



Université de Strasbourg

FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre :

MÉMOIRE DE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**LA PLACE DES ORGANOÏDES NEURONAUX HUMAINS DANS LA RECHERCHE
EN NEURODÉVELOPPEMENT ET NEUROPATHOLOGIE**

Marie FISCHER

Soutenu le 8 avril 2024 devant le jury constitué de

Pauline SOULAS-SPRAUEL, Président
Maxime LEHMANN, Directeur de thèse
Florian LAPP, Autre membre du jury

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg

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 dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.

Mise en garde éthique :

Cette thèse comprend des références à des travaux scientifiques où des cellules souches embryonnaires humaines ont été utilisées. Ces références sont citées exclusivement à des fins d'exhaustivité scientifique et ne doivent pas être interprétées comme une approbation de leur utilisation.

En effet, je me dois de clarifier ma position éthique personnelle à cet égard. Je n'approuve ni ne soutiens l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans la recherche, compte tenu des implications éthiques substantielles que cela engendre. Mon approche s'aligne sur le respect de la dignité humaine dès les premiers stades du développement et la promotion de méthodologies alternatives qui ne transgressent pas cette frontière éthique.

La présence de ces références est dictée par le désir de maintenir l'intégrité et la complétude scientifique, tout en engageant une réflexion éthique sur les responsabilités qui incombent à la communauté scientifique. Cette mention n'est en aucun cas une validation des méthodes utilisées, mais plutôt un appel à une prise de conscience et à l'avancement de la science dans le respect des principes éthiques universellement reconnus.

Remerciements

Tout d'abord à ma famille. A mes parents, qui m'ont donné le goût du travail, de la lecture, me permettant ainsi de me lancer dans ces études. A ma mère, pour sa présence durant mes études.

A mes frères et sœurs : Pierre, Guillaume, Grégoire, Aymeric, Agathe, Matthieu, Thibault et ma chère Victoire. Merci pour tout ce que vous m'apportez, merci pour nos rires et nos pleurs. Merci de m'avoir encouragée, soutenue, merci de vous payer si souvent ma tête (ça rend humble). Merci pour votre aide lorsque j'étais en difficulté, en particulier ces derniers mois, merci pour votre amour, merci pour votre présence tout simplement. Pardon pour toutes les fois où je n'ai pas rempli mon rôle de sœur, de grande sœur, et merci de supporter mon sale caractère. Merci pour tous nos souvenirs et tous ces moments de fraternité.

A mes chères belles-sœurs : Joanne, Agathe et Emérentienne, et à Maxime. Merci pour la joie (et les jolies nièces) que vous apportez dans notre famille.

Au Professeur Maxime Lehmann : merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour le temps que vous avez su m'accorder, pour nos discussions, pour vos conseils. J'espère avoir l'occasion de retravailler un jour avec vous.

Au Dr Pauline Soulas-Sprauel : merci d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, merci pour votre intérêt pour mon travail.

Au Dr Florian Lapp : merci d'avoir traversé la France pour intégrer le jury de cette thèse. Merci pour nos discussions, toujours si enrichissantes.

Au professionnels qui ont marqué mon parcours : Dr Maria Zeniou-Meyer, Dr Jérôme Terrand, Dr Danielle Abessera.

A mes compagnons de cordée :

Nada Watchi, pour toutes ces années à la fac, nos randonnées, nos discussions, nos appels vidéo interminables lorsqu'un océan nous sépare. Merci d'être mon amie, merci d'accepter mes fragilités tout en me rentrant dedans lorsque c'est nécessaire. Merci pour ta franchise et ton honnêteté. « L'ami aime en tout temps, et dans le malheur il devient un frère » (Pr 17, 17)

Agathe de Montillet, pour nos années de PACES dont nous sommes ressorties si fortes. Merci pour ton amitié indéfectible, merci pour ta patience envers mes faiblesses.

Maxime, mon binôme de TP « ensemble on va plus loin »

A mon trinôme de Master Biotech, ils se reconnaîtront. Merci pour ces deux années, pour nos TP cancérogènes, pour nos discussions et nos soirées.

A ceux qui ont été des rocs dans la tempête :

Siegrid Millière, soit mille fois remerciée. Merci pour nos appels interminables, merci de m'écouter avec la même bienveillance lorsque je suis en boucle sur les mêmes sujets. Merci pour ces derniers mois, pour ton amour sans jugement, pour tes conseils, pour tes prières. Tu es une femme forte (il faut relire Esther, Debora ou Judith) et je sais qu'il te sera donné d'accomplir de grandes choses dans ta vie. Use dans ta prière de la même patience dont tu sais faire preuve avec moi : « Demandez, et vous recevrez ; cherchez, et vous trouverez ; frappez, et l'on vous ouvrira. Car celui qui demande reçoit ; celui qui cherche trouve ; et l'on ouvre à celui qui frappe. Qui de vous donnera un caillou à son fils quand celui-ci lui demande du pain ? » (Mt 7, 7-9)

Mathieu Sauviac, merci pour ton amitié. Merci d'être capable de m'appeler immédiatement quand j'en ai besoin, à toute heure du jour ou de la nuit. Merci d'avoir autant veillé sur moi ces derniers mois. Merci pour tes conseils et tes blagues, tu es très fort pour remonter le moral.

A tous mes amis fidèles et que j'estime : Albane, Bennett, Clara, Fanny, Alice, Pedro, Amicie, Menou, Valesca, Aline, Héloïse, Armony et Pauline, Marianne, Johanna, Pierre, Jeanne, Eve, Gabriela, Sophie.

Aux prêtres et aux séminaristes qui m'ont accompagnée pendant ces années :

Au chanoine Christian Gouyau, pour son amitié et ses enseignements. Merci pour votre confiance.

Au chanoine Joseph Amadieu pour ses prières.

Aux Missionnaires de la Miséricorde Divine : merci pour la confiance que vous m'accordez dans les missions que vous me donnez, merci pour vos enseignements, pour votre zèle. Merci de m'apprendre que 3 journées peuvent rentrer dans 24h, mais on va tout de même essayer d'abandonner ce projet. Merci pour tous les skills développés grâce à vous, et surtout merci pour toutes les amitiés que j'ai pu construire grâce à vous. Merci pour vos prières et vos messes offertes.

Merci chers prêtres et consacrés pour votre vie intégralement donnée pour les autres.



Table des figures	8
Glossaire	9
I. Introduction	11
II. Différenciation cellulaire et cellule souche	11
A. Définition et classification des cellules souches	11
B. Les cellules souches embryonnaires.....	12
C. Les cellules souches adultes.....	14
D. iPSC : cellules souches pluripotentes induites	16
III. Le tissu neuronal	18
A. L'organisation du cerveau humain	18
B. Les différents types cellulaires constituant le cerveau	19
C. Le développement du cerveau humain	20
i. Neurodéveloppement chez l'homme	20
ii. Neurogenèse chez l'homme	24
IV. Les organoïdes	26
A. Définition	26
B. Histoire du développement des techniques de production d'organoïdes	27
V. Les organoïdes neuronaux humains	31
A. Développement du premier organoïde neuronal humain	31
B. Composition cellulaire d'un organoïde neuronal humain	33
i. Analyse de la composition cellulaire.....	33
ii. Degré de variabilité de la composition cellulaire.....	34
iii. Présence de cellules gliales dans l'organoïde	35
C. Organisation.....	37
i. Auto-organisation des organoïdes neuronaux.....	37
ii. Développement contrôlé des organoïdes neuronaux et étude de l'impact de facteurs de différenciation.....	39
iii. Combinaison d'organoïdes neuronaux spécifiques de certaines régions du cerveau	41
D. Fonctionnalité	43
i. Activité neuronale et maturation des cellules nerveuses.....	43
ii. Formation de circuits neuronaux.....	44
iii. Interdépendances des différentes régions constituant l'organoïde	44
E. Limites, techniques et perspectives d'amélioration pour la culture des organoïdes neuronaux humains	45
i. Amélioration des bioréacteurs utilisés pour la mise en culture d'organoïdes neuronaux	45
ii. Vascularisation des organoïdes neuronaux	46
VI. Les organoïdes neuronaux humains dans la recherche en neurodéveloppement	48
A. Mutations génétiques et neurodéveloppement.....	48
i. Microcéphalie primaire autosomique récessive.....	48
ii. Lissencéphalie	50
iii. Trisomie 21	53
B. Neurotoxicité développementale chez le fœtus	54
i. Infection virale	54
ii. Médication de la mère pendant la grossesse	55

iii. Exposition du fœtus à l'alcool et au tabac	56
VII. Les organoïdes neuronaux humains dans la recherche en neuropathologie.....	57
A. Maladies neurodégénératives	58
i. Alzheimer	59
ii. Parkinson	60
B. Facteurs exogènes, drogues, infections.....	61
i. Infections virales du système nerveux central.....	61
ii. Impact de la consommation de drogue sur le système nerveux central : exemple des consommateurs de méthamphétamine.....	62
VIII. Conclusion	63
Bibliographie.....	64

Table des figures

Figure 1 : Potentialité des cellules souches embryonnaires et exemple de différenciation des lignées cellulaires ⁶	13
Figure 2 : Les processus d'activation et de différenciation des cellules souches neuronales sont contrôlés par de multiples molécules de signalisation ⁹	16
Figure 3 : Principe général de la technologie des iPSC ⁵	17
Figure 4 : Représentation schématique des différents lobes qui composent un hémisphère cérébral ¹⁷	18
Figure 5 : Cellules gliales du système nerveux central ³	20
Figure 6 : Schéma du processus embryonnaire de la neurulation ⁵	21
Figure 7 : Schéma du développement des vésicules primaires et secondaires chez l'homme ²⁷	23
Figure 8 : Illustration d'un cône de croissance (growth cone en anglais).....	24
Figure 9 : Chronologie des techniques et expériences ayant conduit au développement des connaissances actuelles concernant la culture cellulaire en 3D et les organoïdes ⁴⁶	30
Figure 10 : Photo d'un organoïde neuronal humain, ou « mini-brain » en anglais	31
Figure 11 : Protocole de culture d'organoïdes neuronaux humains d'après les travaux de l'équipe du Dr Lancaster ³⁴	32
Figure 12 : Expression de marqueurs génomiques dans les organoïdes, par type de cellule et âge de l'organoïde (trois mois (mo) par rapport à six mois) ⁵⁰	33
Figure 13 : Formation de synapses dans des organoïdes de 8 mois ⁵⁰	34
Figure 14 : Images de fluorescence d'organoïdes neuronaux à 8 semaines (a, b), 9 semaines (c) et 14 semaines (d, e) de développement ⁵⁶	36
Figure 15 : Schéma comparatif du développement du cerveau in vivo ou in vitro ⁶²	38
Figure 16 : Quelques coupes montrant l'organisation d'organoïdes neuronaux (cultivés en l'absence de facteurs de différenciations) en différentes régions spécifiques du cerveau antérieur (ou prosencéphale) ⁶³ ...	39
Figure 17 : Principe de la méthode ATAC-seq ⁷³	42
Figure 18 : Publicité de la compagnie LEGO®	43
Figure 19 : Le bioréacteur rotatif type « spinner-flask » utilisé par l'équipe de Lancaster pour le développement des premiers organoïdes neuronaux humains, photographié dans l'incubateur	45
Figure 20 : Dessin assisté par ordinateur du bioréacteur Spin Ω en version 12 puits et des pièces individuelles de la conception ⁶⁶	46
Figure 21 : Présentation schématique des malformations cérébrales pouvant être modélisées dans des organoïdes cérébraux	50
Figure 22 : L'expansion des tissus en surface, combinée à une contrainte interne, conduit à l'apparition de plis. Exemple dans différents modèles de gyrification du cerveau ¹¹²	52
Figure 23 : Formation d'organoïde via la technologie iPSC (nommée iPS dans la figure) à partir de tissus dérivés du patient ¹⁵⁸	58

Glossaire

AC : Cellules amacrines	hfMCOs : Organoïdes humains EGM-corticaux fusionnés
ACTA2 : Actine alpha 2	hPSC : cellules souches pluripotentes humaines
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	HSV1 : Virus Herpès Simplex de type 1
ALI-CO : Organoïdes neuronaux en interface air-liquide	HUES66 : Harvard University Embryonic Stem cell 66
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde-β	iPSC/hiPSC : Cellules souches pluripotentes induites / cellules souches humaines pluripotentes induites
ARN : Acides RiboNucléiques	IL : Interleukine
ATAC-seq : Analyse de la chromatine accessible par transposase avec séquençage à haut débit	K+ : Ion potassium
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique	LEMP : Leucoencéphalopathie multifocale progressive
BP : Cellules bipolaires	LGR5 : Récepteur couplé aux protéines G contenant des répétitions riches en leucine
BMP : Protéine osseuse morphogénétique	LIF : Facteur inhibiteur de la leucémie
BrdU : Bromodésoxyuridine	LRKK2 : Leucine-rich repeat kinase 2
Ca2+ : Ion calcium	MA : Maladie d'Alzheimer
CD31 : Molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires	MAP2 : Protéine associée aux microtubules 2
CfuPN : Neurones de projection corticofuges	MCPH : Microcéphalie primaire autosomique récessive
Cl : Chlore	MEC : Matrice extra-cellulaire
CMVH : Cytomégalovirus humain	MEK-ERK : Kinase activée par un mitogène - Kinase régulée par le signal extracellulaire
CNTF : Facteur neurotrophique ciliaire	METH : Méthamphetamine
CPN : Neurones de projection callosaux	Meso : Cellules mésodermiques
CSE : Cellule Souche Embryonnaire	MGE : Éminence ganglionnaire
CSH : Cellule souche hématopoïétique	MP : Maladie de Parkinson
CUX2 : Cut-Like Homeobox 2	MYRF : Facteur de régulation de la myéline
Drop-seq : Séquençage en gouttelettes	NCAM : Molécule d'Adhésion des Cellules Neurales
EB : Corps embryoides	NESTIN : Protéine de cellule souche neuroépithéliale
Edu : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine	MG : Glie de Müller
EGF : Facteur de croissance épidermique	NE : Cellules neuroépithéliales
EGM : Eminence Ganglionnaire Médial	NKCC/KCC : Sodium-Potassium-Chlorure cotransporteur/Potassium-Chlorure cotransporteur
EHS : Engelbreth-Holm-Swarm	PMA : Procréation Médicalement Assisté
ETS : Spécifique à la transformation des érythroblastes	PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
FAD : Maladie d'Alzheimer familiale	PGP1 : iPSC provenant de fibroblastes humains primaires de la peau d'un donneur masculin de contrôle
FGF/bFGF : Facteur de croissance des fibroblastes/facteur de croissance des fibroblastes basique	PS : Préséniline
FIV : Fécondation In Vitro	RA : Acide rétinoïque
FOXA2 : Protéine Forkhead box A2	RGC : Cellules ganglionnaires de la rétine
GABA : Acide gamma-aminobutyrique	REST : RE-1 silencing transcription factor
GFAP : Protéine d'acides fibrillaires gliales	
GSX2 : GS Homeobox 2	
IFL : Couche fibreuse interne	
IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline	
IN : Interneurone	
IPC : Cellules progénitrices intermédiaires	
JCV : John Cunningham Virus	
hES : Cellule souche embryonnaire humaine	

RG : Cellules gliales radiales

Sc-RNA-seq : Séquençage de l'ARN de cellule unique

SFEBq : Culture flottante sans sérum d'agrégats ressemblant à des corps embryoides avec agrégation rapide

SGZ : Zone subgranulaire

Shh : Sonic Hedgehog

SMAD : famille de protéines structurellement similaires qui sont les principaux transducteurs de signaux pour les récepteurs de la superfamille du TGF β , qui sont d'une importance cruciale pour la régulation du développement et de la croissance des cellules. L'abréviation « SMAD » fait référence aux homologues avec les gènes SMA (phénotype du "petit" ver) de *Caenorhabditis elegans* et la famille MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") chez la drosophile.

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SRAS-CoV-2 : Syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2

TGF β : Facteur de croissance transformateur bêta

TBR2 : Eomesodermin également connue sous le nom de « T-box brain protein 2 »

TTR : Transthyrétine

TUJ : Beta-tubuline de classe 3 spécifique aux neurones

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

ZSV : Zone Sous Ventriculaire

ZSve : Zone Sous Ventriculaire externe

I. Introduction

L'exploration du cerveau humain, le mystère de son développement et la compréhension des troubles neurologiques sont un sujet d'étude fascinant pour la recherche médicale, et constituent un défi depuis des centaines d'années. La communauté scientifique a fait d'importants efforts dans ce domaine et divers modèles *in vivo* et *in vitro*, tels que des modèles cellulaires et animaux, ont été établis pour la recherche médicale. Ces outils ont considérablement amélioré notre compréhension des processus physiologiques et pathologiques du cerveau humain. Néanmoins, certaines découvertes précliniques acquises à partir de ces modèles n'ont pas pu être transposées avec succès dans la pratique clinique, en partie à cause de l'existence de différences de structure parfois subtiles, et de différences existantes dans la composition cellulaire entre le cerveau humain et les modèles utilisés¹.

Le développement de nouveaux modèles de recherche capables de mieux récapituler les caractéristiques du cerveau humain était donc indispensable pour répondre à ces problématiques.

Au cours des dernières décennies, l'énorme potentiel des cellules souches pluripotentes humaines, notamment concernant la capacité à se renouveler indéfiniment et à se différencier vers de multiples lignées cellulaires, a été un sujet d'attention tout particulier dans le domaine de la recherche biologique et des applications médicales².

Depuis quelques années a commencé à être étudiée la possibilité d'utiliser les cellules souches pluripotentes humaines dans la recherche en vue d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, et pour l'étude d'approches thérapeutiques des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, les progrès apportés dans la compréhension des cellules souches depuis la fin du XIX^{ème} siècle ont permis de faire évoluer les objectifs de recherche vers une étude de l'ensemble des types cellulaires composant les organes, ce qui a conduit au développement d'un nouveau modèle de recherche appelé organoïde. Ce nouveau modèle, dérivé de cellules souches pluripotentes humaines, s'est avéré prometteur pour la recherche biologique et médicale.

II. Différenciation cellulaire et cellule souche

A. Définition et classification des cellules souches

Le processus de différenciation cellulaire consiste en la formation de cellules spécialisées (plasmocytes, entérocytes, kératinocytes, pneumocytes, cardiomyocytes...) à partir d'une cellule non différenciée. Ce processus de différenciation est caractérisé par la mise en place de structures et de fonctions définitives de la cellule. Dans la dernière phase de la différenciation, les cellules ne sont généralement plus capables de division, et en fonction de leur nature peuvent parfois encore se déformer et se déplacer³.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler, de se multiplier à l'infini et de se différencier en cellules spécialisées. Tous les types cellulaires identifiés chez l'homme sont formés, à la base de leur processus de différenciation, de cellules souches. Cependant toutes les cellules souches ne sont pas capables d'engendrer l'ensemble des types cellulaires. La potentialité des cellules souches correspond à la capacité de ces cellules à se différencier pour donner un nombre plus ou moins important de types cellulaires différents. Ce caractère permet de les classer en différentes catégories :

- Cellules souches unipotentes pouvant donner un seul type cellulaire
- Cellules souches multipotentes pouvant donner plusieurs types cellulaires
- Cellules souches pluripotentes pouvant donner tous les types cellulaires d'un même organisme

- Cellules souches totipotentes, capables de se différencier pour donner l'ensemble des types cellulaires d'un même organisme, ainsi que toutes ses annexes embryonnaires (placenta et cordon ombilical). Elles sont issues des toutes premières divisions de l'ovule fécondé (entre la fécondation et le quatrième jour de développement embryonnaire) et sont les seules qui peuvent donner naissance à un embryon capable de s'implanter dans l'utérus et de se développer.³

Les cellules souches ont un rôle clef dans la formation des tissus au cours du développement embryonnaire et dans leur renouvellement chez l'adulte. Les propriétés particulières des cellules souches rendent leur utilisation très intéressante pour un grand nombre d'applications en biomédecine, et la question de leur disponibilité peut dès lors devenir problématique.

Deux sources potentielles distinctes ont été identifiées en étudiant la présence des cellules souches à l'état naturel chez l'homme : cellules souches adultes et cellules souches embryonnaires.³

B. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires composent l'intégralité de l'embryon lors des tous premiers stades de développement. L'obtention de ces cellules souches embryonnaires humaines implique la destruction d'un embryon humain désigné surnuméraire à un âge compris dans un intervalle de 5 à 7 jours de développement (stade blastocyste) (Figure 1). Les cellules recherchées sont alors des cellules souches pluripotentes. Cet embryon est généré au cours d'un protocole de procréation médicalement assisté (PMA) par Fécondation In Vitro (FIV). Le statut légal de ces embryons ainsi que leur destruction obligatoire soulèvent donc différents questionnements éthiques quant à leur utilisation pour l'extraction de cellules souches⁴. En France, l'utilisation de ces cellules est encadrée par la loi de bioéthique, qui permet la réalisation de travaux à visée thérapeutique uniquement pour des maladies graves incurables sans traitements, et est soumise à une autorisation par l'Agence de la Biomédecine.⁵

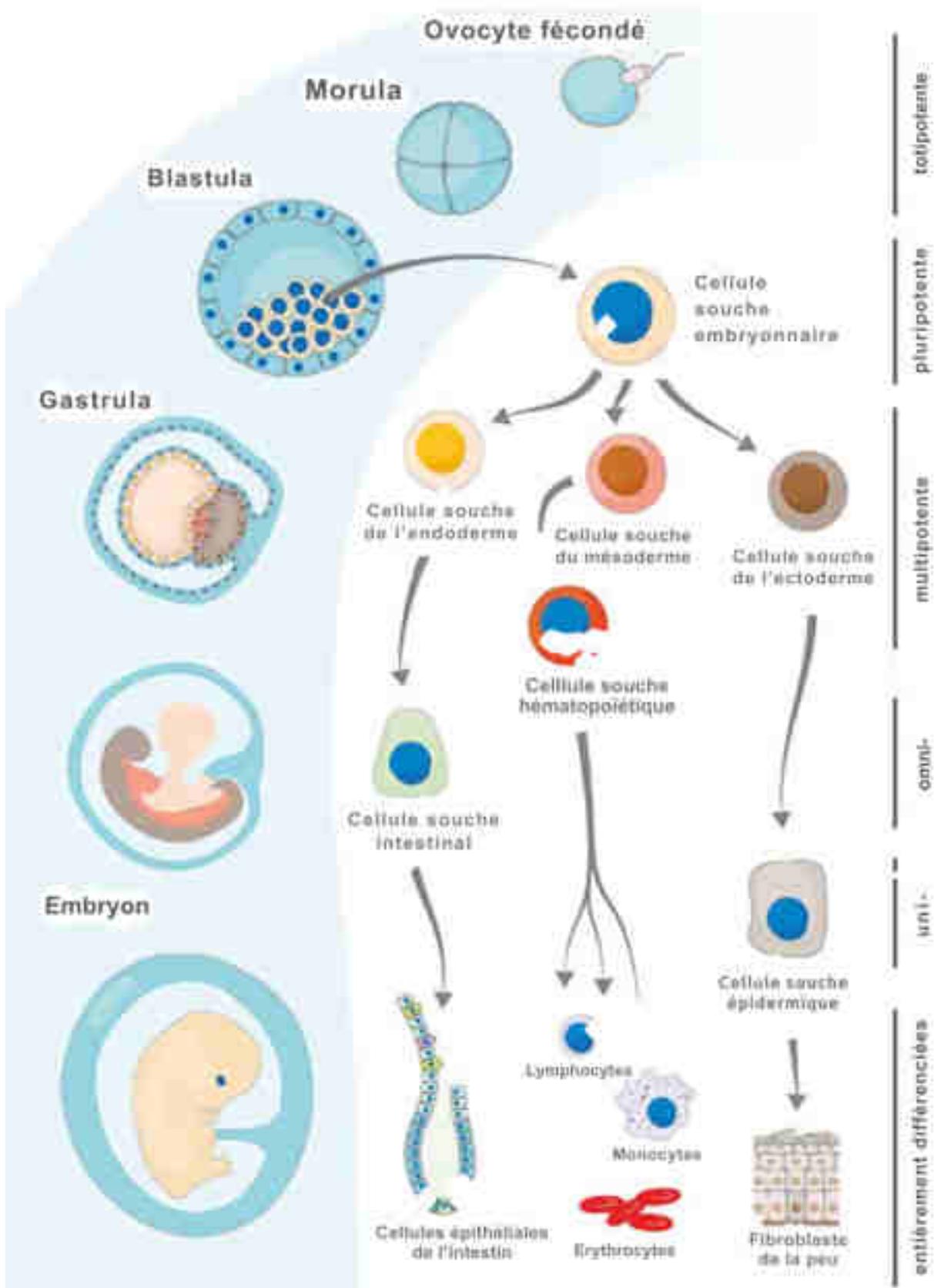


Figure 1 : Potentialité des cellules souches embryonnaires et exemple de différenciation des lignées cellulaires⁶

Les cellules souches embryonnaires pluripotentes sont prélevées au stade blastocyste (blastula), soit entre les jours 5 et 7 de développement.

C. Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes, appelées aussi cellules souches somatiques ou tissulaires se retrouvent dans la plupart des tissus, mais seront plus ou moins abondantes en fonction du taux de renouvellement du tissu. Les réservoirs de cellules souches sont par exemple très importants dans la peau où l'on retrouve les cellules souches de l'épiderme, ou dans la moelle osseuse qui abrite les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules représentent néanmoins une proportion très réduite des tissus qu'elles composent, et leur application biomédicale peut être limitée par la difficulté à les cultiver et par leur potentialité. En effet ces cellules sont unipotentes ou multipotentes, et ne peuvent donc donner accès qu'à un nombre réduit de types cellulaires différenciés.

Néanmoins, les propriétés particulières de ces cellules souches adultes sont mises à profit par la médecine depuis le siècle dernier, notamment pour les autogreffes (une autogreffe est une greffe où donneur et receveur sont la même personne. Le taux de réussite de ce type de greffe est maximal, puisque le complexe majeur d'histocompatibilité du donneur et du receveur est identique : aucune réaction immunitaire n'est déclenchée). On retrouve par exemple l'utilisation des cellules souches adultes pour des autogreffes de peau chez les grands brûlés pour reconstituer de large étendues de tissus abimés en profondeur. Le greffon est produit par amplification massive en culture de cellules de l'épiderme (les kératinocytes). Elle est effectuée à partir d'un échantillon de peau du patient qui contient des kératinocytes matures et une population minoritaire de cellules souches kératinocytaires. Notons encore l'exemple des autogreffes de moelle osseuse pour la reconstitution du réservoir de cellules souches hématopoïétiques chez les patients leucémiques mis en aplasie. Certains médicaments de chimiothérapie entraînent des effets secondaires temporaires caractérisés par une forte diminution des globules blancs, accompagnés d'une baisse des autres composants du sang (globules rouges et plaquettes) : c'est l'aplasie. Pour pallier à cela on réalise un prélèvement de moelle osseuse avant la chimiothérapie, ces cellules sont congelées et réinjectées au patient après le traitement par chimiothérapie. Les cellules souches hématopoïétiques retrouvent alors leur place dans la moelle osseuse.

Au sein des tissus, les cellules souches adultes sont localisées dans un microenvironnement spécialisé appelé niche, qui régule leur prolifération, leur mobilisation et leur différenciation. Ce microenvironnement spécifique, structure à la fois anatomique et fonctionnelle, permet de maintenir les cellules souches adultes dans un état indifférencié. Les caractéristiques de ce microenvironnement cellulaire très particulier sont difficiles à reproduire dans leur intégralité lors de la mise en culture des cellules souches adultes. On cherche alors à reproduire de manière sélective des caractéristiques clés de la niche. Pour cela on utilise divers facteurs de croissance, cytokines etc. Le but est de garder l'état de souche et l'autorenouvellement des cellules, tout en permettant au besoin d'induire une différenciation. Pour ce qui est du support, les cellules souches en culture sont le plus souvent maintenues sous forme de sphéroïde en suspension.

Chez les mammifères deux zones du cerveau sont connues pour accueillir ces niches de cellules souches : la zone sous-ventriculaire (ZSV) située le long des parois des ventricules latéraux et dans la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe⁷.

La découverte des cellules souches neuronales au stade adulte date du début des années 90⁸. Avant cela, on pensait que la neurogénèse (formation des neurones, voir plus bas) se produisait uniquement durant le développement embryonnaire, parfois encore un peu jusqu'à l'adolescence, et que le cerveau adulte ne comportait plus de cellules souches neuronales.

Les dernières recherches ont montré que dans le cerveau adulte subsistent des cellules souches neuronales qui sont présentes dans deux états ; actives ou quiescentes⁹. Ces états correspondent à deux processus importants de contrôle de la niche, la neurogénèse et la quiescence, respectivement. La quiescence est un état d'arrêt prolifératif réversible dans lequel les cellules ne se divisent pas

activement tout en conservant la capacité de réintégrer le cycle cellulaire après avoir reçu un stimulus approprié. Les cellules souches neuronales quiescentes se caractérisent par un faible taux de métabolites et une grande sensibilité aux signaux environnementaux, afin d'être rapidement réactivées le moment voulu.

L'activation des cellules souches neuronales quiescentes est décrite comme la première étape de la neurogenèse. La neurogenèse et la gliogenèse (formation de la glie, voir plus bas) sont contrôlées par une pléthore de facteurs synergiques et antagonistes, tels que des cytokines, des morphogènes ou des neurotransmetteurs du microenvironnement de la niche (Figure 2). Les morphogènes sont essentiels à la spécification des tissus au cours du développement du système nerveux central (SNC) chez l'embryon et l'adulte. Parmi les exemples fondamentaux de morphogènes, on peut citer Bone morphogenetic proteins (BMP), qui régule la neurogenèse en favorisant l'engagement astroglial des cellules souches neuronales ainsi que leur quiescence ; Notch, qui induit le maintien et la prolifération des cellules souches neuronales ; Wnt, qui favorise la quiescence et l'auto-renouvellement des cellules souches neuronales ; et Sonic Hedgehog (Shh), qui est responsable du maintien des cellules souches neuronales. Les cellules souches neuronales sécrètent également plusieurs facteurs solubles, tels que des facteurs de croissance et des facteurs neurotrophiques ou des cytokines, qui assurent la protection des cellules neurales existantes et le remplacement des cellules perdues.

Après activation, les cellules souches peuvent commencer à se différencier vers le stade de progéniteur sous l'effet de facteurs comme le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF). Comme les cellules souches, les cellules progénitrices ont la capacité de se différencier en un type de cellules spécialisées. Cependant, contrairement aux cellules souches, les cellules progénitrices sont déjà engagées dans la différenciation vers les types cellulaires cibles. La différence la plus importante entre les cellules souches et les cellules progénitrices est que les cellules souches peuvent se répliquer indéfiniment, alors que les cellules progénitrices ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois.

Le facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF) et l'acide rétinoïque (RA) augmentent le potentiel de différenciation en neurones et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) renforce le développement des oligodendrocytes, tandis que l'EGF, le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) et le BMP favorisent la différenciation en astrocytes (Figure 2).

Bien que les progéniteurs neuronaux donnent naissance aux trois types de cellules du SNC, elles ne sont pas multipotentielles pendant les premiers stades de la gestation - elles se différencient alors uniquement en neurones. Elles peuvent ensuite se différencier en astrocytes et en oligodendrocytes. Ces processus sont strictement régulés de l'extérieur par les cytokines, ainsi que par des programmes cellulaires internes, tels que la modification épigénétique. Il a été démontré que les membres de la famille de l'interleukine-6 (IL-6), y compris le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) ou le CNTF, ainsi que l'acide rétinoïque, induisent conjointement la génération d'astrocytes à partir des progéniteurs neuronaux. D'autres facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la neurogenèse adulte contribuent également à la prolifération et la génération de neurones à partir des progéniteurs neuronaux. En outre, il a été montré que l'insulin-like growth factor (IGF) inhibe la signalisation BMP, stimulant ainsi la différenciation des progéniteurs neuronaux en oligodendrocytes.

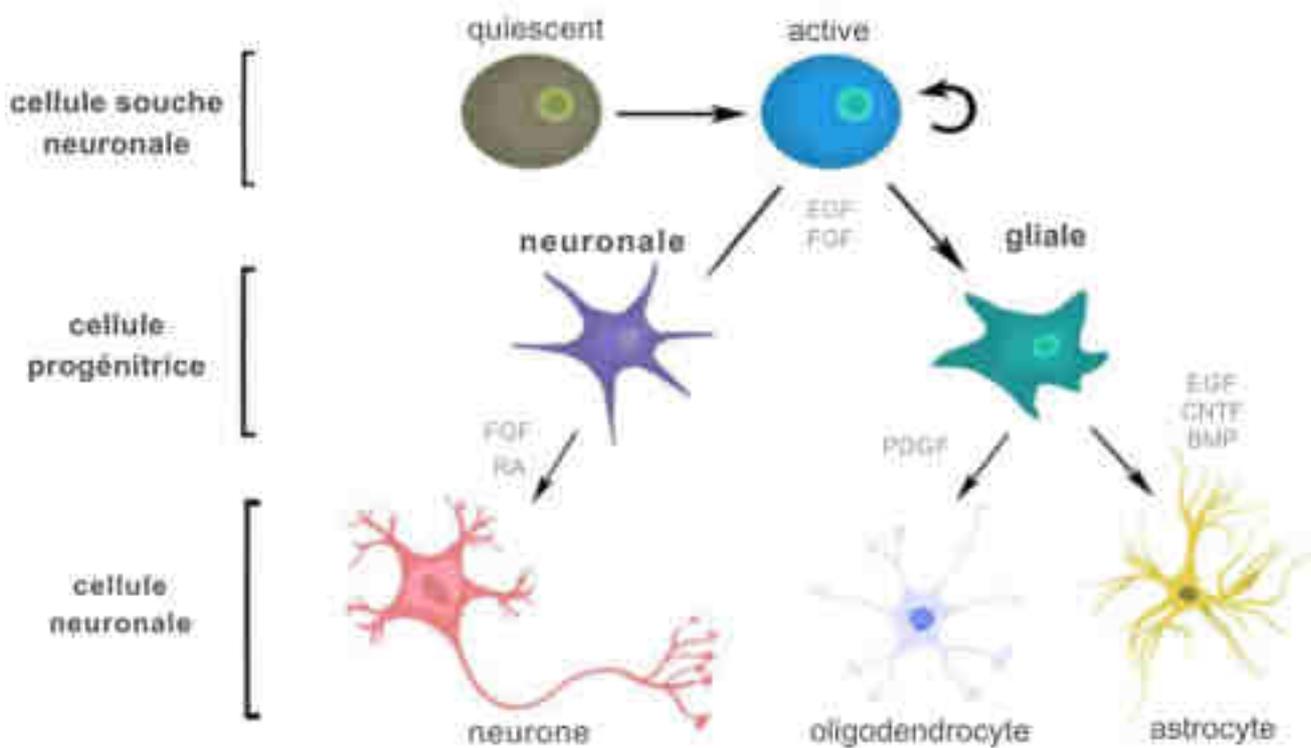


Figure 2 : Les processus d'activation et de différenciation des cellules souches neuronales sont contrôlés par de multiples molécules de signalisation⁹

Abréviations : protéines morphogéniques osseuses (BMP), facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance des fibroblastes (FGF), facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et acide rétinolique (RA).

D. iPSC : cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches humaines présentent donc des limites : biologiques pour les cellules souches adultes, éthiques pour les cellules souches embryonnaires. C'est pour répondre à ces problématiques qu'une équipe de chercheurs de l'Université de Kobé (Japon) a mis au point en 2006 une méthode de reprogrammation cellulaire visant à obtenir des cellules souches multipotentes à partir de cellules adultes différenciées¹⁰, basée sur l'expression forcée des gènes Oct3/4, Sox-2, c-Myc et Klf4 dans des cellules de souris. La réexpression de ces quatre gènes entraîne la « dédifférenciation » de ces cellules en cellules souches pluripotentes. Les cellules souches obtenues via cette technique sont nommées iPSC, pour « induced Pluripotent Stem cells » (cellules souches pluripotentes induites). Shinya Yamanaka, chercheur à l'origine de la découverte, a obtenu le Prix Nobel de médecine 2012 pour ses travaux en compagnie du britannique Dr J. B. Gurdon.

Seulement un an après, en 2007, Shinya Yamanaka a réussi à transformer des fibroblastes cette fois-ci d'origine humaine en iPSC à l'aide des quatre mêmes gènes clés, Oct4, Sox2, Klf4 et cMyc, en utilisant un système rétroviral. La même année l'équipe du professeur James Thomson aux États-Unis a utilisé un ensemble différent de facteurs, Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 dans un système lentiviral pour produire des iPSC, là encore à partir de fibroblastes humains¹¹. Depuis plusieurs protocoles ont été développés pour obtenir des iPSC humains à partir de kératynocytes¹², de cellules sanguines¹³ ou encore à partir de cellules épithéliales du rein recueillies dans les urines¹⁴. De nouveaux protocoles ont également enrichis la base de données des gènes utilisables pour la reprogrammation des cellules.

Les iPSC présentent toutefois des limites. L'étape de reprogrammation proprement dite prend environ deux semaines et a un rendement très faible: seulement 0,5 à 1 % des cellules traitées redeviennent pluripotentes⁵. L'amplification cellulaire et les tests (nécessaires pour écarter les risques d'anomalies génétiques chromosomiques, ainsi que pour assurer la bonne pluripotence des cellules) rallongent encore le protocole. Au final, l'obtention d'une lignée iPSC prend environ 6 mois. L'insertion génomique, fréquente avec les premiers vecteurs viraux utilisés, entraîne diverses mutations et pose également problème. L'utilisation de vecteurs non intégratifs a permis de pallier à cette problématique, mais ces nouveaux vecteurs ont tendance à rallonger encore la durée du protocole. Enfin, autre limite de ces cellules, la modification génomique peut entraîner l'expression de gènes oncogènes et conduire à une transformation tumorale.

Une fois reprogrammées en cellules pluripotentes, ces cellules peuvent être dirigées dans des voies de différenciation définies en utilisant divers facteurs de différenciation. Un fibroblaste reprogrammé pourra ainsi donner une cellule musculaire, un adipocyte, ou encore une cellule pancréatique... (Figure 3). Ainsi l'application de différents protocoles, avec divers facteurs de différenciation et l'utilisation dirigée de voies cellulaires, a permis la différenciation et la culture de cellules nerveuses spécifiques et la mise au point d'organoïdes neuronaux complexes (voir plus bas).

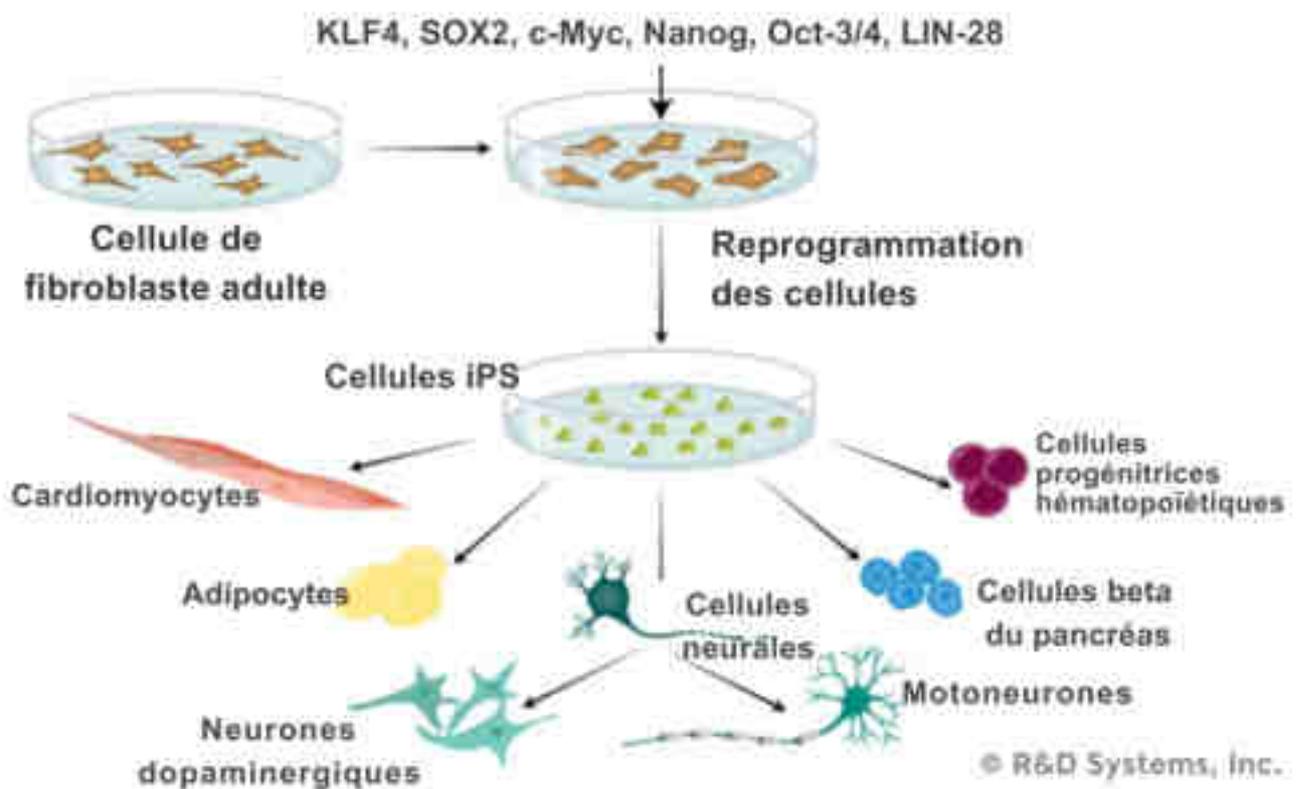


Figure 3 : Principe général de la technologie des iPSC⁵

Tout comme les cellules souches embryonnaires les iPSC peuvent se différencier en tout types de cellules de l'organismes et proliférer à l'infini. Elle présente en outre l'intérêt majeur de ne pas nécessiter la destruction d'un embryon surnuméraire. Elles peuvent également provenir de donneurs sélectionnés pour leur patrimoine génétique, permettant ainsi de modéliser aisément des maladies. Enfin elles peuvent être utilisées pour alimenter des banques dites « allogéniques » regroupant divers profils immunologiques utiles pour disposer rapidement d'iPSC compatibles avec le système immunitaire d'un receveur dans le cadre d'une greffe⁵.

Néanmoins, comme vu plus haut, les iPSC et les cellules qui en dérivent doivent faire l'objet de nombreux tests avant leurs utilisations. En effet la reprogrammation est susceptible d'entraîner de

nombreuses modifications sur les plans fonctionnel, épigénétique, immunologique et tumoral. Enfin la reprogrammation n'est pas toujours complète : les iPSC présentent parfois des anomalies acquises au cours de leur vie antérieure, notamment des signaux épigénétiques.

III. Le tissu neuronal

A. L'organisation du cerveau humain

Le cerveau avec la moelle épinière constituent le système nerveux central (SNC), capable d'intégrer les informations, de contrôler la motricité et d'assurer les fonctions cognitives.

Le cerveau d'un humain à l'âge adulte pèse environ 1,3 kg (75% d'eau) et est l'organe le mieux protégé. Il baigne dans le liquide céphalo-rachidien qui réduit les effets des chocs en agissant comme un isolant et un amortisseur, et est recouvert de 3 enveloppes appelées les méninges qui le protègent des blessures et des infections. L'ensemble est à l'abri derrière les os du crâne qui forment une coque solide le protégeant des chocs. Il consomme 15 à 20% de l'énergie produite par l'organisme, essentiellement du glucose, un sucre simple apporté par l'alimentation. Il est traversé par un grand nombre de vaisseaux sanguins indispensables pour couvrir les besoins importants d'apport en oxygène¹⁶.

Le cerveau est composé de 2 hémisphères (droit et gauche) qui sont réunis par le corps calleux. Chaque hémisphère cérébral (Figure 4) est composé du lobe frontal, lieu du raisonnement, des fonctions du langage et de la coordination motrice volontaire ; du lobe pariétal, siège de la conscience du corps et de l'espace environnant ; du lobe occipital, permettant l'intégration des messages ; du lobe temporal, centre de l'audition, de la mémoire et des émotions, d'un cerveau limbique (hippocampe, amygdale, hypothalamus...) pour traiter les informations du lobe temporal, et de l'insula permettant le traitement de la douleur, des odeurs et du goût. Le cervelet contrôle l'équilibre et la coordination des mouvements, et le tronc cérébral sert de passage entre les hémisphères cérébraux et la moelle épinière.¹⁷

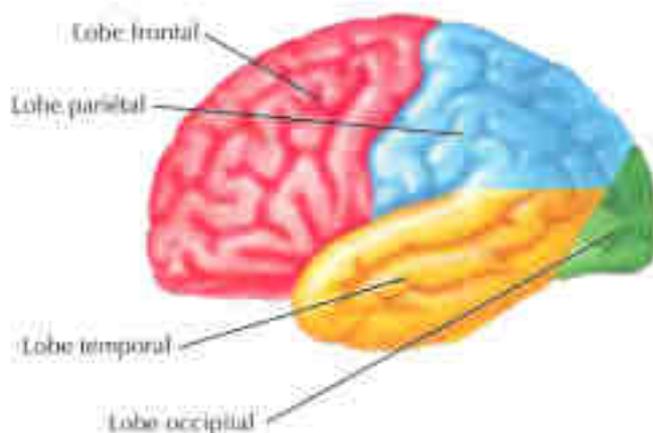


Figure 4 : Représentation schématique des différents lobes qui composent un hémisphère cérébral¹⁷

Vue latérale gauche.

