelzer, and T. Volk, "Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates," *Development*, vol. 137, no. 17, pp. 2807–2817, Sep. 2010, doi: 10.1242/dev.047498.
- [167] A. E. Brent, R. Schweitzer, and C. J. Tabin, "A Somitic Compartment of Tendon Progenitors ates the hypaxial myotome, source of the limb, limb," 2003.
- [168] F. Theiss *et al.*, "Use of biomimetic microtissue spheroids and specific growth factor supplementation to improve tenocyte differentiation and adaptation to a collagen-based scaffold in vitro," *Biomaterials*, vol. 69, pp. 99–109, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.013.
- [169] W. Chen, H. Tang, M. Zhou, C. Hu, J. Zhang, and K. Tang, "Dexamethasone inhibits the differentiation of rat tendon stem cells into tenocytes by targeting the scleraxis gene," *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 152, pp. 16–24, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.04.010.
- [170] H. Liu *et al.*, "Mohawk promotes the tenogenesis of mesenchymal stem cells through activation of the TGFβ signaling pathway," *Stem Cells*, vol. 33, no. 2, pp. 443–455, Feb. 2015, doi: 10.1002/stem.1866.
- [171] O. Evrova, D. Kellenberger, M. Calcagni, V. Vogel, and J. Buschmann, "Supporting Cell-Based Tendon Therapy: Effect of PDGF-BB and Ascorbic Acid on Rabbit Achilles Tenocytes In Vitro," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 2, p. 458, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijms21020458.
- [172] C. Ning *et al.*, "Recent advances in tendon tissue engineering strategy," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, Feb. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1115312.
- [173] P. Dec, M. Żyłka, P. Burszewski, A. Modrzejewski, and A. Pawlik, "Recent Advances in the Use of Stem Cells in Tissue Engineering and Adjunct Therapies for Tendon Reconstruction and Future Perspectives," *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 8, p. 4498, Apr. 2024, doi: 10.3390/ijms25084498.
- [174] O. Hakimi, R. Poulson, D. Thakkar, C. Yapp, and A. Carr, "Ascorbic acid is essential for significant collagen deposition by human tenocytes in vitro," *Oxid Antioxid Med Sci*, vol. 3, no. 2, p. 119, 2014, doi: 10.5455/oams.030514.or.063.
- [175] Y. Xu *et al.*, "The effect of mechanical stimulation on the maturation of TDSCs-poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)/collagen scaffold constructs for tendon tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 35, no. 9, pp. 2760–2772, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.042.
- [176] K. T. Shalumon, H.-T. Liao, W.-H. Li, D. T.G., M. P.A., and J.-P. Chen, "Braided suture-reinforced fibrous yarn bundles as a scaffold for tendon tissue engineering in extensor digitorum tendon repair," *Chemical Engineering Journal*, vol. 454, p. 140366, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.cej.2022.140366.
- [177] T. W. Herod and S. P. Veres, "Development of overuse tendinopathy: A new descriptive model for the initiation of tendon damage during cyclic loading," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 36, no. 1, pp. 467–476, Jan. 2018, doi: 10.1002/jor.23629.
- [178] Y. Xu *et al.*, "Cyclic Tensile Strain Induces Tenogenic Differentiation of Tendon-Derived Stem Cells in Bioreactor Culture," *Biomed Res Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/790804.
- [179] V. Citro, M. Clerici, A. R. Boccaccini, G. Della Porta, N. Maffulli, and N. R. Forsyth, "Tendon tissue engineering: An overview of biologics to promote tendon healing and repair," Jan. 01, 2023, *SAGE Publications Ltd*. doi: 10.1177/20417314231196275.