Le cerveau humain est composé de plus de 100 milliards de cellules nerveuses, les neurones, qui forment un réseau câblé très précis. Le cerveau contient également le cortex ou matière grise : c'est la partie la plus superficielle du cerveau, en raison de la présence des corps cellulaires des neurones. On y trouve également la substance blanche, avec les prolongements des neurones (axones) entourés

d'une gaine de myéline, et les 4 ventricules cérébraux, cavités où circule le liquide céphalo-rachidien. Enfin, au centre, les ganglions de la base sont impliqués dans le contrôle du comportement et l'apprentissage.¹⁸

B. Les différents types cellulaires constituant le cerveau

Dans le cerveau, ainsi que dans la moelle épinière, différents types cellulaires aux activités interdépendantes et complémentaires coexistent et s'associent¹⁹ (Figure 5) :

- Le neurone, élément moteur du fonctionnement du tissu nerveux, joue le rôle principal dans la transmission de l'information par l'activation successive de mécanismes électriques et chimiques. Les neurones forment un réseau incroyablement complexe et dense. Chaque neurone est constitué d'un corps cellulaire (avec à l'intérieur le noyau contenant l'ADN), d'un axone qui transmet l'information et de dendrites qui la reçoivent.
- Les cellules gliales, estimées jusqu'à 50 fois plus nombreuses que les neurones, ont des fonctions spécialisées. On distingue :
 - Les astrocytes qui jouent un rôle clé dans de nombreuses fonctions du SNC, notamment l'homéostasie du glutamate, des ions (Ca^{2+} , K^+) et de l'eau, la défense contre le stress oxydatif/nitrosatif, le stockage de l'énergie, la biogenèse des mitochondries, la formation de cicatrices, la réparation des tissus par l'angiogenèse et la neurogenèse, et la modulation des synapses²⁰.
 - Les oligodendrocytes qui produisent la gaine de myéline, une enveloppe qui isole les axones de certains neurones et favorise ainsi la propagation de l'influx nerveux.
 - Les cellules microgliales qui assurent la fonction de sentinelles et préservent l'intégrité des neurones contre différents types d'agressions. Elles régulent également le développement du cerveau, la maintenance des réseaux neuronaux et la réparation des lésions. Les microglies servent donc de macrophages cérébraux mais sont distinctes des autres macrophages tissulaires en raison de leur phénotype homéostatique unique et de leur régulation étroite par le microenvironnement du SNC²¹.
 - Les épendymocytes qui bordent le canal de l'épendyme et les ventricules cérébraux. Ce sont des cellules épithéliales ciliées dont la fonction est d'assurer l'interface entre le système nerveux et le liquide cébrospinal qu'elles produisent et font circuler grâce à leurs cils mobiles.

Les deux principales cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes, apparaissent à la fin du développement embryonnaire, à partir du milieu du deuxième trimestre et après la naissance, lorsque les mêmes progéniteurs neuronaux qui étaient en cours de neurogenèse passent d'un destin principalement neurogène à un destin gliogène.²²

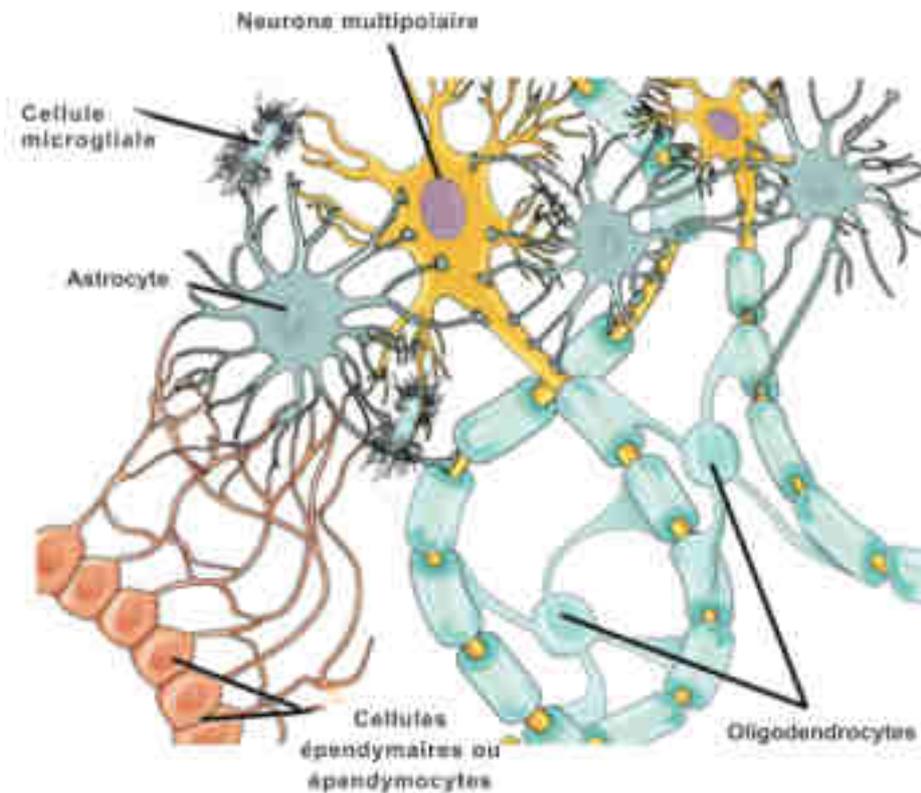


Figure 5 : Cellules gliales du système nerveux central³

Neurone multipolaire ; type de neurone qui possède un seul (généralement long) axone et de nombreuses dendrites.

C. Le développement du cerveau humain

i. Neurodéveloppement chez l'homme

Neurulation

La formation du système nerveux a lieu dès les premiers stades du développement embryonnaire chez l'Homme, aux alentours de la 3^{ème} semaine : c'est la neurulation (Figure 6). Cette étape comporte 3 stades : formation de la plaque neurale, formation de la gouttière neurale et formation du tube neural. C'est au cours de la neurulation que vont être formés tous les précurseurs cellulaires du SNC.²⁴

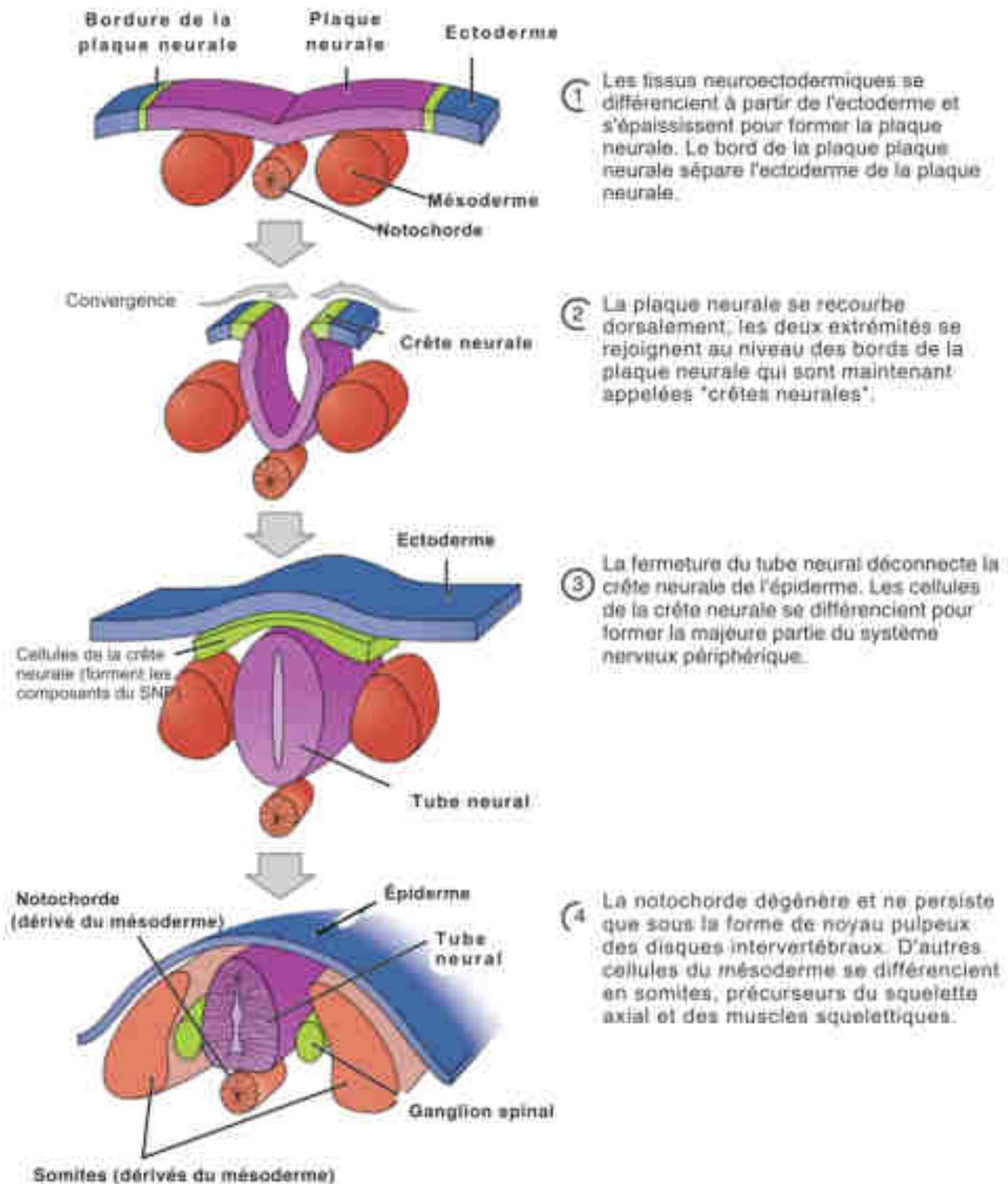


Figure 6 : Schéma du processus embryonnaire de la neurulation⁵

La notochorde est un cylindre de cellules issues du mésoderme (un des trois feuillet primitifs de l'embryon) qui se forme lors de la gastrulation. Au cours de la troisième semaine de développement, il induit la formation de la plaque neurale à partir de l'ectoderme (un autre feuillet primitif embryonnaire) qui le recouvre.

Les cellules de la notochorde produisent la protéine Shh, qui stimule la différenciation des cellules de l'ectoderme en cellules précurseurs du tissu nerveux.²⁶

Au 18^{ème} jour de gestation, la plaque neurale s'invagine pour former la gouttière neurale avec un pli neural de chaque côté. A la fin de la 3^{ème} semaine, les plis neuraux se rapprochent et fusionnent, formant ainsi le tube neural qui se sépare de l'ectoderme sous-jacent. Le tube neural entame sa fermeture à partir du rhombencéphale (à peu près au milieu du tube neural) vers les régions antérieures et postérieures et les extrémités (neuropores) se ferment aux alentours du 27^{ème} jour de gestation.

Les cellules précurseurs du tube neural sont des cellules souches neuronales qui, sous l'influence des facteurs sécrétés par la notochorde, pourront plus tard se différencier en neurones, astrocytes ou oligodendrocytes.

Lors de la fermeture du tube neural, une population de cellules se sépare de l'ectoderme au sommet des plis neuraux pour former les crêtes neurales. Ces cellules, après avoir migré, sont à l'origine du système nerveux périphérique (SNP) : ganglions sensoriels des nerfs spinaux et crâniens, ganglions sympathiques, cellules de Schwann, précurseurs des cellules neurosécrétrices de la médullo-surrénale, neurones du système entérique. Ces cellules sont également à l'origine de tissus non nerveux comme du cartilage, des mélanocytes et du tissu osseux. Cette première étape de formation du système nerveux se termine durant la quatrième semaine du développement embryonnaire.

Formation des vésicules cérébrales

La première étape de neurulation est suivie d'une intense phase de prolifération neuronale entre la 4^e et la 12^e semaine de gestation. Les futurs neurones migrent ensuite jusqu'à leur emplacement final, migration qui va durer de la 12^e semaine jusqu'à la naissance.

À l'issue du premier mois de gestation (aux alentours du 26^{ème} jour), des régions spécifiques du SNC commencent à se développer dans le tube neural, grâce à la neurogenèse et à la migration de cellules dans ces régions. Les vésicules cérébrales, correspondant à des épaissements de la paroi du tube neural, forment ensuite les grandes subdivisions de l'encéphale. On observe un gradient de développement depuis la partie caudale vers la partie rostrale, l'arrière se développant en priorité. Par ailleurs, certaines régions de l'encéphale se développent relativement plus que d'autres ; c'est notamment le cas du néocortex et du système visuel chez l'humain alors que pour d'autres espèces, comme le rat, c'est le système olfactif.

Chez l'Homme, comme chez tous les vertébrés, un stade transitoire à trois vésicules (prosencephale, mésencephale, rhombencéphale) est rapidement suivi par un stade à cinq vésicules (Figure 7) :

- le télencéphale (issu de la partie antérieure du prosencephale) est divisé en deux hémisphères cérébraux autour des ventricules latéraux : il donne naissance notamment au néocortex et à la formation hippocampique chez les mammifères ;
- le diencephale (issu de la partie postérieure du prosencephale) qui donne naissance au thalamus, à l'hypothalamus et à la rétine ;
- le mésencephale qui donne naissance aux colliculi (ou tubercules quadrijumeaux) ;
- le métencéphale (issu de la partie antérieure du rhombencéphale) qui donne naissance au cervelet et au pont ;
- le myélencéphale (issu de la partie médiane et postérieure du rhombencéphale) qui donne naissance au bulbe rachidien.

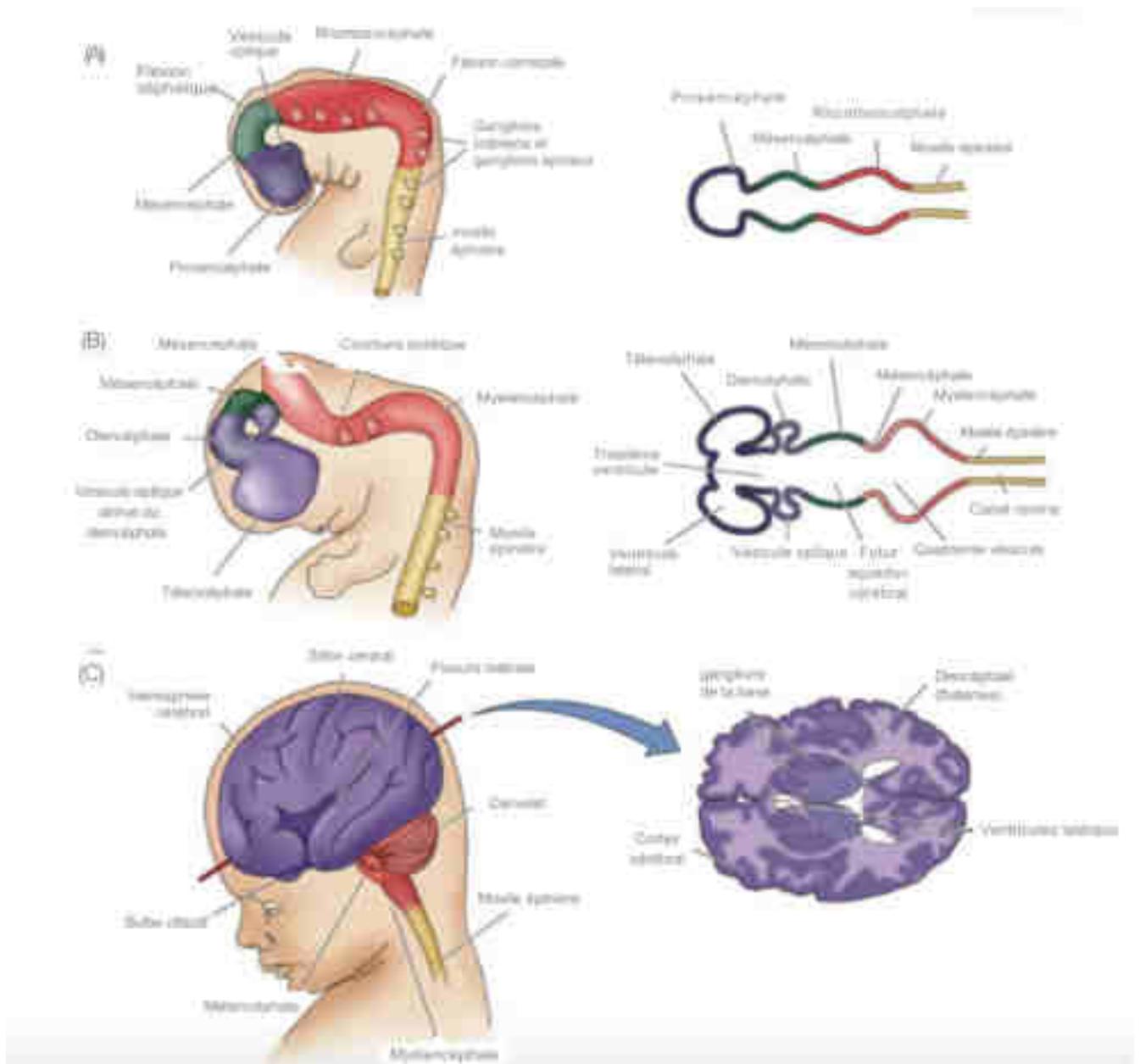


Figure 7 : Schéma du développement des vésicules primaires et secondaires chez l'homme²⁷

Le cerveau embryonnaire se complexifie grâce à des élargissements du tube neural appelés vésicules ;

A gauche, les figures (A) et (B) sont des schémas du tube neural en vue latérale gauche.

A droite, les figures (A) et (B) montrent le tube neural vue du dessus, en le représentant étiré à plat et en coupe transverse.

(A) entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de développement embryonnaire on observe le stade des vésicules primaires, qui comporte trois régions (prosencéphale, mésencéphale, rhombencéphale). En jaune est représentée la moelle épinière.

(B) A la 5^{ème} semaine de développement le stade des vésicules secondaires comporte cinq régions.

(C) La section de droite montre un plan de coupe du cerveau antérieur effectuée au niveau indiqué en rouge.

Le cerveau continue de se développer longtemps après la naissance ; le pic majeur de croissance se situe quatre mois après la naissance, mais chaque région du cerveau possède un rythme de développement qui lui est propre. Ainsi les différentes régions possèdent chacune des périodes de vulnérabilité prénatale ou postnatale qui leurs sont propres. Dans ces périodes de vulnérabilité, le cerveau sera alors plus sensible aux facteurs environnementaux qui pourront influencer son développement. En dehors de ces périodes, le cerveau sera plus résilient face aux agressions.

ii. Neurogenèse chez l'homme

La neurogenèse désigne l'ensemble du processus de formation d'un neurone fonctionnel du système nerveux à partir d'une cellule souche neuronale. Elle se déroule principalement au cours du développement neuronal chez l'embryon et l'enfant et se poursuit ensuite tout au long de la vie²⁸.

Chez l'embryon les premiers neurones proviennent du neuroectoderme, lui-même issu de l'ectoderme, et migrent lors de la formation des structures du SNC. A partir de leurs corps cellulaires se développent des prolongements cellulaires ou neurites : axones et dendrites. Les neurones sont généralement très ramifiés et comportent de nombreuses neurites.

À l'extrémité distale de l'axone (mais aussi, dans une moindre mesure, des dendrites), une structure connue sous le nom de "cône de croissance" facilite la croissance et la progression du neurite en assurant un couplage mécanique avec le substrat environnant qui est composé de la matrice extracellulaire, d'autres neurites et de cellules gliales. Sensible à l'environnement moléculaire, ce cône de croissance guide la croissance des neurites, contribuant ainsi à la formation du réseau fonctionnel éminemment complexe qu'est le système nerveux. C'est ce cône de croissance qui va permettre d'aboutir à de nouvelles synapses lors de la formation de « zone de contact » (Figure 8) avec les neurones environnants. C'est la synaptogenèse. Le neurone doit être capable d'établir des synapses avec des milliers d'autres neurones, qui ne sont pas forcément ses plus proches voisins.

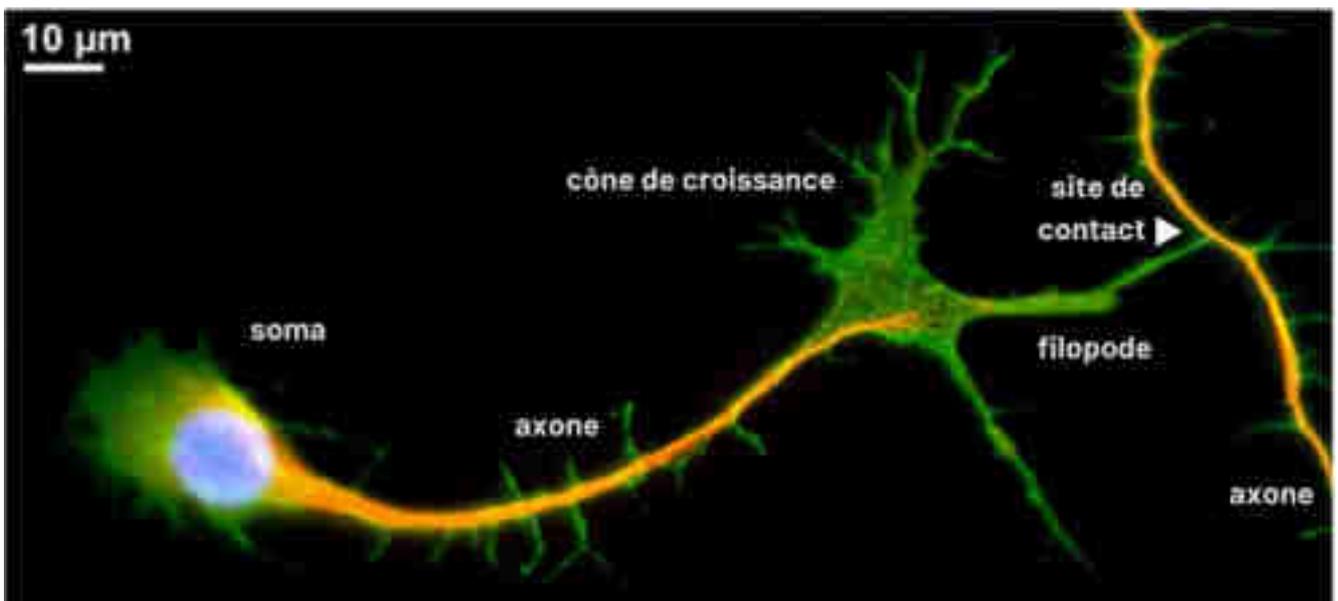


Figure 8 : Illustration d'un cône de croissance (growth cone en anglais)

Neurone entrant en contact avec l'axone d'un autre neurone à l'aide de son cône de croissance.

Micrographie superposée des colorations d'immunofluorescence ; vert : NCAM1 (glycoprotéine de surface, responsable de l'adhésion), rouge : tubuline, bleu : noyau.

Soma : corps cellulaire contenant le noyau ; filopode : projection cytoplasmique.

D'après les travaux de G.E. Pollerberg et al., University of Heidelberg, Germany²⁹

Une neurogenèse réparatrice peut également se produire à la suite d'un traumatisme (comme par exemple un accident vasculaire cérébral ou une ischémie) via l'activation de cellules souches neurales endogènes, bien que ce mécanisme imparfait ne permette pas une régénération complète des structures affectées.³⁰

La neurogenèse englobe la différenciation d'une cellule souche neuronale en cellules neuronales ainsi que la fonctionnalisation et l'intégration dans le système nerveux des cellules différenciées.

Elle comprend différents stades :

- différenciation d'une cellule souche multipotente en neuroblaste (cellule progénitrice des neurones) ;
- migration du corps cellulaire vers la région du cerveau ciblée ;
- mise en place du corps cellulaire et prolongement de l'axone vers sa cible (par développement d'un cône de croissance) ;
- formation des dendrites et formation des synapses ;
- maturation par renforcement des synapses « utiles » et élimination des neurones non utilisés ;
- plasticité (capacité du système nerveux à s'adapter en réponse à un stimuli intrinsèque ou extrinsèque via une réorganisation de sa structure, de ses connections ou de ses fonctions).

Pendant la gastrulation, le feuillet ectodermique, situé à la surface de l'embryon, reçoit sur une partie de sa surface des signaux du mésoderme sous-jacent. Ces signaux entraînent la différenciation d'une partie du tissu en neuroectoderme, tandis que le reste de l'ectoderme devient de l'épiderme. Cette différenciation entre deux identités cellulaires différentes (les futurs tissus nerveux et épidermique) repose sur des gradients de molécules sécrétées qui activent ou inhibent la différenciation, notamment BMP, les protéines Wnt (mise en place de la polarité dorso-ventrale, développement du cône de croissance lors du guidage axonal ou maintien à l'état indifférenciées des cellules souches selon la concentration) et Shh.

La formation de ces gradients de molécules antagonistes permet le guidage axonal à partir du cône de croissance et constitue l'un des mécanismes les plus importants pour expliquer l'embryogenèse.

Entre la 10^{ème} et la 20^{ème} semaine de grossesse chez l'homme, la neurogenèse proprement dite a lieu : les cellules souches présentes dans le tube neural se multiplient massivement et se différencient pour former l'ensemble des cellules gliales et des neurones du système nerveux. La cavité du tube neural, formée lors de la neurulation, constitue les futurs ventricules du cerveau et le canal épendymaire de la moelle épinière. C'est à l'intérieur de cette cavité que circule le liquide céphalo-rachidien. Cette cavité sert de base interne au système nerveux, le bord externe se trouvant en périphérie. Le tissu nerveux est initialement constitué d'une seule couche de cellules et se développe vers l'extérieur sur les bords des ventricules. Les divisions cellulaires ont lieu à proximité de la lumière du tube neural et les futurs neurones migrent ensuite vers le bord extérieur du tube neural. Les cellules qui prolifèrent sont appelées cellules neuroépithéliales et sont, par définition, des cellules souches neurales (cellules progénitrices multipotentes dites précoces).

Lors de la neurogenèse embryonnaire humaine, un stock d'environ 86 milliards de neurones est formé. Ces nouveaux neurones sont ensuite assemblés en six couches superposées et forment le cortex cérébral pendant la migration entre la 12^{ème} et la 24^{ème} semaine. Contre intuitivement, la majorité des neurones nouvellement formés migrent plus loin que ceux déjà présents, de sorte que la couche corticale est formée de l'intérieur vers l'extérieur. Les premières cellules formées sont les neurones, les cellules gliales sont formées plus tardivement par d'autres mécanismes. Contrairement au neurone, qui est une cellule post-mitotique (ayant perdu la capacité de se diviser) les cellules gliales pourront continuer à proliférer localement.

Une séquence ordonnée de processus permet ensuite de former un SNC mature : différenciation, synaptogenèse, apoptose, gliogenèse et myélinisation. Au cours de cette période, commence une intense phase de "tri" des neurones qui se caractérise par une activité apoptotique importante qui se poursuit plusieurs mois après la naissance. Les neurones qui s'intègrent correctement commencent à

former des synapses à partir de la 19^{ème} semaine de gestation jusqu'à l'adolescence, c'est la synaptogenèse. Enfin, les axones conservés sont peu à peu myélinisés pour renforcer la structure cérébrale et améliorer la communication neuronale ; cette dernière étape s'étend de la 29^{ème} semaine jusqu'à l'âge adulte.

Cette neurogénèse « de développement » qui débute à l'âge embryonnaire n'est pas l'unique période de formation de nouveaux neurones : longtemps discuté, les recherches récentes ont démontré que la neurogénèse continue tout au long de la vie et jusqu'à des âges avancés³¹. Les nouveaux neurones sont produits dans le gyrus denté de l'hippocampe, structure impliquée dans les processus de mémoire.

IV. Les organoïdes

A. Définition

Un organoïde est un tissu tridimensionnel (3D) auto-organisé composé de cellules spécifiques d'un organe, dérivées de cellules souches ou progénitrice. Ensemble, ces cellules reproduisent dans une certaine mesure l'architecture et la fonctionnalité de l'organe natif.

Trois éléments caractérisent un organoïde³² :

- la composition : on retrouve dans un organoïde plusieurs types de cellules spécifiques de l'organe simulé.
- l'organisation : l'organisation spatiale d'un organoïde est similaire à celle de l'organe simulé.
- la fonctionnalité : l'organoïde récapitule une fonction spécifique de l'organe simulé (contraction, activité neuronale, filtration, excrétion...)

Les organoïdes ne peuvent donc pas être assimilés à des organes artificiels, mais plutôt à des structures simplifiées dont le processus de formation est semblable à celui des organes naturels. Ce processus ne permet toutefois pas d'aboutir à un résultat strictement identique à l'organe reproduit *in vitro*. Un organoïde reproduit donc partiellement la complexité physiologique de l'organe simulé, et peut à ce titre être qualifié de modèle biologique.

Comme modèle *in vitro*, les organoïdes présentent de multiples avantages par rapport aux cultures cellulaires bidimensionnelles (2D) et aux modèles animaux traditionnellement utilisés.

En comparaison aux cultures cellulaires classiques en 2D, les organoïdes offrent des conditions physiologiques plus proches de celles des organes humains et permettent de reproduire les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, ce qui en fait un modèle de recherche plus complet. En outre, les réseaux de signalisation cellulaire sont modifiés dans les cultures 2D par rapport à la 3D³³, ce qui pourrait par exemple expliquer pourquoi les résultats observés lors de test de médicaments *in vivo* ne reproduisent pas toujours les résultats observés *in vitro* sur des cultures 2D.

Les organoïdes sont également plus performants que les modèles animaux pour différentes utilisations. Ainsi, bien que les modèles animaux puissent tout comme les organoïdes être manipulés via des technologies d'édition du génome, et bien qu'ils aient la capacité de fournir un environnement physiologique complet, les organoïdes peuvent être plus largement développés en culture tout en conservant une stabilité génomique, ce qui les rend plus adaptés que les modèles animaux pour le criblage à haut débit et la constitution de biobanques. De plus, pour une utilisation dans le domaine de la recherche en neurologie, il existe plusieurs différences structurales entre les cerveaux humain et murin qui limitent les possibilités de recherches sur le modèle animal. La couche fibreuse interne (IFL)

et la zone sous-ventriculaire externe (ZSVe) du cerveau humain sont par exemple absentes du cerveau de la souris³⁴. Le cortex humain est également plus étendu que celui de la souris, avec une surface et un nombre de neurones multipliés par plus de 1000³⁵. Enfin, certains types de cellules, comme les astrocytes interlamellaires³⁶ et les neurones d'églantier³⁷, présentent des caractéristiques spécifiques chez l'homme par rapport à la souris. Ces différences expliquent en partie les échecs de l'utilisation des modèles murins dans les études précliniques pour le développement de thérapies et la méconnaissance des troubles neurologiques humains³⁵.

Enfin l'étude par dissection post-mortem de cerveau humain, utilisée pour comprendre la structure anatomique, n'est, par définition, pas utile pour l'exploration des propriétés physiologies de l'organe. Comme le modèle post-mortem ne représente que l'état final (sans activité électrique et sans aucune interaction cellulaire) il ne peut pas reproduire pleinement les caractéristiques uniques et dynamiques du cerveau humain, qu'il soit sain et mature, en développement ou dans des fonctionnements pathologiques.

B. Histoire du développement des techniques de production d'organoïdes

Les découvertes concernant les cellules souches et les possibilités de culture cellulaire en 3D ont conjointement alimenté le développement des techniques ayant conduit aux organoïdes.

En 1096 Ross G. Harrison est parvenu pour la première fois à cultiver des morceaux de tissu embryonnaire de grenouille en 3D³⁸ (Figure 9). Ses recherches avaient pour but l'observation de la croissance de l'extrémité d'un nerf. Il a réussi à cultiver les cellules dans des gouttes de lymphes de grenouille adulte coagulé, scellé avec de la paraffine. L'ensemble était aisément observable au microscope.

En 1907 à Chapel Hill (Caroline du Nord), Henry Van Peters Wilson a démontré la capacité des cellules d'éponge dissociées à s'auto-organiser pour régénérer un organisme entier, ce qui constitue la première observation du phénomène de réassemblage de tissus dissociés³⁹.

En 1987, l'importance de la matrice extracellulaire (MEC), qui allait orienter les recherches sur l'importance de la composition de la niche, a été mise en évidence par Li et al. qui ont utilisé le Matrigel, développé en 1977⁴⁰ (Figure 9). Le Matrigel est une membrane basale reconstituée dérivée d'extraits de tumeurs de souris Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) qui en se solidifiant forme une structure équivalente à une matrice extracellulaire de par sa composition, sa structure et ses propriétés physiques. Les composants les plus importants du Matrigel sont la laminine, le collagène IV, l'entactine et l'héparan sulfate protoglycan, ainsi que de nombreux facteurs de croissances présent naturellement dans la tumeur EHS. Ces facteurs de croissance sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que la vascularisation des tissus. En utilisant ce milieu EHS ils ont pu faire croître et différencier un épithélium mammaire sous forme de conduits et canalicules 3D entièrement formés, capable de sécréter de protéines du lait⁴¹ (Figure 9).

La recherche autour des cellules souches s'est accélérée à la toute fin du XX^{ème} siècle, avec pour la première fois en 1981 l'isolement de cellules souches pluripotentes de souris à partir d'embryons précoces de souris⁴², et quelques années plus tard, en 1998, l'isolement de cellules souches embryonnaires humaines à partir de blastocystes humains⁴³. Les cellules souches sont définies comme des cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler, de se multiplier à l'infini et de se différencier en cellules spécialisées. Tous les types cellulaires identifiés chez l'homme sont formés, à la base de leur processus de différenciation, de cellules souches. Prélevées au stade blastocyste, entre 5 et 7 jours de développement embryonnaire, les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes,

pouvant donner tous les types cellulaires d'un même organisme. L'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines nécessite cependant la destruction de l'embryon qui ne survit pas au prélèvement. Les premiers isollements de cellules souches embryonnaires murines puis humaines, en jetant les bases de l'émergence du travail sur les cellules souches, ont permis le développement de la technologie des organoïdes.

En parallèle, en 1981, pour la première fois des cellules de l'épiderme ont été mises en culture puis greffées (autogreffe) à deux patients grands brûlés⁴⁴. Les patients étant des brûlés ayant subi des brûlures sur plus de 20 % de la surface totale de leur corps, dont 10 % constituent des lésions profondes. C'est la première expérience à succès de mise en culture d'un organe. Cette découverte a révolutionné la prise en charge des grands brûlés, tout en permettant un progrès important dans les techniques de culture cellulaire.

Une découverte fondamentale dans le domaine des organoïdes a eu lieu en 2009, lorsqu'une équipe de l'université d'Utrecht dirigée par Hans Clevers a généré des organoïdes intestinaux à partir de cellules souches intestinales adultes en les cultivant en 3D dans du Matrigel⁴⁵ (Figure 9), ce qui a constitué une avancée technologique majeure à la base de nombreux systèmes organoïdes développés par la suite.

1906 Harrison
Méthode de culture cellulaire en gouttelette suspendue

1925 Strongways & Fell
Cellules en tube

1952 Mozzoni & Mozzoni
Dissociation et aggrégation de cellules au stade de l'organe d'embryon précoce de poulet

1956 Ehrmann & Gey
Colléne recristallisé à partir de squelet de rat

1960-1977
Culture de différents types cellulaires sur des gels de collagène I

1975 Michalopoulos and Pitot
Observation des hépatocytes sur des gels de collagène Natana

1977 Smerman and Pitika
Culture de cellules épithéliales mammaires différenciées sur des gels de collagène Natana

1906
1914
1925
1952
1954
1956
1957
1960
1973
1975
1977

1914 Thomson
Dissociation des cellules "corréolées" et leur croissance lorsque l'organisation et le fonctionnement des tissus sont perdus

1925 Fell & Reissler
Méthode du verre laiton

1954 Trauell
Méthode de culture cellulaire en grille

1957 Lasbergues
Dissociation des cellules mammaires en suspensions à l'aide de la collagénase de Clostridium

1973 Gahrberg & Hakomori, Rosenfeld et al., Hynes
Découverte de la Fibronectine

1977 Okin
Gel solide à partir de la matrice de chondrocytes, GHS, source essentielle sous le nom de Matrigel

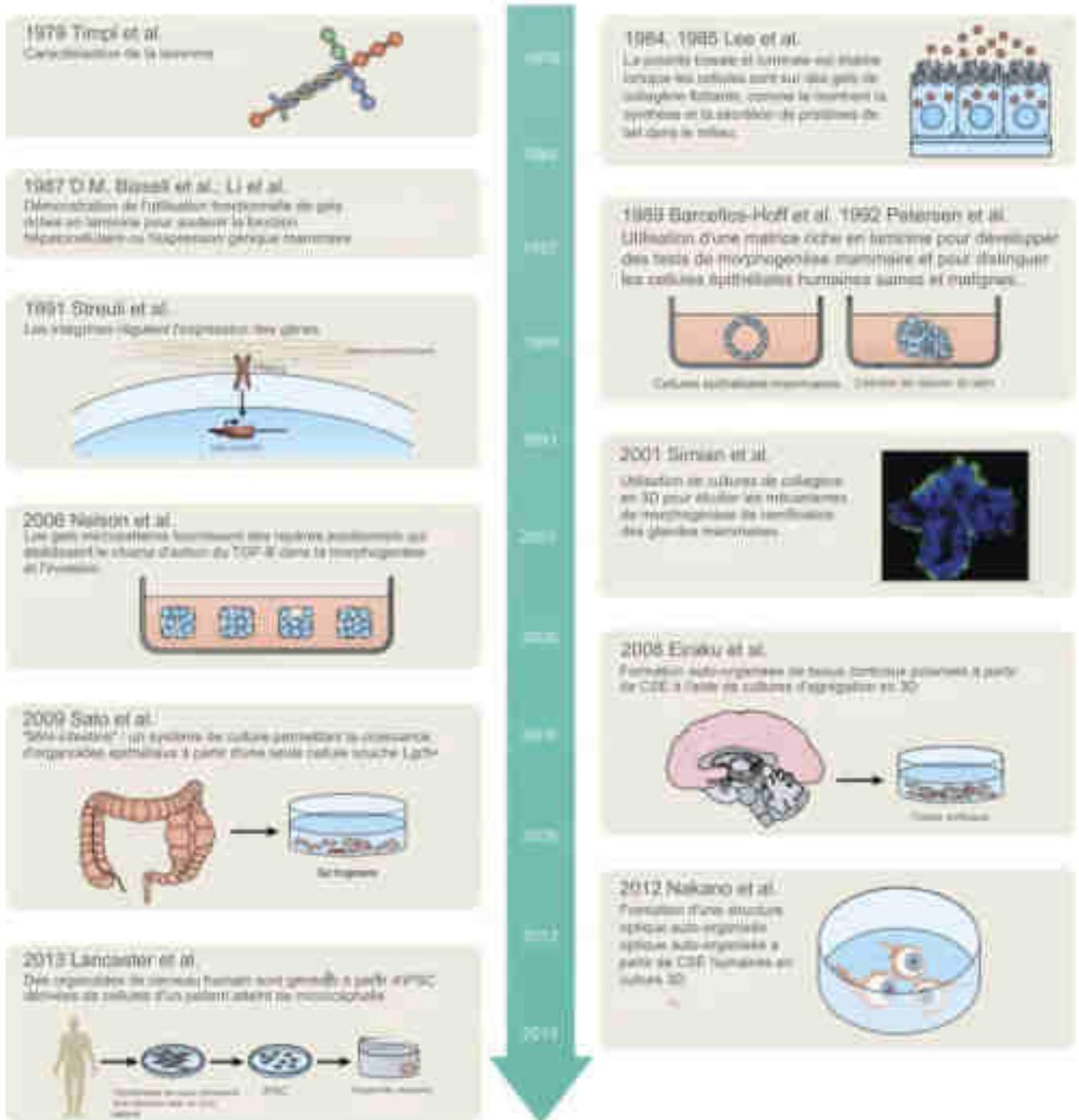


Figure 9 : Chronologie des techniques et expériences ayant conduit au développement des connaissances actuelles concernant la culture cellulaire en 3D et les organoïdes⁴⁶

Fibronectine : Glycoprotéine homodimérique de la matrice extra-cellulaire impliquée dans l'adhésion des cellules (migrations cellulaires). Parmi les récepteurs à la fibronectine sont les intégrines, capables de mécano-transduction.

Matrigel : Mélange gélatineux de protéines sécrétées par des cellules de sarcome de souris (Engelbreth-Holm-Swarm EHS) qui ressemble à de la matrice extra-cellulaire.

Laminine : Protéine de la matrice extracellulaire, composant de base de la « basal lamina », très importante pour l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire (hétérotrimérique). La basal lamina est sécrétée par les cellules épithéliales et forme une partie de la « basement membrane ».

V. Les organoïdes neuronaux humains

Des technologies de production d'organoïdes neuronaux humains (Figure 10), systèmes de culture 3D in vitro simulant des cerveaux humains, se sont développées par étapes ces dernières années, et continuent à être améliorées.

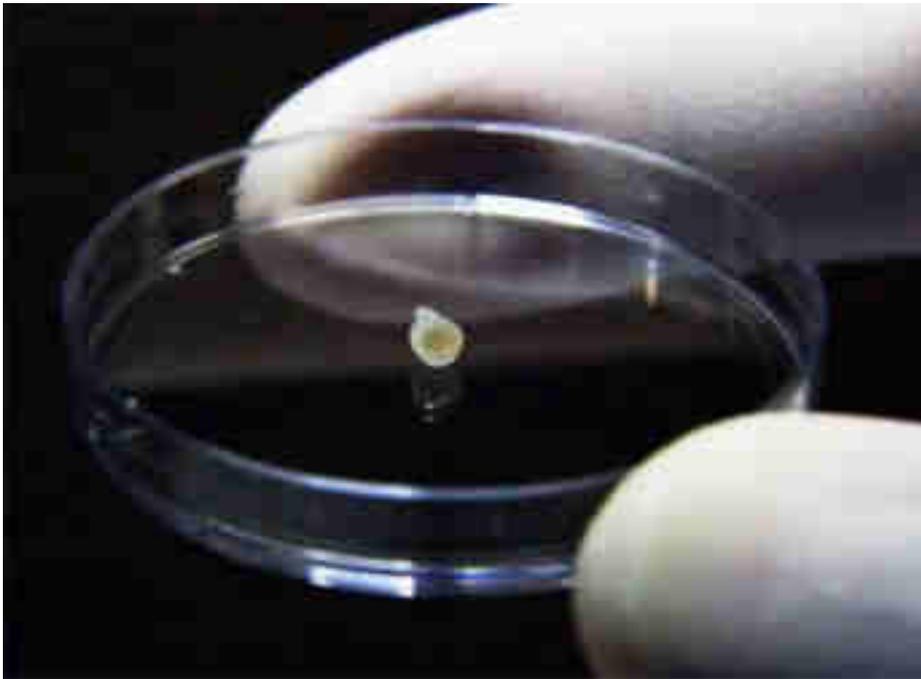


Figure 10 : Photo d'un organoïde neuronal humain, ou « mini-brain » en anglais

Le pigment noir est la neuromélanine, une caractéristique du mésencéphale.

Crédit image : Agency for Science, Technology, and Research.

A. Développement du premier organoïde neuronal humain

En 2008, au RIKEN Center for Developmental Biology au Japon, Yoshiki Sasai et ses collègues ont généré du tissu cérébral tridimensionnel à partir de cellules souches embryonnaires de souris.⁴⁷ Dans cette étude, le tissu neuronal murin induit a montré une activité neuronale synchronisée et a été transplanté et intégré avec succès dans des cerveaux de souris.

La première expérience couronnée de succès pour la génération d'organoïdes neuronaux humains a été réalisée par l'équipe du docteur Madeline Lancaster en 2013 en Autriche, à l'Institut de Biotechnologie Moléculaire de l'Académie Autrichienne des Science (IMBA)⁴⁸.

La méthode décrite (Figure 11) débute avec la génération de corps embryoïdes (EB) à partir de cellules souches pluripotentes humaines obtenues par reprogrammation de fibroblastes de peau de patients atteints de microcéphalie (technique de reprogrammation classique pour obtenir des iPSCs, via transfection avec un lentivirus des gènes Oct3/4, Sox-2, c-Myc et Klf4). Chaque corps embryoïde produit contient les trois couches germinales : l'ectoderme, à l'origine du tissu neuronal dans le développement du corps humain, le mésoderme et l'endoderme. Les corps embryoïdes ont ainsi été placés dans un milieu d'induction neuromusculaire pour induire la formation du neuroectoderme⁴⁹ par différenciation de l'ectoderme.