- [180] N. Maffulli, J. Wong, and L. C. Almekinders, "Types and epidemiology of tendinopathy," 2003, *W.B. Saunders*. doi: 10.1016/S0278-5919(03)00004-8.
- [181] P. R. Cohen, "Cephalexin-associated Achilles Tendonitis: Case Report and Review of Drug-induced Tendinopathy," *Cureus*, Dec. 2018, doi: 10.7759/cureus.3783.
- [182] T. Kirchgesner *et al.*, "Drug-induced tendinopathy: From physiology to clinical applications," *Joint Bone Spine*, vol. 81, no. 6, pp. 485–492, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jbspin.2014.03.022.
- [183] K. Knobloch, "Drug-induced tendon disorders," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 920, Springer New York LLC, 2016, pp. 229–238. doi: 10.1007/978-3-319-33943-6_22.
- [184] C. Murphy, E. Deplazes, C. G. Cranfield, and A. Garcia, "The role of structure and biophysical properties in the pleiotropic effects of statins," Nov. 02, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms21228745.
- [185] P. Eliasson, F. Dietrich-Zagonel, A. C. Lundin, P. Aspenberg, A. Wolk, and K. Michaëlsson, "Statin treatment increases the clinical risk of tendinopathy through matrix metalloproteinase release – a cohort study design combined with an experimental study," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53238-7.
- [186] M. Raeeszadeh-Sarmazdeh, L. D. Do, and B. G. Hritz, "Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics," May 25, 2020, *NLM (Medline)*. doi: 10.3390/cells9051313.
- [187] S. Wu, Y. Wang, P. N. Streubel, and B. Duan, "Living nanofiber yarn-based woven biotextiles for tendon tissue engineering using cell tri-culture and mechanical stimulation," *Acta Biomater*, vol. 62, pp. 102–115, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.043.
- [188] R. M. A. Domingues, A. I. Gonçalves, R. Costa-Almeida, M. T. Rodrigues, R. L. Reis, and M. E. Gomes, "Fabrication of Hierarchical and Biomimetic Fibrous Structures to Support the Regeneration of Tendon Tissues," in *Tendon Regeneration*, Elsevier, 2015, pp. 259–280. doi: 10.1016/B978-0-12-801590-2.00010-7.
- [189] A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, and N. Radacsi, "2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review," Jul. 01, 2020, *Wiley-Blackwell*. doi: 10.1002/wnan.1626.
- [190] A. O. Šišková *et al.*, "The drug-loaded electrospun poly(ϵ -caprolactone) mats for therapeutic application," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/nano11040922.
- [191] M. M. Farag, "Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review," *J Mater Sci*, vol. 58, no. 2, pp. 527–558, Jan. 2023, doi: 10.1007/s10853-022-08102-x.
- [192] R. Baudoin, L. Griscom, M. Monge, C. Legallais, and E. Leclerc, "Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models," *Biotechnol Prog*, vol. 23, no. 5, pp. 1245–1253, 2007, doi: 10.1021/bp0603513.
- [193] P. Eliasson *et al.*, "Simvastatin and atorvastatin reduce the mechanical properties of tendon constructs in vitro and introduce catabolic changes in the gene expression pattern," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0172797.
- [194] Z. Hamidouche *et al.*, "FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ β -catenin signaling-dependent Runx2 expression," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. 11, pp. 3813–3822, Nov. 2008, doi: 10.1096/fj.08-106302.
- [195] L. Meesuk *et al.*, "Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-24160-2.
- [196] R. Tanaka-yachi, K. Aizawa, K. Shimizu, H. Akutsu, and K. Nakamura, "DNMT1/PKR double knockdowned HepG2 (HepG2-DP) cells have high hepatic function and differentiation ability," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-25777-z.

ORGANOÏDES : ALTERNATIVES AUX ANIMAUX DE LABORATOIRE POUR LES ÉTUDES DE DRUG SCREENING ET AUTRES APPLICATIONS BIOMÉDICALES

RESUMÉ :