Au jour 11 les corps embryoïdes différenciés ont été intégrés dans des gouttelettes de Matrigel, qui ont fourni un support pour la croissance en 3D de structures organoïdes complexes.

Les tissus cultivés ont alors commencé à former des bourgeons neuroépithéliaux clairement étendus contenant des cavités remplies de liquide rappelant les ventricules du cerveau. Au jour 15 les organoïdes toujours incorporés dans le Matrigel ont été transférés dans un bioréacteur rotatif afin d'améliorer l'absorption d'oxygène et de nutriments pour une maturation et une conservation plus poussées. Les organoïdes neuronaux ont commencé à présenter une différenciation neuronale après 1 mois de culture. Au cours des 1 à 2 mois suivants, le tissu cérébral s'est progressivement étendu et épaissi pour mimer différentes régions du cerveau, notamment le cerveau antérieur, les plexus choroïdes, l'hippocampe, le cerveau antérieur ventral et la rétine. La croissance des tissus organoïdes cérébraux générés par cette méthode s'est arrêtée au bout de deux mois et leur taille a régulièrement diminuée après cinq ou six mois, mais ces organoïdes ont pu être maintenus en l'état jusqu'à un an dans le bioréacteur rotatif⁴⁸.

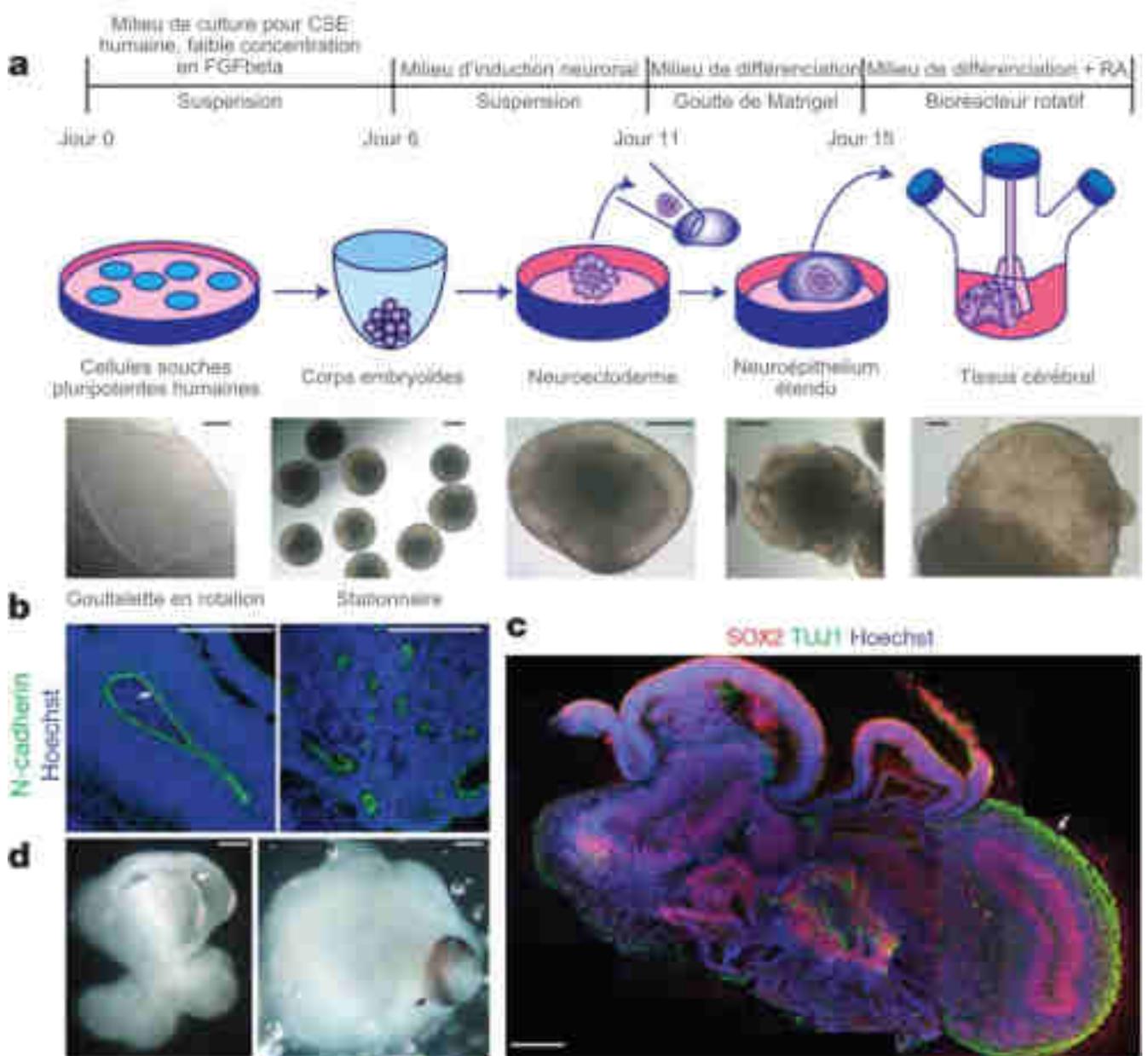


Figure 11 : Protocole de culture d'organoïdes neuronaux humains d'après les travaux de l'équipe du Dr Lancaster³⁴

B - Les tissus neuroépithéliaux générés dans des gouttelettes en rotation (à gauche) présentaient de grandes cavités remplies de liquide et une localisation apicale typique de la N-cadhérine neuronale (flèche). Ces tissus étaient plus grands et plus continus que les tissus cultivés en suspension stationnaire sans Matrigel (à droite).

C - La coupe et l'immunohistochimie ont révélé une morphologie complexe avec des régions hétérogènes contenant des progéniteurs neuraux (Sox-2, rouge) et des neurones (TUJ1, beta-tubuline de classe 3 spécifique aux neurones, en vert) (flèche).

D - Microscopie en champ clair à faible grossissement révélant des cavités remplies de liquide rappelant les ventricules (flèche blanche) et le tissu de la rétine, comme indiqué par l'épithélium pigmenté de la rétine (flèche noire).

Barres d'échelle, 200 µm.

B. Composition cellulaire d'un organoïde neuronal humain

i. Analyse de la composition cellulaire

Les premiers organoïdes neuronaux développés par l'équipe de Lancaster ont été étudiés par caractérisation histologique (principalement immunohistochimie). On a observé une régionalisation précoce de l'organoïde neuronal dès un mois de culture, avec notamment le développement du cerveau antérieur (télencéphale et diencephale).⁴⁸ En partant de ces données, l'équipe du Dr Arlotta de l'université d'Harvard (Harvard Stem Cell Institute, HSCI), a étudié en 2017 la composition cellulaire de 31 organoïdes neuronaux humains générés selon le protocole mis au point par Lancaster (Figure 12).⁵⁰ Plus de 80 000 cellules individuelles isolées à partir des organoïdes aux stades 3 et 6 mois ont fait l'objet d'un profilage moléculaire par séquençage de l'ARNm ciblé sur cellules uniques en microfluidique de gouttes (Drop-seq). La revue des données issues de l'analyse de toutes les cellules des organoïdes à 6 mois de développement a permis d'identifier six populations principales distinctes sur le plan transcriptionnel, appartenant à la lignée neuroectodermique, comme les astrocytes, les progéniteurs et les cellules du diencephale qui donneront naissance à la rétine, ce qui concorde avec le développement endogène du cerveau fœtal humain. En répétant l'analyse sur les cellules présentes à 3 mois de développement, l'équipe du Dr Arlotta a pu constater que certains types cellulaires identifiés au stade 6 mois de développement étaient encore totalement absents à 3 mois. Il s'agissait notamment des neurones à projection callosale, des cellules gliales de Müller et des cellules bipolaires. De même, les marqueurs des photorécepteurs (Cone Rod Homeobox) et les marqueurs des astrocytes matures (Glial fibrillary acidic protein ou GFAP, aquaporine-4 et angiotensinogène) n'étaient présents qu'après 6 mois de développement. En outre, l'utilisation de la microscopie électronique à balayage en série a permis de mettre en évidence des synapses et des épines dendritiques dans des organoïdes au stade 8 mois de développement (Figure 13), qui sont des caractéristiques structurales propres aux neurones matures.

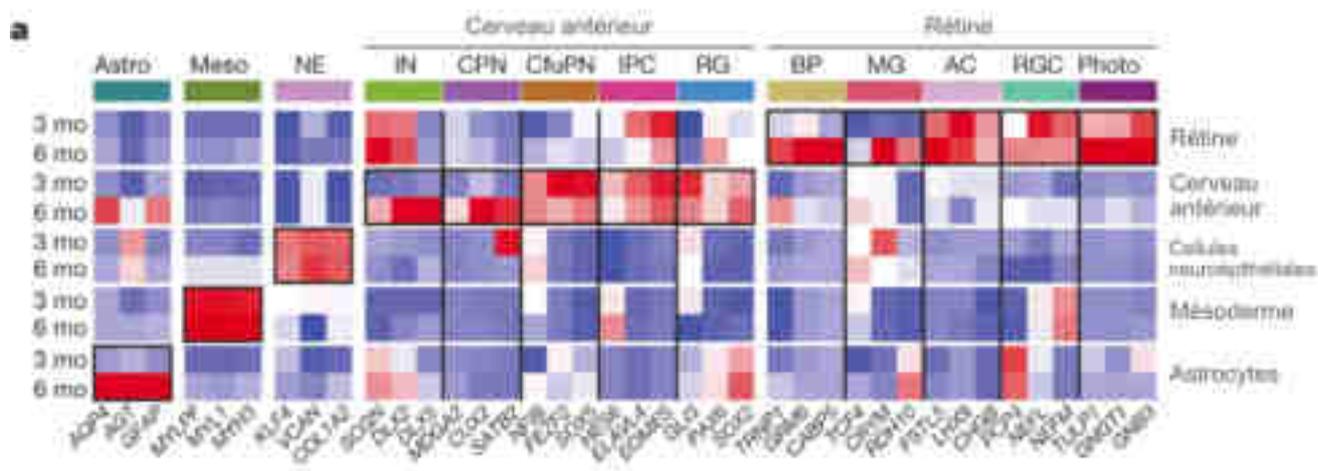


Figure 12 : Expression de marqueurs génomiques dans les organoïdes, par type de cellule et âge de l'organoïde (trois mois (mo) par rapport à six mois)⁵⁰

AC, cellules amacrines ; astro, astrocytes ; BP, cellules bipolaires ; CfuPN, neurones de projection corticofuges ; CPN, neurones de projection callosaux ; IN, interneurons ; IPC, cellules progénitrices intermédiaires ; meso, cellules

mésodermiques ; MG, glie de Müller ; NE, cellules neuroépithéliales ; photo : photorécepteurs ; RG, cellules gliales radiales ; RGC, cellules ganglionnaires de la rétine.

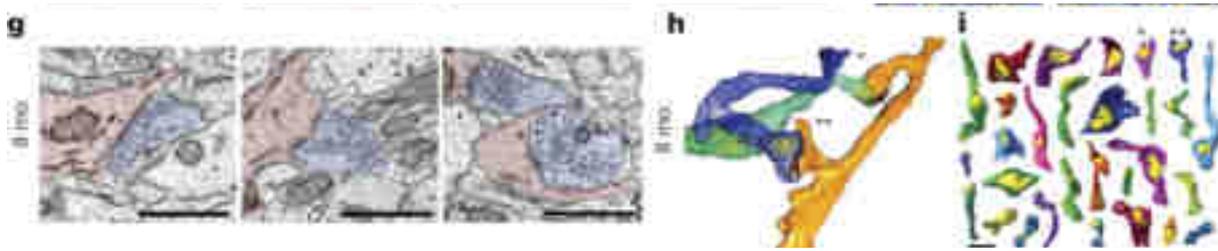


Figure 13 : Formation de synapses dans des organoïdes de 8 mois⁵⁰

g : Microscopie électronique de structures synaptiques

h : Exemple de dendrite avec deux épines (orange) faisant des synapses avec deux axones (bleu et vert). Vésicules synaptiques en jaune.

i : Sites de contact synaptique (jaune) sur 29 épines innervées identifiées.

Barres d'échelle 1 μ m

Cela suggère donc que les organoïdes neuronaux matures peuvent être utilisés pour étudier des fonctions nerveuses avancées. Ces résultats permettent de conclure à la nécessité d'une culture longue des organoïdes pour permettre un développement continu et homogène, accroître la diversité cellulaire et favoriser la maturation neuronale, afin d'obtenir un modèle de recherche fidèle.⁵⁰

ii. Degré de variabilité de la composition cellulaire

Se pose également la question du degré de variabilité de la composition cellulaire entre différentes cultures d'organoïdes. Il s'agit de vérifier si cette composition cellulaire peut être similaire à la composition cellulaire mesurée dans des SNC d'embryons humains⁵¹, et de savoir si les organoïdes neuronaux peuvent fournir des modèles avec un bon degré de reproductibilité en matière de composition cellulaire. Velasco et al. ont ainsi quantifié la composition cellulaire de différents organoïdes individuels.⁵² Ils ont généré neuf organoïdes individuels en cultivant HUES66 (lignée de cellules souches embryonnaires humaines dérivées de blastocystes humains et fortement positives pour un certain nombre de marqueurs moléculaires de cellules souches humaines pluripotentes indifférenciées, notamment Oct4, NANOG et TRA-1-60) et PGP1 (iPSC provenant de fibroblastes humains primaires de la peau d'un donneur masculin de contrôle). Ces deux lignées de cellules souches distinctes ont été mises en culture dans les mêmes types de bioréacteurs rotatifs pendant trois mois (bioréacteurs type « spinner-flask »). Les organoïdes dérivés des cellules souches HUES66 ont été développés en un seul lot, et les organoïdes issus des cellules souches PGP1 ont été divisés en deux lots indépendants dans le temps. Ils ont effectué une analyse scRNA-seq à haut débit sur un total de 78 379 cellules provenant de neuf organoïdes individuels (trois organoïdes de PGP1 du lot 1, trois organoïdes de PGP1 du lot 2 et trois organoïdes de HUES66) et ont défini 11 principaux types cellulaires distincts sur le plan transcriptionnel. L'analyse en co-cluster des signatures transcriptionnelles a révélé que la composition cellulaire de ces neuf organoïdes neuronaux était hautement reproductible entre les différentes sources de cellules souches et entre les différents lots cultivés. En outre, les résultats de l'analyse immunohistochimique ont montré que l'expression des marqueurs spécifiques des types de cellules était également très cohérente, notamment MAP2 (entrant dans la composition des ponts croisés entre microtubules, marqueur des dendrites de neurone), EMX1 (progéniteur du cerveau antérieur dorsal), Sox2 (glie radiale) et Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire).⁵² Ces données indiquent que les organoïdes de cerveau humain peuvent non seulement imiter les divers types de cellules existants au cours du développement du cerveau humain, mais présenteraient aussi un très bon degré de reproductibilité en matière de composition cellulaire.

L'étude de 2017 de Velasco et al. s'est également intéressée au degré de variabilité des organoïdes neuronaux humains dans des cultures provenant de différents bioréacteurs et soumis aux mêmes paramètres de culture.⁵⁰

Les cultures sélectionnées pour l'étude provenaient de bioréacteurs distincts, mais présentaient les mêmes structures anatomiques neuronales (prosencephale, rétine...). Il a ainsi été observé que dans l'un des bioréacteurs la plupart des organoïdes neuronaux à 6 mois de culture étaient peu différenciés et contenaient un grand nombre de cellules progénitrices. Mais les organoïdes du même âge et dérivés des mêmes iPSC, cultivés dans les trois autres bioréacteurs, présentaient des proportions beaucoup plus élevées de cellules différenciées. Dix populations transcriptionnellement distinctes ont été définies en regroupant toutes les cellules des organoïdes de 6 mois via un séquençage ARN de cellules uniques. La plupart des groupes de cellules étaient présents dans tous les organoïdes développés dans les quatre bioréacteurs différents, mais un groupe de cellules (comprenant des cellules gliales radiales, des interneurones, des progéniteurs intermédiaires, des neurones à projection callosale et des neurones corticofuges) était présent de manière significativement plus importante dans les organoïdes développés dans un des bioréacteurs en étant peu présent dans les trois autres bioréacteurs.⁵⁰ Ces résultats suggèrent que l'environnement de croissance des organoïdes joue un rôle primordial dans la variabilité de la composition cellulaire entre les différentes cultures d'organoïdes.

Mais cette analyse surestime probablement la véritable variabilité, étant donné le nombre relativement faible de cellules de chaque sous-cluster qui ont été échantillonnées dans chaque organoïde, et les différences entre les types de cellules en termes de robustesse à la dissociation et à la collecte.

Néanmoins, en attendant d'autres études, la variabilité potentielle d'un organoïde à l'autre ne permet pas leur utilisation directe pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Les résultats des tests d'efficacité des médicaments effectués sur divers organoïdes peuvent par exemple conduire à des résultats très différents.

Ainsi, bien que l'augmentation de la disponibilité des organoïdes neuronaux humains a permis d'ouvrir la voie à la modélisation d'une variété de troubles neuronaux et a fourni une multitude de possibilités pour la recherche de traitements efficaces dans la prise en charge de neuropathologie, il convient de modérer les conclusions observées. Pour s'assurer que les médicaments criblés en utilisant les organoïdes peuvent être transformés en applications cliniques efficaces, il est nécessaire d'explorer davantage l'influence de la variabilité entre organoïdes sur l'efficacité des médicaments, ainsi que les impacts que peuvent causer par exemple le stress cellulaire précoce sur la différenciation cellulaire.⁵³

iii. Présence de cellules gliales dans l'organoïde

Astrocytes

Paşca et al. ont cultivés des organoïdes neuronaux à partir d'iPSC pendant 2 mois ½ afin d'étudier la formation de cellules astrocytaires. On peut considérer que la neurogenèse a lieu dès le début de la culture chez les organoïdes, alors qu'elle n'intervient massivement qu'à la 10^{ème} semaine chez le fœtus. 2 mois ½ pourrait donc être assimilé à un fœtus de 20 semaines environ. L'immunomarquage de ces organoïdes révèle des cellules exprimant la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale, un filament intermédiaire exprimé sélectivement dans les astrocytes) et présentant les morphologies stellaires typiques des astrocytes.⁵⁴

À noter que les organoïdes après 2 mois ½ de développement semblent similaires sur le plan transcriptionnel à un cerveau embryonnaire d'environ 19 à 24 semaines de développement⁵⁴, ce qui correspond à la fin du deuxième trimestre de grossesse, et au début de la différenciation de progéniteurs neuronaux en cellules gliales.

Les cellules astrocytaires isolées à partir d'organoïdes neuronaux sont capables de récapituler de nombreuses fonctions clés des astrocytes, avec plusieurs essais *in vitro* montrant leur capacité à capter le glutamate, à induire la formation de synapses, à phagocyter les synaptosomes (terminaisons synaptiques isolées des neurones) et à moduler la signalisation calcique neuronale. Au cours de leur maturation, de l'état fœtal à l'état postnatal, les astrocytes subissent diverses modifications transcriptomiques, notamment des changements comme une complexité morphologique accrue, une capacité proliférative réduite et une capacité fonctionnelle réduite à phagocyter les synaptosomes. L'équipe de Steven A. Sloan⁵⁵ (Université de Stanford, USA) a montré que ces caractéristiques étaient reproduites *in vitro*. Pour cela il a purifié des astrocytes à partir d'organoïdes dans une série temporelle allant de 100 à 590 jours de culture et a effectué un séquençage de l'ARN unicellulaire et divers tests fonctionnels. Les astrocytes des organoïdes cultivés à court termes (à partir de 100 jours de culture) correspondent au développement des astrocytes fœtaux. Ces astrocytes type fœtaux présentent des capacités prolifératives et une aptitude à phagocyter les synaptosomes accrues. Les organoïdes cultivés plus longtemps (à partir de 400 jours de culture) présentent des astrocytes correspondant aux astrocytes matures, avec des morphologies plus complexes et une capacité accrue à augmenter la signalisation calcique dans les neurones.

Oligodendrocytes

Pour étudier l'oligodendrogenèse *in vitro*, Madhavan et al. ont exposé des organoïdes neuronaux dérivés d'iPSC à des facteurs de croissance favorisant l'émergence de la lignée oligodendrocytaire afin de favoriser la prolifération des progéniteurs et leur maturation ultérieure en oligodendrocytes myélinisants capables de former des gaines de myéline enroulées autour des axones⁵⁶ (Figure 14).

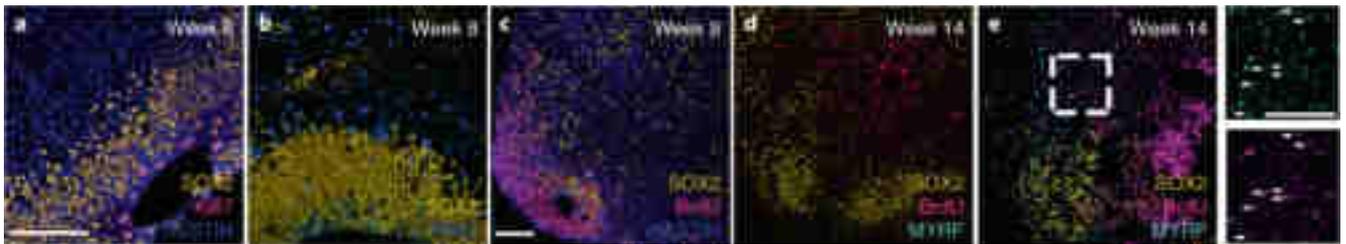


Figure 14 : Images de fluorescence d'organoïdes neuronaux à 8 semaines (a, b), 9 semaines (c) et 14 semaines (d, e) de développement⁵⁶

a : A la fin de la structuration neurocorticale initiale, les organoïdes ont généré des populations distinctes de progéniteurs neuronaux (Sox2 et NESTIN, respectivement facteurs de maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches et protéine impliquée dans la croissance cellulaire) qui se sont organisés en zones de type ventriculaire. Ces cellules étaient également les seules à se diviser activement, comme l'indique l'expression de Ki67 (Ki67 est une protéine nucléaire exprimée durant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire mais pas durant la phase de quiescence G0)

b : Une zone extérieure sous-ventriculaire positive à TBR2 (facteur de différenciation) est apparue à côté de la zone ventriculaire positive à Sox2.

c : Les cellules positives au BrdU (marqueur de l'activité mitotique) se sont localisées dans les zones ventriculaires positives au SOX2, identifiant ainsi un centre germinale primaire.

d, e : Seuls les organoïdes exposés à des facteurs de différenciation de la lignée oligodendrocytaire ont généré des oligodendrocytes (MYRF, facteur de régulation de la myéline), dont beaucoup étaient également positifs pour BrdU (indiqué par des flèches dans les vues à plus fort grossissement (2x) de la région délimitée en e (à droite)).

Barres d'échelle, 50 µm ; la barre d'échelle en a s'applique à b, et la barre d'échelle en c s'applique à d et à l'image à plus faible grossissement en e.

Microglie

La microglie est un type de cellules immunitaires innées présent dans le cerveau, qui joue également un rôle dans le réglage fin des circuits neuronaux et la régulation du nombre de cellules progénitrices neurales⁵⁷. Les microglies proviennent de lignées extraembryonnaires et mésodermiques et sont donc

généralement absentes des organoïdes neuronaux qui contiennent principalement ou exclusivement des lignées neuroectodermiques.

Mais en 2018, une équipe néerlandaise de l'UMC Utrecht Brain Center a réussi à générer de la microglie au sein d'organoïdes neuronaux humains dérivés d'iPSC⁵⁸ : si aujourd'hui la plupart des protocoles de développement d'organoïdes neuronaux utilise la double inhibition SMAD pour induire rapidement la formation de neuroectoderme, ce n'était pas le cas dans le premier protocole mis au point par Lancaster en 2014³⁴.

Les SMAD constituent une famille de protéines structurellement similaires qui sont les principaux transducteurs de signaux pour les récepteurs de la superfamille du facteur de croissance transformant bêta (TGFb), qui sont d'une importance cruciale pour la régulation du développement et de la croissance des cellules. Ainsi, la double inhibition SMAD consiste à bloquer deux voies de signalisation qui utilisent les SMAD pour la transduction du signal: BMP et TGFb. Il a été démontré qu'en inhibant conjointement les voies de signalisation pour BMP et TGFb, les antagonistes pouvaient agir de manière synergique et induire une très forte différenciation des cellules souches en cellules neurales⁵⁹. L'abréviation « SMAD » fait référence aux homologies avec les gènes SMA (phénotype du "petit" ver) de *Caenorhabditis elegans* et la famille MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") chez la drosophile. Pour leur recherche, l'équipe néerlandaise de l'UMC Utrecht Brain s'est donc basée sur les travaux de Lancaster qui avait observé que les cellules non neuronales étaient expulsées vers l'extérieur de l'organoïde au cours du développement, ainsi que sur l'analyse faite par l'équipe de Quadrato qui avait signalé la présence de progéniteurs dérivés du mésoderme dans ce modèle⁵⁰. L'hypothèse était que l'absence de la double d'inhibition de SMAD dans la génération d'organoïdes neuronaux pourrait expliquer la présence des progéniteurs dérivés du mésoderme, et que ces progéniteurs mésodermiques étaient capables de se différencier en microglies matures sur instruction du microenvironnement produit par les cellules neuroectodermiques. Une légère modification du protocole initial de Lancaster (réduction du niveaux d'héparine, réduction de stimulant du neuroectoderme, et retardement de l'incorporation des organoïdes dans le Matrigel) a permis d'obtenir des cellules présentant un phénotype moléculaire, une morphologie et une fonction microgliales typiques dans les organoïdes neuronaux humains.

Ce nouveau modèle d'organoïde dans lequel la microglie, la glie (astrocytes et oligodendrocytes principalement) et les neurones sont présents est important pour l'étude du développement de la microglie, mais également pour l'étude des interactions entre les neurones et la glie dans le développement du cerveau, et l'apparition de pathologies neuronales.

Dans une autre étude, menée par une équipe de l'Université de Californie en 2017, il a été révélé que des cellules de type microglie différenciées à partir d'iPSC pouvaient pénétrer et s'intégrer dans des organoïdes neuronaux simplement en les ajoutant au milieu de culture⁶⁰. De plus, en cas de blessure de l'organoïde, ces cellules de type microglie changeaient de morphologie pour ressembler à la microglie activée que l'on retrouve dans les cerveaux malades ou blessés.

C. Organisation

i. Auto-organisation des organoïdes neuronaux

Pour la mise au point du premier organoïde neuronal par l'équipe de Lancaster, la culture cellulaire a été réalisée dans un milieu relativement simple, sans ajout de molécules de signalisation particulière. Le milieu de culture était uniquement étudié pour permettre une différenciation ectodermique (mise en culture avec FGF-2, facteur de prolifération des fibroblastes de type 2 connu pour son rôle crucial dans le développement du tissu neuronal⁶¹). Il a été observé qu'en l'absence de facteurs externes, la culture s'auto-modèle et s'auto-organise par défaut en un amas de régions neuronales diverses, plus ou moins distinctes les unes des autres (Figure 15). La culture résultante répond alors bien à la définition d'un organoïde en raison de la présence de régions neuronales spécifiques et diverses.

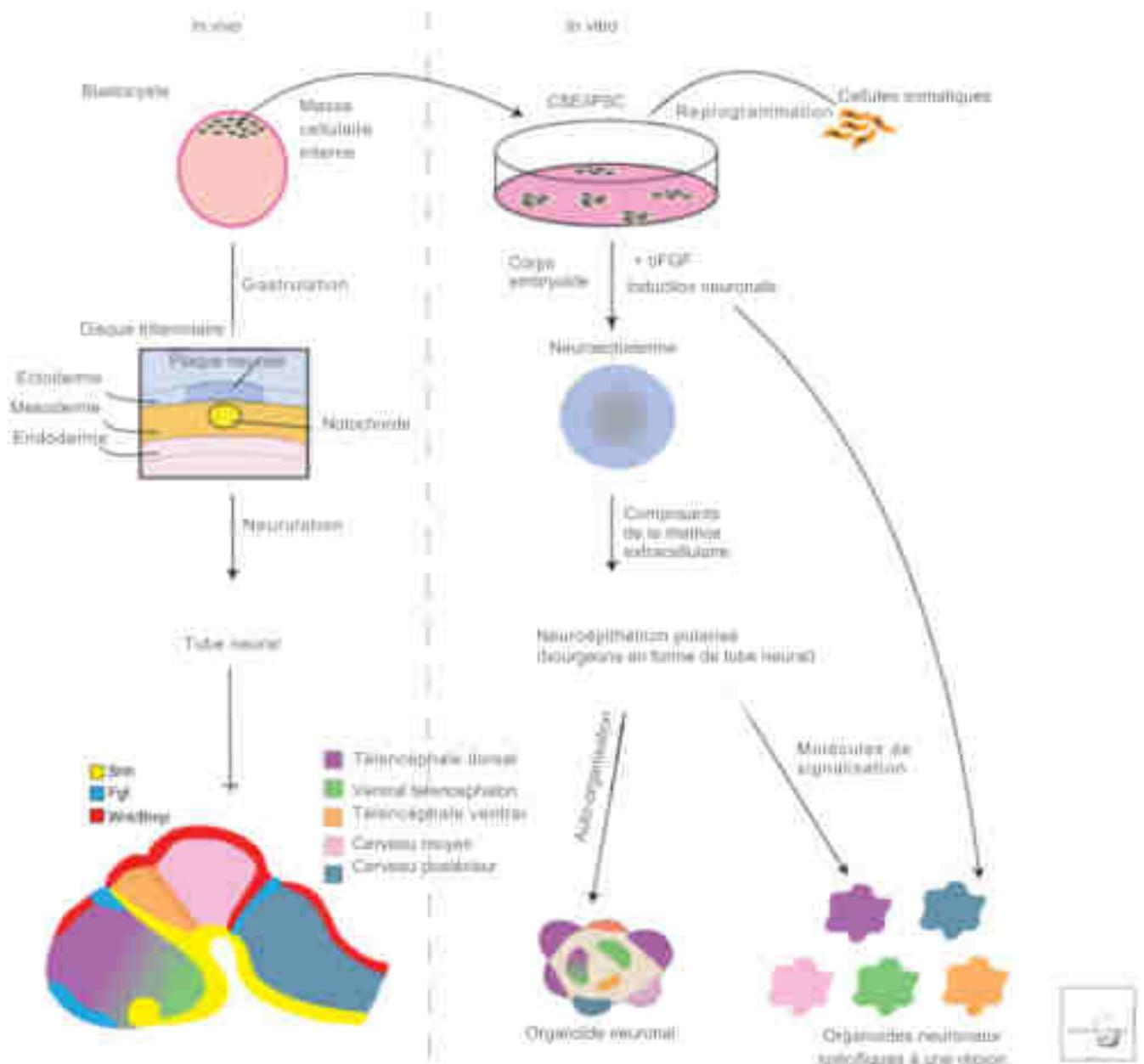


Figure 15 : Schéma comparatif du développement du cerveau in vivo ou in vitro⁶²

In vivo, le cerveau se développe à partir de la plaque neurale qui se replie sur elle-même pour former un tube neural. Il est ensuite structuré en différentes identités régionales par de multiples gradients morphogènes (FGF, BMP/Wnt, Shh...) suivant un axe cranio-caudal.

In vitro, dans la culture d'organoïde, des agrégats de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites sont guidés vers un développement neuroectodermique. On retrouve alors des étapes similaires à la gastrulation et à la neurulation chez l'embryon. Les organoïdes neuronaux s'organisent et se structurent eux-mêmes en différentes identités régionales cérébrales de manière hétérogène. Des molécules de signalisation peuvent également être ajoutées pour contrôler la différenciation des organoïdes en identités régionales spécifiques.

Lors du développement des premiers organoïdes par les équipes de Lancaster, il a été observé que les régions neuronales n'étaient pas totalement dispersées au hasard, sans lien les unes avec les autres. Ainsi, certaines régions voisines étaient séparées par des limites claires imitant les frontières observées in vivo dans notre cerveau.

On a aussi retrouvé dans ces organoïdes les zones sécrétant les gradients morphogènes nécessaires à la structuration du cerveau *in vivo* lors des étapes de neurulation et de maturation neuronale. Ainsi, des zones ventriculaires ont été observés près des plexus choroïdes⁶³ montrant des frontières franches entre les identités dorsales (TBR2+, progéniteurs intermédiaires dans la zone sous-ventriculaire) et ventrales (GSX2+, marqueur d'identité ventral) du cerveau antérieur. Des tissus positifs pour Wnt2b et BMP6 (sécrétés par l'hémisphère *in vivo*) ont été observés près du plexus choroïde (morphologie cuboïde TTR+, transthyretin, fortement synthétisé dans le plexus choroïde), accolé à du tissu télencéphalique dorsal (TBR2+) (Figure 16).

Toutes ces observations ont également permis de démontrer un niveau supérieur d'auto-organisation *in vitro* ; non seulement les organoïdes cérébraux pouvaient se développer en architectures cérébrales complexes, mais sans aucun repère ni axe corporel de référence (l'organoïde n'étant pas intégré dans un embryon en développement, comme c'est le cas pour un cerveau *in vivo*) le tissu neuroépithélial est capable de mettre en place spontanément des centres de signalisation et de développer une structure tissulaire régionalisée, avec de plus un développement dans le temps qui reproduit ce qui est observé *in vivo*.

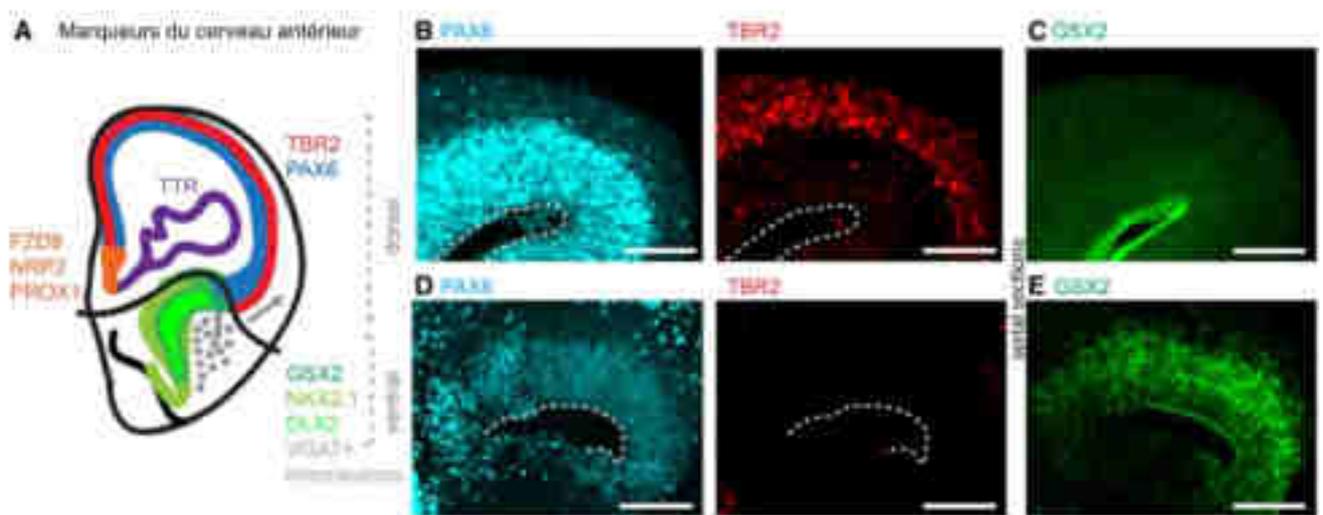


Figure 16 : Quelques coupes montrant l'organisation d'organoïdes neuronaux (cultivés en l'absence de facteurs de différenciations) en différentes régions spécifiques du cerveau antérieur (ou prosencéphale)⁶³

A - Résumé des marqueurs utilisés pour la caractérisation régionale du cerveau antérieur.

B, C. - Les régions dorsales du cerveau antérieur se colorent (B) positivement pour PAX6 (cyan, progéniteurs de la glie radiale dans la zone ventriculaire) et TBR2 (rouge, progéniteurs intermédiaires dans la zone sous-ventriculaire) et (C) négativement pour GSX2 (vert, marqueur d'identité ventral).

D, E. - Les régions des éminences ganglionnaires latérales et centrales peuvent être (D) PAX6 positives (cyan) et TBR2 négatives (rouge), (E) mais sont positives pour GSX2 (vert).

Barre d'échelle : 100 μm.

Les lignes pointillées indiquent la surface apicale/ventriculaire.

ii. Développement contrôlé des organoïdes neuronaux et étude de l'impact de facteurs de différenciation

Afin de se défaire des capacités de développement incontrôlables et imprévisibles du développement spontané des organoïdes, et pour une utilisation dans la compréhension des mécanismes de neurodéveloppement, il peut être souhaitable de générer de manière reproductible et efficace des organoïdes constitués de régions neuronales spécifiques.

Pour surmonter l'hétérogénéité régionale et restreindre l'identité à une seule région du cerveau, la majorité des protocoles décrits à ce jour modifient la composition du milieu pour guider le développement des organoïdes vers un destin spécifique. Des facteurs de différenciation, dont beaucoup avaient déjà été utilisés avec succès dans des protocoles de différenciation en 2D, sont ainsi utilisés pour promouvoir des voies de différenciations neuronales spécifiques et générer des organoïdes d'identités et de composition diverses, simulant les lobes pariétal, frontal temporal ou occipital.

Voici une liste non exhaustive des techniques mises au point ces dernières années :

- L'équipe de Junghyn Jo, de l'Institut des sciences et technologies d'Okinawa (Japon), a rapporté une méthode de production d'organoïdes de mésencéphale humain en cultivant des cellules souches embryonnaires pluripotentes humaines dans un milieu additionné de Shh et de FGF8 (deux facteurs reconnus comme favorisant la différenciation des cellules souches en cellules mésencéphaliques)⁶⁴. Environ 80 % des cellules de ces organoïdes de mésencéphale humain âgés de 35 jours se sont révélées OTX2+ (marqueur du mésencéphale) et 35 % des cellules du neuroépithélium étaient doublement positives pour l'OTX2 et l'EdU (marqueur de prolifération cellulaire : le 5-éthynyl-2'-deoxyuridine est un nucléoside analogue à la thymidine, il est incorporé à l'ADN durant la synthèse d'ADN), démontrant ainsi la présence de progéniteurs du mésencéphale dans ces organoïdes. Le marqueur FOXA2 des neuroprogéniteurs dopaminergiques du mésencéphale a été détecté dans les organoïdes de mésencéphale humain âgés de 4 jours. L'expression de FOXA2 était limitée à des régions spécifiques du neuroépithélium au 14ème jour de culture, et les cellules qui exprimaient FOXA2 ont commencé à migrer vers la zone du manteau, où la tyrosine hydroxylase était exprimée (enzyme limitant le taux de synthèse de la dopamine, utilisée comme marqueur des neurones dopaminergiques matures du mésencéphale). Ces observations ont également permis de montrer que les organoïdes de mésencéphale humain reproduisent la différenciation des neurones dopaminergiques du mésencéphale dans le temps, de façon similaire au processus de développement précoce des mésencéphales humains.
- La double inhibition de SMAD est fréquemment utilisée pour différencier les cellules en neuroectoderme (origine iPSC) en les traitant avec diverses combinaisons d'inhibiteurs de la voie SMAD en aval des signaux BMP et Nodal⁶⁵.
- L'utilisation d'inhibiteurs de la voie SMAD sur des corps embryoïdes (origine iPSC) en croissance entraîne une production d'organoïdes composés principalement de cerveau antérieur dorsal.⁶⁶
- Pour promouvoir le développement en cerveau antérieur ventral sur des organoïdes issus d'iPSC, une double inhibition initiale de SMAD peut être suivie d'une exposition à des agonistes de Shh⁶⁷, mécanisme qui imite le gradient observé in vivo. Shh est une protéine impliquée dans la voie de signalisation dite *Hedgehog*, qui joue un rôle clé dans l'organogénèse, par exemple pour la croissance des doigts ou l'organisation du cerveau. Après exposition à des agonistes de Shh, le notochorde produit du Shh qui va agir progressivement du tube neural ventral au tube neural dorsal.
- In vivo, le neuroépithélium du télencéphale dorsomédial se développe en hippocampe et en plexus choroïde sous l'effet des signaux inducteurs de BMP et de Wnt. En suivant le protocole original de génération de tissu cortical SFEBq (*serum-free floating culture of embryoïd body-like aggregates with quick aggregation*, culture flottante sans sérum d'agrégats de type corps embryoïdes avec agrégation rapide, et donc en 3D), suivi d'une exposition transitoire à Wnt et BMP, on obtient des organoïdes d'hippocampe, tandis qu'une exposition prolongée entraîne une différenciation en plexus choroïde.⁶⁸ (origine des cellules utilisées : cellules embryonnaires humaines)
- Pour produire du tissu thalamique, des cellules souches embryonnaires humaines ont d'abord subi une double inhibition SMAD. Dans un cerveau en développement, le thalamus est généré

à partir de la région caudale du cerveau antérieur, c'est-à-dire le diencéphale, c'est pourquoi les cellules ont également été supplémentées avec de l'insuline humaine pendant la période de double inhibition SMAD pour encourager la caudalisation. Après l'induction neuronale, un inhibiteur MEK-ERK (voie impliquée dans la transcription cellulaire) a été utilisé pour empêcher une caudalisation excessive.⁶⁹

- Outre le mésencéphale, l'activation simultanée des voies Wnt (par ajout de Wnt3A) et Hedgehog (par ajout de Shh et de pumorphamine) a contribué à la différenciation des cellules souches pluripotentes induites vers la lignée hypothalamique, générant ainsi des organoïdes hypothalamiques⁶⁶. Wnt3A est une protéine de signalisation cellulaire jouant divers rôles dans le développement embryonnaire, comme l'établissement et l'expression des axes embryonnaires, le développement du colon et de la crête neurale, et le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques.

Les marqueurs qui sont exprimés au cours du développement précoce de l'hypothalamus humain, tels que RAX1, SOX2 et NESTIN, étaient positifs dans la plupart des cellules des organoïdes hypothalamiques âgés de 8 jours.

- Pour générer des organoïdes de mésencéphale, Qian et al. se sont basés sur les protocoles 2D de génération de neurones dopaminergiques de mésencéphale. En combinant une double inhibition SMAD, un ajout de Shh, de FGF8 (facteur de prolifération des fibroblastes de type 8) ainsi qu'un activateur de Wnt, ils ont pu obtenir des cellules neuroépithéliales exprimant FOXA2, marqueur précurseur de la plaque de plancher (qui est le centre organisateur ventralisant du tube neural) et qui, à des stades ultérieurs, ont produit des neurones dopaminergiques TH+.⁶⁶
- Des organoïdes de cervelet ont également été générés par l'équipe de Keiko Muguruma de l'Institut RIKEN au Japon à partir de cellules souches embryonnaires humaines⁷⁰. En plus de l'inhibition de SMAD, le traitement avec du FGF2 (facteur de prolifération des fibroblastes de type 2) et de l'insuline caudalisant (facteur de prolifération et différenciation) a suffi à induire la différenciation en neuroépithélium de cervelet. Un traitement ultérieur avec le FGF19 (facteur de prolifération des fibroblastes de type 19, observé dans le cerveau fœtal mais absent au stade adulte)⁷¹, exprimé à la limite entre le mésencéphale et le cerveau postérieur et impliqué dans le développement des progéniteurs dorsaux du cerveau postérieur, a entraîné la transformation des rosettes des plaques cérébelleuses en grandes structures ovales, structurées de façon dorsoventrale, d'une manière qui rappelle la structure tubulaire polarisée du cervelet humain en développement précoce. Les marqueurs spécifiques de la région dorsale ont été observés sur le côté du neuroépithélium ovale tourné vers l'extérieur de l'ensemble de l'agrégat, et donc exposé à des niveaux plus élevés de FGF19, tandis que les marqueurs ventraux étaient exprimés sur le côté intérieur tourné vers le centre de l'organoïde.⁷⁰

iii. Combinaison d'organoïdes neuronaux spécifiques de certaines régions du cerveau

Des chercheurs ont ensuite essayé de combiner ces organoïdes régionaux neuronaux indépendants pour explorer le mécanisme et les processus complexes du développement cérébral général et les troubles neurologiques associés.

En 2017 Bagley et al. de l'Université de Californie ont ainsi cultivé ensemble des corps embryoides (EBs) présentant des caractéristiques ventraux et dorsaux dans une seule gouttelette de Matrigel à partir d'iPSC, générant un pseudo axe dorso-ventral dans un organoïde fusionné présentant des caractéristiques de cerveau antérieur ventral et dorsal⁷².