Le modèle animal est le modèle d'étude le plus utilisé en recherche et développement pour produire de nouveaux traitements. Cependant, il présente certaines limites, comme le manque de fiabilité. Il devient alors nécessaire de développer un modèle plus prédictif et plus représentatif de la physiologie humaine : les organoïdes. Les organoïdes sont des structures tridimensionnelles cultivées *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes, embryonnaires ou adultes, capables d'imiter les caractéristiques et les fonctions physiologiques humaines. Leur potentiel s'étend à de nombreuses applications biomédicales, telles que la modélisation de pathologies, afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques, ou encore la possibilité de mener des études plus efficaces de drug screening, de toxicité et de sécurité. Actuellement, la part d'échecs dans les essais précliniques et cliniques est supérieure au taux de réussite, en raison d'un manque d'efficacité et de sécurité. Par conséquent, l'emploi des organoïdes dans de telles études permettrait, à la fois, d'identifier plus rapidement les molécules inefficaces et toxiques, mais également de réduire le nombre d'échecs et le nombre d'animaux utilisés. Les organoïdes favoriseraient ainsi la prédiction de potentiels effets thérapeutiques ou indésirables sur les tissus d'intérêt. Le foie est un organe indispensable à la métabolisation des médicaments. L'exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires de diverses pathologies hépatiques est possible grâce aux organoïdes. Cet avantage de modélisation permet d'analyser de manière plus spécifique la réponse aux traitements et ainsi de développer des thérapies adaptées, en prenant en compte, par exemple, la variabilité génétique. Les nouvelles technologies nous permettent également de créer des biopuces, dispositifs miniaturisés incluant la microfluidique, dans lesquels de nombreux paramètres cellulaires sont favorisés. Afin de reproduire la physiologie humaine, des organoïdes de tendons produits par électrospinning ont été mis en culture avec des biopuces hépatiques ; l'objectif étant de mimer la métabolisation hépatique de deux molécules ayant des effets indésirables sur le tissu tendineux. Cette expérience, menée au sein du laboratoire BMBI (BioMécanique et BioIngénierie) de l'Université de Technologie de Compiègne, a été réalisée après avoir produit des organoïdes de tendons pour réaliser des études de toxicité médicamenteuse. Toutes ces recherches mettent en évidence le potentiel des organoïdes à améliorer la recherche et le développement de nouvelles thérapies. Leur place dans l'industrie pharmaceutique permettra de favoriser la mise en place de la médecine personnalisée.

MOTS-CLÉS : ORGANOÏDES – DRUG SCREENING – MÉDECINE PERSONNALISÉE – BIOPUCES – CO-CULTURE FOIE-TENDON

ORGANOIDS : ALTERNATIVES TO LABORATORY ANIMALS FOR DRUG SCREENING STUDIES AND OTHER BIOMEDICAL APPLICATIONS

ABSTRACT :

The animal model is the most widely used study model in research and development for producing new treatments. However, it has certain limitations, such as a lack of reliability. It therefore becomes necessary to develop a model that is more predictive and more representative of human physiology: organoids. Organoids are three-dimensional structures cultured *in vitro* from pluripotent, embryonic, or adult stem cells, capable of mimicking human physiological characteristics and functions. Their potential extends to numerous biomedical applications, such as disease modeling to better understand pathophysiological mechanisms, or the possibility of conducting more effective drug screening, toxicity, and safety studies. Currently, the failure rate in preclinical and clinical trials exceeds the success rate, due to a lack of efficacy and safety. Consequently, the use of organoids in such studies would allow for faster identification of ineffective and toxic molecules, as well as a reduction in the number of failures and the number of animals used. Organoids would thus enhance the prediction of potential therapeutic or adverse effects on tissues of interest. The liver is an essential organ for drug metabolism. The exploration of molecular and cellular mechanisms in various liver pathologies is made possible through organoids. This modeling advantage allows for a more specific analysis of treatment responses and thus the development of tailored therapies, taking into account, for instance, genetic variability. New technologies also enable the creation of biochips, miniaturized devices incorporating microfluidics, in which numerous cellular parameters are optimized. To replicate human physiology, tendon organoids produced through electrospinning were cultured alongside hepatic biochips, with the goal of mimicking the hepatic metabolism of two molecules with adverse effects on tendon tissues. This experiment, conducted within the BMBI laboratory (BioMechanics and BioEngineering) at the University of Technology of Compiègne, was carried out after producing tendon organoids to perform drug toxicity studies. All these studies highlight the potential of organoids to enhance research and the development of new therapies. Their role in the pharmaceutical industry will promote the implementation of personalized medicine.

KEY WORDS : ORGANOIDS – DRUG SCREENING – PERSONALIZED MEDICINE – BIOCHIPS – LIVER-TENDON CO-CULTURE

DISCIPLINE administrative : PHARMACIE

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des Maraichers, 31062 Toulouse Cedex 09

Université de Technologie de Compiègne, Rue du docteur Schweitzer, CS 60319, 60203 Compiègne cedex

Directrice de thèse : LEGALLAIS Cécile, Directrice de recherche CNRS en Biomécanique et Bioingénierie (BMBI) à l'Université de Technologie de Compiègne (UTC)