Toujours en 2017, Xiang et al. de la ShanghaiTech University ont co-cultivé des organoïdes d'éminence ganglionnaire médiale (EGM) (structure transitoire dans le développement du système nerveux qui guide la migration des cellules et des axones, visible aux stades embryonnaires et fœtaux) et de cortex cérébral (substance grise périphérique des hémisphères cérébraux), générant ainsi des organoïdes EGM-corticaux fusionnés (hfMCOs)⁶⁷. Les cellules souches utilisées étaient d'origine embryonnaire et induite. Le séquençage de l'ARN sur cellules uniques et l'ATAC-seq (Figure 17) ont révélé la grande capacité de ces hfMCOs à récapituler l'organisation et les transcriptomes du cerveau fœtal. (Le transcriptome représente l'ensemble des ARN présents dans une cellule à un instant donné.)

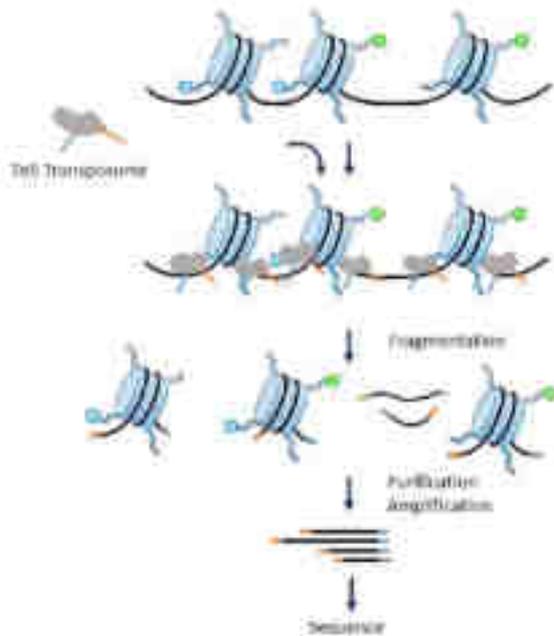


Figure 17 : Principe de la méthode ATAC-seq⁷³

ATAC-seq est l'acronyme de Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing, il s'agit d'une technique de caractérisation des régions accessibles de la chromatine et du positionnement nucléosomal autour de celles-ci. Le principe de l'ATAC-seq repose sur le mode d'action de la transposase Tn5 sur l'ADN génomique de l'échantillon. Les transposases sont des enzymes catalysant le mouvement de transposons (éléments génétiques transposables) vers d'autres parties du génome.

Le processus de migration des interneurons humains entre les neurones MGE et corticaux peut être reproduit dans ces organoïdes fusionnés, ce qui a permis de mieux comprendre la dynamique moléculaire du développement du cerveau humain⁶⁷.

Deux ans plus tard, en 2019, cette même équipe a modélisé les projections d'axones entre le thalamus et le cortex humains dans des organoïdes thalamiques et corticaux fusionnés à partir de cellules souches embryonnaires⁶⁹.

Le développement d'organoïdes de régions neuronales précises, via l'utilisation de facteurs de structuration spécifiques^{70,47}, a permis de mettre au point des outils semblables à des « blocs de lego » (Figure 18) qu'il suffirait d'assembler pour construire des organoïdes fusionnés et récapituler ainsi l'interaction structurelle et fonctionnelle entre des zones spécifiques du cerveau humain. Cette découverte a constitué un grand avancé pour l'étude du développement du cerveau humain, ainsi que pour l'exploration des voies de la fonction neuronale et celle des troubles neurologiques centraux. Les organoïdes fabriqués par technique de fusion pouvant par exemple aider à déconstruire les mécanismes de l'organogenèse en reconstruisant le cerveau pièce par pièce.



Figure 18 : Publicité de la compagnie LEGO®
« Tout le monde a un côté créatif. Construis le tien »

D. Fonctionnalité

La capacité de la culture cellulaire en 3D à mimer la fonctionnalité de l'organe cible est la dernière condition nécessaire pour conclure à un organoïde. Plusieurs études se sont donc orientées sur un examen des propriétés physiologiques des neurones générés dans des protocoles organoïdes et l'étude de leur maturation fonctionnelle au fil du temps.

i. Activité neuronale et maturation des cellules nerveuses

Il a été observé qu'après quelques temps de culture en bioréacteur rotatif, les neurones générés dans des protocoles d'organoïdes neuronaux commencent à mûrir sur le plan fonctionnel et présentent des décharges spontanées, mis en évidence par des poussées de Ca^{2+} ^{34,47} et des enregistrements électrophysiologiques⁶⁶. La fréquence des décharges observées est sensible à l'application de glutamate et d'antagonistes des récepteurs du glutamate, ce qui indique la présence de neurones glutamatergiques³⁴.

La libération et les niveaux intrinsèques de glutamate au sein des organoïdes neuronaux ont également été mesurés à l'aide de microélectrodes modifiées par des enzymes⁷⁴.

Le GABA est connu comme le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau ; cependant, au cours du développement, il exerce un effet dépolarisant sur les neurones immatures⁷⁵. Une caractéristique clé de la maturation neuronale est le passage d'une réponse dépolarisante à une réponse hyperpolarisante au GABA, médiée in vivo par une diminution des concentrations intracellulaires de Cl au fur et à mesure de la maturation des neurones, en raison de la régulation négative et de la régulation positive des protéines de transport membranaire NKCC1 et KCC2, respectivement. L'équipe de Xuyu

Qian du Boston Children's Hospital a constaté que les organoïdes semblent également reproduire cette maturation neuronale en montrant une expression accrue de KCC2 et une réduction des neurones sensibles à la dépolarisation induite par le GABA lors de la maturation d'organoïdes issus d'iPSC⁶⁶.

ii. Formation de circuits neuronaux

Toujours dans l'étude de Qian et al., le marquage unique de neurones développés au sein d'organoïdes a permis de démontrer la capacité de ces neurones à générer des morphologies complexes et à former des synapses entre eux, avec l'observation d'épines dendritiques à proximité des terminaux présynaptiques⁶⁶.

Dans une autre étude menée par Quadrato et al., l'utilisation de la microscopie électronique sur une série d'organoïdes plus développés issus d'iPSC⁵⁰ a également permis de montrer la capacité des neurones à former des synapses, révélant une densité de synapses dans la gamme des densités observées dans les cerveaux fœtaux humains⁷⁶. Des dendrites uniques formant des synapses avec des axones multiples ont aussi été observés, ce qui suggère la formation de réseaux complexes.

En plus de confirmer l'activité de décharge spontanée de neurones individuels⁵⁰, Quadrato et al. ont mesuré l'activité de décharges de groupe de cellules et ont découvert que certains organoïdes présentaient des salves claires d'activité coordonnée, ce qui indique que les organoïdes sont capables de générer des réseaux neuronaux qui forment des schémas de décharges auto-organisés.

En outre, ils ont constaté dans cette même étude que les organoïdes cultivés à long terme (8 mois ou plus) génèrent une population de cellules photosensibles qui pouvaient répondre à une stimulation sensorielle non invasive basée sur la lumière. Bien qu'il n'est pas pu être déterminé si la lumière modifiait directement l'activité des cellules photosensibles ou modulait les réseaux neuronaux en aval, la capacité des organoïdes à répondre à une entrée sensorielle physiologique suggère que ces organoïdes pourraient être utilisés à l'avenir pour étudier l'impact des stimuli sensoriels sur la formation et l'activité des réseaux neuronaux.

iii. Interdépendances des différentes régions constituant l'organoïde

En réponse à la problématique de vascularisation des organoïdes (voir plus bas), Giandomenico et al. ont généré en 2019 des organoïdes cultivés à l'interface air-liquide (ALI-CO, pour *air-liquid interface cerebral organoids*)⁷⁷ à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Ils ont pu montrer une grande amélioration de la survie et de la maturation des neurones qui étaient capables de former des faisceaux longs et denses d'axones avec des orientations spécifiques, rappelant les voies nerveuses. In vivo, nous savons que les neurones de la couche profonde du cortex projettent des axones sous-corticaux vers d'autres régions du cerveau, tandis que les neurones de la couche supérieure projettent de manière intracorticale et forment des voies callosales.

Deux morphologies principales de trajets d'axones rappelant les projections callosales et sous-corticales ont été observées dans les ALI-CO : ceux qui se projettent vers l'intérieur de l'organoïde et ceux qui se projettent vers l'extérieur et loin de l'organoïde, formés par des neurones ayant une identité principalement de couche supérieure (CUX2+) et de couche profonde (CTIP2+), respectivement.

(Cut-Like Homeobox 2 (Cux2) est un facteur de transcription impliqué dans le développement des dendrites et des épines, et dans la formation des synapses des neurones de projection placés dans les couches néocorticales supérieures de la souris.)

(CTIP2 est un régulateur essentiel de la différenciation des neurones striataux à épines moyennes et de l'établissement de l'architecture cellulaire du striatum.)

Dans ces organoïdes ALI-CO, les trajets de type intracorticaux effectuaient souvent des virages serrés et révélèrent une architecture compliquée tout au long de leur parcours : la coloration des signaux de guidage développementaux connus, tels que Wnt5a, ont permis de révéler leur présence autour des trajets d'axones, démontrant la capacité des organoïdes à auto-organiser les voies axonales.

La mesure de l'activité neuronale au sein des ALI-CO a quant à elle permis de révéler une activité de « tir corrélé » entre des régions situées à différentes distances, ce qui prouve que des connexions fonctionnelles de type intracorticales produisent une connectivité à courte, moyenne et longue distance au sein de l'organoïde.

Pour tester l'activité électrique de sortie des trajets de type sous-corticaux, des ALI-CO ont été mis en co-culture avec de la moelle épinière de souris embryonnaire disséquée, encore attachée aux nerfs périphériques et aux muscles paraspinaux. Les trajets d'axones fuyants étaient capables d'innervier la moelle épinière et de déclencher des contractions coordonnées des muscles. De plus, les contractions musculaires pouvaient être contrôlées par la stimulation extracellulaire des voies axonales et la latence de la réponse entre la stimulation et la contraction était similaire aux latences enregistrées dans les voies motrices descendantes humaines en développement.

Les expériences réalisées par Quadrato et al. et Giandomenico et al. montrent une entrée sensorielle fonctionnelle et une sortie motrice des organoïdes, ce qui vérifie la possibilité d'utiliser des organoïdes pour étudier la connectivité neuronale, potentiellement entre différents organoïdes spécifiques à différentes régions du cerveau et assemblés ensemble, comme vu plus haut.

E. Limites, techniques et perspectives d'amélioration pour la culture des organoïdes neuronaux humains

i. Amélioration des bioréacteurs utilisés pour la mise en culture d'organoïdes neuronaux

Concernant les techniques de production d'organoïdes neuronaux développées, le problème des caractéristiques des bioréacteurs utilisés s'est rapidement posé. En effet, le coût et le volume de l'espace d'incubation requis pour le premier bioréacteur rotatif développé par l'équipe de Lancaster (Figure 19) pouvait limiter fortement son utilisation à grande échelle, et ralentir ainsi les recherches. En cherchant à développer un organoïde de cerveau antérieur pour étudier l'impact du virus Zika sur le cerveau, l'équipe de Xuyu Qian du Boston Children's Hospital a mis au point un bioréacteur à rotation miniaturisé nommé Spin Ω^{66} (Figure 20), qui correspond en volume à la norme d'une plaque de culture tissulaire à 12 puits, ce qui a permis de réduire considérablement la consommation de solution de culture. Cette innovation permet d'envisager des cultures d'organoïdes plus efficaces, nécessitant moins de matériel tout en augmentant les rendements (les plaques étant empilables dans l'incubateur).



Figure 19 : Le bioréacteur rotatif type « spinner-flask » utilisé par l'équipe de Lancaster pour le développement des premiers organoïdes neuronaux humains, photographié dans l'incubateur.

Les organoïdes sont visibles dans le bioréacteur sous forme de petites taches blanches flottantes⁴⁸.



Figure 20 : Dessin assisté par ordinateur du bioréacteur Spin Ω en version 12 puits et des pièces individuelles de la conception⁶⁶

ii. Vascularisation des organoïdes neuronaux

Un autre défaut ayant ralenti le développement de l'utilisation des organoïdes pour la recherche concerne l'absence de vascularisation de ces modèles, un problème qui limite l'apport d'oxygène et de nutriments suffisants pour maintenir en vie les cellules présentes au cœur de l'organoïde, et conduit à une accumulation de déchets toxiques au sein des cellules⁷⁸. La croissance est alors rapidement stoppée par la nécrose progressive apparaissant au centre de l'organoïde non-oxygéné.

La vascularisation neuronale joue également un rôle dans la quiescence, la prolifération, la différenciation et la maturation cellulaire⁷⁹, ainsi que dans la gestion du stress cellulaire⁵³. La vascularisation des organoïdes neuronaux pourrait donc permettre d'aboutir à des modèles plus robustes, en reproduisant plus fidèlement la physiologie de l'organe.

Vascularisation par implantation dans un cerveau animal

Une équipe de l'Université de San Diego en Californie, dirigée par Abed AlFatah Mansour, a étudié une vascularisation *in vivo* en transplantant des organoïdes neuronaux humains issus de cellules souches embryonnaires humaines dans le cortex d'un cerveau de souris adulte immunodéficiente. 14 jours après la transplantation, le système vasculaire de la souris avait infiltré efficacement et en profondeur les organoïdes⁸⁰. Les organoïdes neuronaux vascularisés présentaient alors une meilleure survie (les organoïdes ont survécu 233 jours dans le cerveau murin), une maturation neuronale plus importante, et une meilleure croissance.

Hors problématique de vascularisation, les résultats observés suggèrent également la mise en place de connexions synaptiques entre l'hôte et le greffon. Ces observations nécessitent néanmoins d'avantages d'études, et ouvrent la voie à la possible utilisation d'organoïdes comme outils de greffe post-accident vasculaire-cérébral en remplacement de groupes de neurones détruits.

Vascularisation via la matrice extracellulaire

La vascularisation d'organoïdes neuronaux *in vitro* est également possible *via* une revascularisation à partir de la matrice environnante extérieure. Une équipe californienne dirigée par Missy T Pham a modélisé en 2018 le développement péri-neural vasculaire en recouvrant l'organoïde neuronal entier de cellules endothéliales incorporées dans du Matrigel⁸¹. Ils ont donc obtenu une revascularisation de l'organoïde en 3 - 5 semaines, à partir de la matrice environnante, donc de l'extérieur vers le centre de l'organoïde. Pour ce faire des iPSC ont été cultivées pour donner des organoïdes neuronaux entier ; simultanément, des iPSC provenant du même organisme ont été différenciées en cellules endothéliales. L'organoïde a ensuite été remis en incubation dans du Matrigel dans lequel étaient incorporées 250 000 cellules endothéliales. L'enrobage des organoïdes neuronaux avec les cellules endothéliales (provenant donc du même donneur) a conduit à une forte vascularisation de ces organoïdes. Les organoïdes vascularisés résultant ont été cultivés *in vitro* puis transplantés dans des souris immunodéficientes, pour constater *in vivo* que les vaisseaux sanguins ne restaient pas à la

périphérie de l'organoïde mais pénétraient bien en son centre⁸¹. La connectivité des vaisseaux humains et murins n'a pas été étudiée au cours de cette étude.

Vascularisation par co-culture d'organoïde neuronal et d'organoïde vasculaire

Ahn et al. ont développé en 2021 des organoïdes neuronaux humains vascularisés à partir d'iPSC en co-cultivant des organoïdes neuronaux et des organoïdes vasculaires⁸². En effet, dans la vascularisation *via* des cellules endothéliales seules, l'absence de tubulogenèse (qui conduit à la formation d'un réseau vasculaire avec apparition de lumen, espace creux circonscrit entre les parois des vaisseaux et dans lequel s'écoule le sang) empêche toute possibilité de perfusion. Les organoïdes neuronaux obtenus ont survécu plus de 50 jours, et contenaient des cellules endothéliales et des péricytes (cellules « murales » localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires) entourées de cellules positives à l'ACTA2 (marqueur spécifique des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins) et de membrane basale collagénique.

De manière similaire, Shi et al. ont étudié la possibilité de vasculariser les organoïdes en les intégrant à des corps embryoides⁸³. Ils ont co-cultivé des cellules souches pluripotentes (origine iPSC et embryonnaire) avec des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines, et ont poussé ensuite la différenciation neuronale. Les organoïdes ainsi générés présentaient bien les caractéristiques neuronales attendues, avec une formation de réseaux vasculaires dès le 42^{ème} jour et un taux de survie supérieur à 200 jours.

Vascularisation par ajout de VEGF et Wnt7a

Une autre stratégie de vascularisation des organoïdes cérébraux consiste à induire la formation de structures semblables à des vaisseaux sanguins par ajout de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et Wnt7a (facteur de différenciation) *in vitro*. En 2020, une équipe coréenne dirigée par Onju Ham a appliqué cette stratégie pour la formation *in vitro* de structures semblables à des vaisseaux sanguins dans des organoïdes neuronaux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines.

Les résultats indiquent que le VEGF a renforcé la différenciation des cellules endothéliales vasculaires sans réduire les marqueurs neuronaux dans les corps embryoides, qui se sont ensuite développés avec succès en organoïdes neuronaux avec des structures vasculaires en « cercle ouvert » exprimant les caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

L'ajout de VEGF a favorisé la différenciation des cellules endothéliales vasculaires sans réduire les marqueurs neuronaux dans les corps embryoides (EB), qui se sont ensuite développés avec succès en organoïdes neuronaux avec des structures vasculaires en cercle ouvert exprimant un marqueur de cellules endothéliales, le CD31 (protéine transmembranaire de type cluster de différenciation, exprimée dans les jonctions intercellulaires et jouant un rôle dans la régulation de l'inflammation), ainsi qu'un marqueur de jonction serrée, la claudine-5 (élément constitutif des jonctions serrées spécifique aux cellules endothéliales), deux marqueurs caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique.

Le développement des organoïdes avec traitement par le VEGF peut donc bien être utilisé pour générer des structures vasculaires présentant les caractéristiques d'une BHE mature dans des organoïdes neuronaux.

Vascularisation par surexpression d'ETV2

Citons encore une autre technique de vascularisation *in vitro* mise au point en 2019 par l'équipe de Bilal Cakir de la Yale School of Medicine. En se basant sur la nature du variant 2 de l'ETS (*Erythroblast Transformation Specific*) (ETV2, ETS Translocation Variant 2), un facteur de transcription qui joue également un rôle dans le développement des cellules endothéliales vasculaires, cette équipe est parvenue à générer un réseau vasculaire complexe dans des organoïdes neuronaux humains⁸⁴.

En effet, il avait été signalé en 2017 que l'expression d'ETV2 peut reprogrammer directement des fibroblastes postnataux humaines en cellules endothéliales fonctionnelles et matures⁸⁵.

Cakir et son équipe ont utilisé cette propriété pour transformer des cellules souches embryonnaires humaines en cellules endothéliales par surexpression d'ETV2 et produire ainsi un organoïde neuronal humain vascularisé⁸⁴. Pour cela, ils ont généré un organoïde comprenant 20% de cellules souches embryonnaires humaines transfectées avec un vecteur lentiviral exprimant ETV2 et 80% de cellules souches embryonnaires humaines non traitées. Au 18^{ème} jour de culture l'expression d'ETV2 a été induite dans les cellules, et celles exprimant l'ETV2 se sont différenciées dans l'organoïde de cortex en cellules endothéliales qui ont permis la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel.

Les réseaux vasculaires fonctionnels ainsi développés sont donc très bénéfiques pour la croissance des organoïdes, ils accélèrent la maturation des neurones corticaux et favorisent l'émergence de plusieurs caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique, notamment une augmentation de l'expression des jonctions serrées et de la résistance trans-endothéliale électrique⁸⁴.

Les organoïdes neuronaux humains vascularisés reflètent donc bien plus fidèlement que les non vascularisés la physiologie du cerveau humain et constituent un modèle robuste pour étudier les fonctions cérébrales *in vitro* de manière poussée. À l'avenir, la durée du développement et la maturité maximale des organoïdes neuronaux vascularisés seront des caractéristiques très intéressantes à étudier, en cherchant toujours à repousser les limites rencontrées afin d'obtenir les outils de recherche les plus aboutis possibles.

VI. Les organoïdes neuronaux humains dans la recherche en neurodéveloppement

Lorsque l'équipe de Lancaster a développé le premier organoïde neuronal humain en 2013³⁴, l'objectif de l'équipe était de répondre à un besoin d'outil plus complet et spécifique que les modèles préexistants, et s'inscrivait dans un programme de recherche autour de la microcéphalie et de la compréhension du développement du cerveau humain.

Les premiers organoïdes neuronaux humains étaient donc dès l'origine conçus pour l'étude du neurodéveloppement et des pathologies associées.

Le développement des organoïdes neuronaux humains a permis de mieux comprendre les pathologies neurodéveloppementales qui trouvent leurs origines dans les premiers instants de développement, avec cependant des limites :

- ces pathologies sont souvent multifactorielles, liées à l'interaction entre une composante génétique polygénique et des facteurs de milieu ;
- les organoïdes ne permettent pas de visualiser l'ensemble des répercussions pathologiques sur l'individu : il n'est par exemple possible de mesurer un retard mental ou des troubles du spectre autistique que si ceux-ci sont effectivement visibles dans le phénotype.

A. Mutations génétiques et neurodéveloppement

i. Microcéphalie primaire autosomique récessive

La microcéphalie primaire autosomique récessive (MCPH) est un trouble du développement neurologique caractérisé par une taille nettement réduite du cortex cérébral avec conservation d'une architecture normale dans l'organisation des tissus neuronaux⁸⁶. Plusieurs mutations génétiques, comme la mutation CDK5RAP2, ont été identifiées chez les patients atteints de MCPH, et la plupart d'entre elles codent pour des protéines du centrosome⁸⁷. Le centrosome est un petit organite bien connu pour son rôle dans l'établissement du fuseau bipolaire au cours de la division cellulaire⁸⁷.

Des modèles murins de microcéphalie primaire ont été développées avec des mutations génétiques liées à la MCPH, et ont ainsi révélé le rôle de ces gènes sur la prolifération des progéniteurs neuraux. Ces modèles n'ont cependant pas réussi à reproduire une réduction sévère de la taille du cerveau, comme cela est observé chez les patients humains⁸⁸.

L'équipe de Lancaster, à l'origine du premier organoïde neuronal humain, ont modélisé la microcéphalie humaine et ont réussi à expliquer le phénotype de la maladie en partie grâce à ces organoïdes neuronaux³⁴. Ils ont reprogrammé des fibroblastes présentant des mutations tronquantes hétérozygotes de CDK5RAP2, obtenus à partir d'un patient atteint de microcéphalie, pour en faire des hiPSC, et développer ainsi un organoïde de microcéphalie directement dérivé du patient malade⁸⁷. Les résultats des colorations immunohistochimiques ont montré que les organoïdes de microcéphalie dérivés du patient ne présentaient que des régions neuroépithéliales occasionnelles. En outre, les tissus des organoïdes présentaient une diminution des cellules souches gliales radiales (RG) et une augmentation des neurones à un stade précoce (22 jours) de la culture, ce qui indique une différenciation neuronale prématurée. Enfin, l'orientation exclusivement horizontale du fuseau glial, qui est nécessaire à l'expansion symétrique précoce des CSN, était perturbée dans les organoïdes dérivées des patients⁸⁹. Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle critique du gène CDK5RAP2 dans la pathogenèse du MCPH, et fourni un modèle de recherche récapitulant bien le phénotype du cerveau atteint de MCPH, utilisable à l'avenir pour le développement de thérapie.

De nombreuses études ont suivi, utilisant les organoïdes neuronaux pour étudier l'implication de différentes mutations dans la survenue de microcéphalies. On notera par exemple l'utilisation d'organoïdes pour conclure à l'implication des mutations suivantes :

Publication	Origine des organoïdes	Gène muté	Observations
Gabriel et al. ⁹⁰	iPSC	CPAP	réduction des tissus épithéliaux neuraux, avec augmentation du nombre et de la longueur des cils primaires dans les cellules
Li et al. ⁹¹	iPSC et cellules souches embryonnaires humaines	ASPM	neuroépithélium désorganisé, observations réalisées uniquement sur le cortex cérébral
Zhang et al. ⁹²	iPSC et cellules souches embryonnaires humaines	WDR62	désassemblage retardé du cil primaire, allongement du cil et ralentissement du cycle cellulaire entraînant une diminution de la prolifération cellulaire et une différenciation prématurée des cellules neurales progénitrices
Javed et al. ⁹³	iPSC	KNL1	réduction de la prolifération des cellules progénitrices neuronales, avec différenciation prématurée.
Dhaliwal et al. ⁹⁴	cellules souches embryonnaires humaines	PTEN	réduction de la prolifération des cellules progénitrices neuronales, avec différenciation prématurée.
Esk et al. ⁹⁵	cellules souches embryonnaires humaines	IER3IP1	phénotype présentant une perte de progéniteurs neuronaux

Fair et al. ⁹⁶	iPSC	AUTS2	déficit de prolifération des cellules progénitrices neuronales et polarité cellulaire perturbée ⁹⁶
---------------------------	------	-------	---

Table 1 : Différentes mutations ayant conduit à des phénotypes de microcéphalie sur des organoïdes neuronaux humains.

Toutes ces résultats soulignent la valeur ajoutée des organoïdes neuronaux dans l'étude des mécanismes cellulaires, la collecte de données et l'avancé dans la compréhension de l'implication de mutations conduisant à des microcéphalies.

ii. Lissencéphalie

La lissencéphalie désigne des malformations rares associant des anomalies de l'apparence des circonvolutions et de l'organisation des couches du cortex cérébral, en raison d'un défaut spécifique de migration neuronale lors de l'embryogenèse.

Le cortex cérébral est normalement traversé par des sillons qui lui donnent un aspect de « champ labouré ». Certains de ces sillons sont plus profondément marqués et sont appelés des scissures. Le processus de formation des sillons (et des scissures) s'appelle la gyration (Figure 21).

La lissencéphalie est donc une anomalie de la gyration : on parle d'agyrie lorsqu'il n'existe plus du tout de sillon, et de pachygyrie quand il existe encore quelques sillons. En plus de l'aspect macroscopique de la maladie s'ajoute une désorganisation microscopique des couches de neurones du cortex due à une migration neuronale anormale.

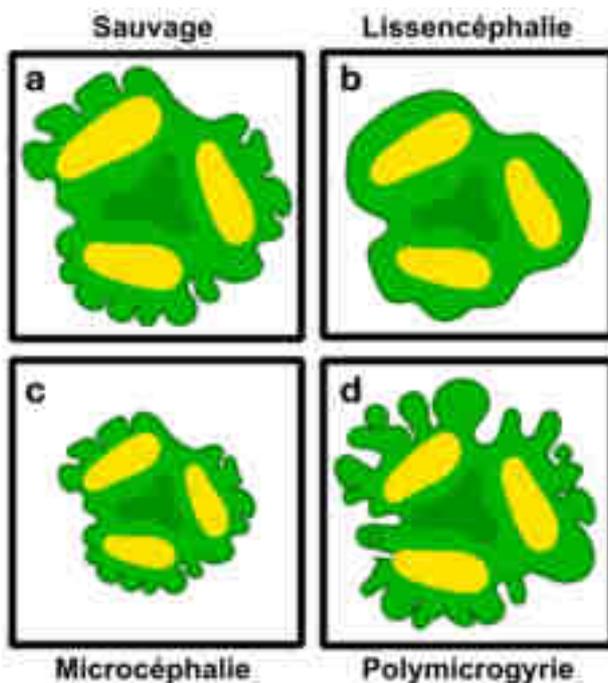


Figure 21 : Présentation schématique des malformations cérébrales pouvant être modélisées dans des organoïdes cérébraux

(a) Organoïde neuronal normal (b) lissencéphalie (c) microcéphalie, et (d) polymicrogyrie (plis cérébraux supplémentaires)⁹⁷

Les enfants souffrant de lissencéphalie ont en commun des difficultés de déglutition et d'alimentation, des anomalies du tonus musculaire (hypotonie précoce, hypertonie des membres plus tardivement), des crises convulsives et un retard psychomoteur sévère à profond. L'espérance de vie avec la lissencéphalie peut varier considérablement en fonction de la gravité de la malformation et des complications associées. Dans les cas les plus sévères, les enfants atteints de lissencéphalie peuvent avoir une espérance de vie réduite, parfois quelques mois, et souvent inférieure à 10 ans. Cependant, il est important de noter que chaque cas est unique et que certains individus atteints de lissencéphalie peuvent vivre plus longtemps, en particulier si la malformation est moins sévère. Il n'existe pas de traitement à ce jour, mais les soins de soutien peuvent aider à améliorer la qualité de vie des patients :

interventions médicales pour traiter les complications associées, thérapie physique et occupationnelle pour aider au développement et à la mobilité, ainsi que des approches éducatives adaptées aux besoins spécifiques des personnes atteintes de lissencéphalie.

Il existe de multiples formes de lissencéphalie. Leur classification actuelle, qui tient compte des malformations associées et des étiologies, permet de distinguer deux grands groupes : les lissencéphalies classiques et pavimenteuses.

- Les lissencéphalies classiques comportent le type 1 et des variants. Dans la lissencéphalie de type 1, le cortex apparaît épaissi et adopte une architecture anormale à 4 couches plus ou moins désorganisées, au lieu des 6 couches normales. Dans les variants s'ajoutent des anomalies extra-corticales.

L'incidence de la lissencéphalie de type 1, forme la plus fréquente de lissencéphalie, est de l'ordre d'une sur 100 000 naissances.

Les lissencéphalies classiques et leurs variants se répartissent en plusieurs sous-groupes. Quatre se distinguent par leur étiologie génétique :

- mutation du gène LIS1 sur le chromosome 17p13⁹⁸ (lissencéphalie isolée et syndrome de Miller-Dieker lorsque les mutations génomiques englobent plus que le gène LIS1⁹⁹),
- mutation du gène TUBA1A¹⁰⁰,
- mutation du gène DCX¹⁰¹,
- mutation du gène ARX¹⁰² (syndrome XLAG, lié à l'X, avec agénésie du corps calleux).

À côté de ces 4 entités, on classe également sous le terme de lissencéphalie classique les formes isolées sans anomalie génétique identifiée, les lissencéphalies avec microcéphalie sévère (microlissencéphalie) et les lissencéphalies associées à des syndromes polymalformatifs.

- Les lissencéphalies pavimenteuses (anciennement type 2) regroupent 3 entités : les syndromes de Walker-Warburg¹⁰³, de Fukuyama¹⁰⁴ et le syndrome muscle-oeil-cerveau¹⁰⁵. Elles résultent d'une désorganisation globale de l'organogenèse cérébrale. La surface corticale est irrégulière. Au microscope, le cortex est totalement désorganisé et ne comporte plus de couche identifiable.

Alors que les caractéristiques de la migration neuronale de la maladie ont été modélisées avec succès dans des modèles de souris, le phénotype du cerveau atteint de lissencéphalie ne peut être correctement récapitulé dans ces modèles animaux en raison de la finesse du cerveau murin, naturellement lissencéphale et dépourvu de zone sous-ventriculaire externe.

La mise au point de la technologie des organoïdes neuronaux humains a permis à plusieurs équipes de chercheurs d'étudier et de modéliser plus fidèlement le phénotype de lissencéphalie liée à LIS1^{106,107}, premier gène identifié dans cette maladie et phénotype le plus fréquent. Ces études ont utilisé des iPSC provenant de patients atteints du syndrome de Miller-Dieker^{106,107}. Dans ces études, la taille des organoïdes dérivés des iPSC de patients était significativement plus petite que celle des organoïdes de contrôle. Dans la première étude un défaut précoce dans l'expansion des cellules neuroépithéliales a été observé en raison d'une apoptose accrue et d'une diminution des divisions verticales, entraînant une réduction des réserves de cellules neuroépithéliales. En outre, les neurones présentant la mutation avaient une vitesse de déplacement et une rectitude réduites pendant la migration¹⁰⁶. Dans la seconde étude, une perturbation de l'axe de signalisation N-cadhérine/ β -caténine/Wnt a été mise en évidence dans les organoïdes, entraînant un déséquilibre de la prolifération et de la différenciation dans les progéniteurs corticaux¹⁰⁷. Il a été observé que le phénotype pouvait être amélioré par une activation externe de Wnt.

Bien que les organoïdes neuronaux aient été utilisés avec succès pour reconnaître la pathogenèse des mutations liées à LIS, un véritable pliage cortical n'a pas encore été réalisé dans les organoïdes neuronaux¹⁰⁸. Des efforts ont été faits pour créer un "plissement" ou un "pseudo-pliage" neuroépithéliale au cours de la différenciation précoce, soit en induisant une prolifération accrue des progéniteurs neuronaux par manipulation génétique¹⁰⁹, soit en utilisant une contrainte mécanique interne dans un dispositif microfluidique^{110,111}. Cependant, elles ne conduisent pas à la formation d'une réelle gyrification à l'échelle du cerveau humain¹¹². Si le mécanisme physique est similaire, la gyrification observée est modélisée à un stade trop précoce du neurodéveloppement, ce qui n'est pas représentatif de la réalité du développement d'un cerveau humain. De meilleures approches peuvent être nécessaires pour concevoir des organoïdes qui récapitulent le pliage du néocortex humain (Figure 22).

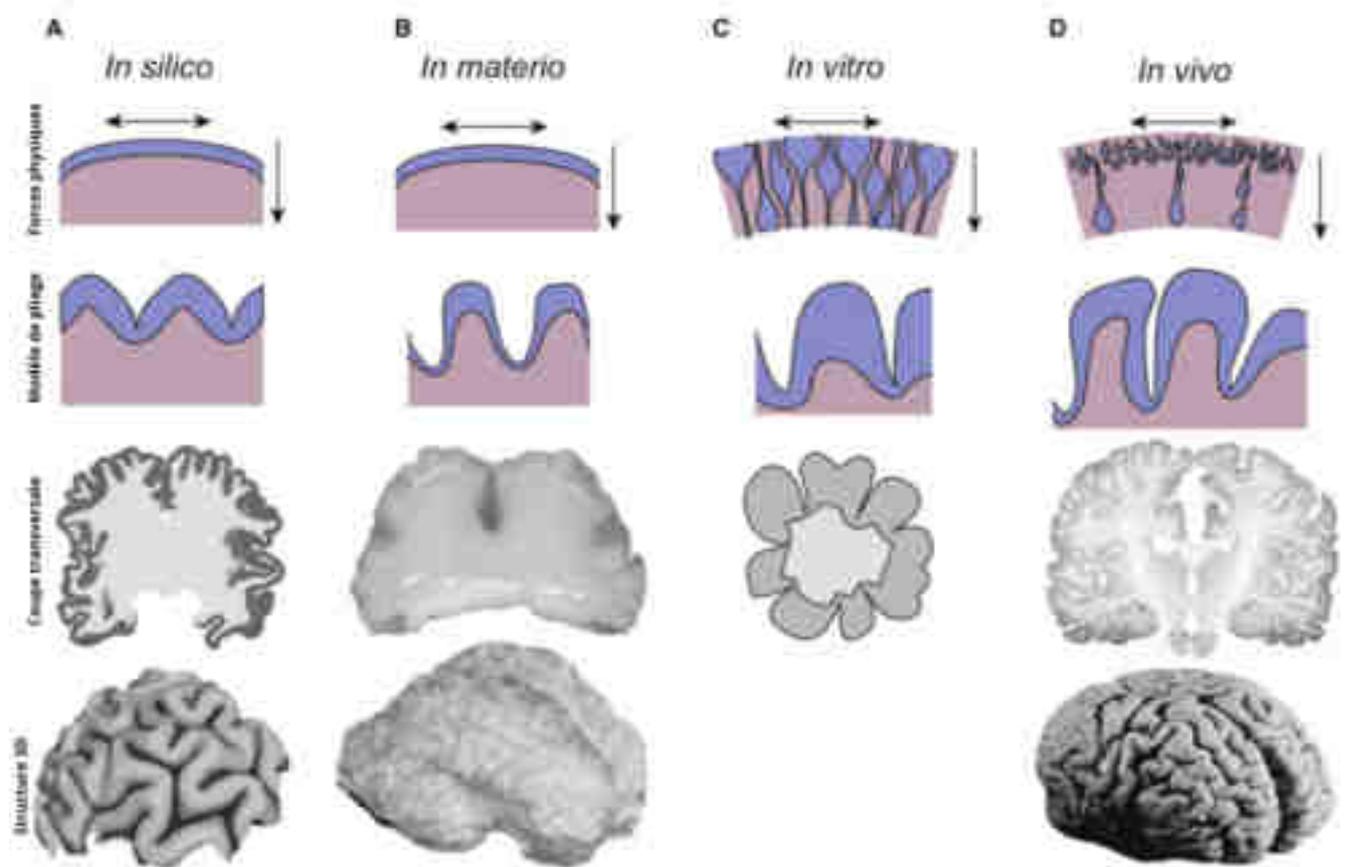


Figure 22 : L'expansion des tissus en surface, combinée à une contrainte interne, conduit à l'apparition de plis. Exemple dans différents modèles de gyrification du cerveau¹¹²

Des modèles mathématiques de pliage du cerveau *in silico*¹¹³ (A) ainsi que des modèles avec un matériel artificiel à deux couches¹¹⁴ (B) ont suggéré que des plis peuvent se former lorsque la couche superficielle s'étend mais est contrainte par la couche interne.

Les organoïdes cérébraux cultivés *in vitro* sur une puce (C) présentent également un pliage dû à l'expansion de la surface des cellules neuroépithéliales en phase S, contraintes par leurs contacts apicaux¹¹⁰. *In vivo* (D), l'expansion de la surface pourrait être générée par un nombre croissant de neurones migrant vers la surface, tandis que leurs projections de matière blanche pourraient fournir une contrainte¹¹².

iii. Trisomie 21

La trisomie 21, ou syndrome de Down, est due à la présence d'une troisième copie (partielle ou totale) du chromosome 21. Le chromosome 21 est le plus petit des chromosomes, il compte environ 270 gènes.

La trisomie 21 se caractérise par une déficience intellectuelle plus ou moins importante, une hypotonie musculaire et une laxité articulaire, souvent associées à une dysmorphie faciale caractéristique et à diverses anomalies, telles que des anomalies cardiaques, gastro-intestinales, neurosensorielles ou endocriniennes¹¹⁵.

La prévalence à la naissance de la trisomie 21 dans un pays dépend largement de facteurs non médicaux, à savoir les politiques publiques en matière de diagnostic prénatal et de prise en charge des personnes handicapées, ainsi que l'opinion publique sur la maladie et l'avortement¹¹⁶. La prévalence se situe entre 1/400 et 1/3 000 naissances vivantes. Le risque d'avoir un enfant atteint de trisomie 21 augmente, de manière identique dans toutes les populations, avec l'âge de la mère. En 2017, la trisomie 21 a été la 1ère cause diagnostiquée de retard mental d'origine génétique. C'est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes, avec environ 450 naissances par an en France.

Des défauts précoces dans le développement cortical sont probablement à l'origine des déficiences cognitives dans le syndrome de Down, bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent insaisissables. Quelques études se sont penchées sur le sujet en utilisant des organoïdes dérivés de patients porteurs de trisomie 21 via la technologie des iPSC¹¹⁷. Des dysfonctionnements moléculaires à l'origine du phénotype ont ainsi pu être identifiés :

- Dysrégulation de la voie DSCAM/PAK1 affectant la neurogénèse dans la trisomie 21, avec diminution de la prolifération et de l'expression des marqueurs des couches II (couche granulaire externe) et IV (couche granulaire interne) des neurones corticaux dans les régions sous-corticales¹¹⁸
- Implication de la voie DSCAM/PAK1 dysrégulée dans l'agrégation mitochondriale périnucléaire observée dans des neurones GABA et des cellules de l'éminence ganglionnaire médiane présentant une trisomie 21¹¹⁹
- Hyper-expression d'OLIG2 dans les progéniteurs neuronaux, à l'origine d'une surproduction de sous-classes spécifiques d'interneurones GABAergiques¹²⁰

L'utilisation des organoïdes neuronaux a également permis d'étudier le lien existant entre trisomie 21 et maladie d'Alzheimer. En effet, la quasi-totalité des individus porteurs d'une trisomie 21 présentent aux alentours de 40 ans des modifications neuropathologiques semblables à celles présentes dans la maladie d'Alzheimer, telles qu'une accumulation de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires¹²¹. Et environ 40 à 80 % des patients atteints de trisomie 21 développent une démence de type maladie d'Alzheimer entre 50 et 60 ans, bien plus tôt que la majorité des patients atteints de la maladie d'Alzheimer¹²².

La culture comparée d'organoïdes issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou porteurs d'une trisomie 21 a permis de valider les similitudes moléculaires existantes entre ces deux pathologies^{123,124}. Dans une étude utilisant des organoïdes neuronaux humains dérivés d'iPSC issus de patients porteurs de trisomie 21, le gène DYRK1A (présent sur le chromosome 21, donc triplé lors d'une trisomie 21, et surexprimé dans la maladie d'Alzheimer) a été identifié comme impliqué dans le transport de la protéine précurseur de l'amyloïde¹²⁵. Selon cette étude, l'harmine, inhibiteur de DYRK1A, pourrait ouvrir une nouvelle voie moléculaire pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et des symptômes associés chez les individus porteurs de trisomie 21.

Enfin, deux études utilisant des iPSC issus de patients porteurs de trisomie 21 ont soulevé des perspectives de thérapies lors de recherches utilisant des organoïdes :

- L'utilisation de vésicules extracellulaires sur des organoïdes dérivées d'individus porteurs d'une trisomie 21 a montré une efficacité sur les taux de neurogenèse, une diminution significative des niveaux de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires et une réduction de l'étendue de la mort cellulaire par rapport aux organoïdes trisomiques non traités¹²⁶
- Le répresseur de transcription, Repressor Element-1 Silencing Transcription factor (REST), pourrait s'avérer être une cible thérapeutique en l'utilisant pour moduler un nombre important des gènes différenciellement exprimés dans la trisomie 21¹²⁷.

B. Neurotoxicité développementale chez le fœtus

i. Infection virale

Les infections virales survenant au cours de la grossesse peuvent conduire à une activation désordonnée du système immunitaire maternel, qui peut avoir des répercussions sur les cellules neurales du fœtus et nuire gravement au développement neurologique de l'enfant. Le virus peut également infecter directement l'enfant en traversant le placenta, et impacter le développement du fœtus.

Un nombre croissant d'études suggèrent que ces infections entraînent des altérations des cellules souches neurales avec des conséquences à long terme pour l'enfant, y compris des troubles du développement neurologique tels que les troubles du spectre autistique, la schizophrénie et les déficiences cognitives¹²⁸.

Infection par le virus Zika

Le virus Zika est un Flavivirus transmis majoritairement par les moustiques du genre *Aedes*. Il est répandu en Asie et en Afrique, et a récemment émergé en Amérique centrale et en Amérique du Sud. L'infection est silencieuse chez la plupart des personnes infectées, elle reste le plus souvent bénigne, et peut durer jusqu'à une semaine¹²⁹. Il n'existe actuellement pas de vaccin, ni de traitement spécifique de la virose Zika, les seuls traitements disponibles étant symptomatiques. Soupçonnées de provoquer des microcéphalies, les infections au virus Zika pendant la grossesse ont été étudiées en infectant des organoïdes neuronaux humains. Les organoïdes infectés étaient significativement plus petits que les organoïdes témoins¹³⁰, et la taille était corrélée au nombre de copies virales¹³¹. Il a également été observé une suractivation du récepteur Toll-Like 3 (protéine récepteur participant à l'immunité antivirale par l'intermédiaire de l'interféron de type 2) lors de l'infection des organoïdes, et que l'inhibition de Toll-Like 3 réduit les effets phénotypiques de l'infection virale¹³¹. Ces observations ont conduit à l'idée que chez le fœtus le virus Zika pourrait perturber une voie de signalisation régulée par Toll-Like 3 en ciblant les progéniteurs neuronaux (mais pas les neurones⁶⁶), tout en régulant à la baisse les gènes¹³⁰ liés au cycle cellulaire, à la division cellulaire, à la neurogenèse, ainsi qu'au guidage et à la différenciation axonaux, ce qui correspond aux caractéristiques des enfants microcéphales nés de mères infectées par le virus Zika.

Infection par cytomégalovirus

Le cytomégalovirus humain (CMVH) est un virus à ADN double brin qui appartient à la famille des Herpesviridae et au genre Herpesvirus. L'infection par CMVH est le plus souvent bénigne, mais grave chez la femme enceinte où elle peut affecter le développement du fœtus et entraîner des séquelles durables et handicapantes. Chaque année, en France, on observe environ 300 infections materno-fœtales par CMVH, ce qui est très peu en regard des plus de 700 000 naissances annuelles. Néanmoins, l'infection à CMVH reste l'infection virale transmissible de la mère au futur nouveau-né la plus fréquente dans les pays industrialisés¹³². L'infection congénitale à CMVH n'entraîne des manifestations cliniques que chez 10 % des nouveau-nés, mais 10 à 15 % des nouveau-nés apparemment asymptomatiques présentent des séquelles à long terme, telles qu'une perte auditive neurosensorielle,

des troubles du développement neurologique, des complications ophtalmiques, des tumeurs cancéreuses cérébrales et des troubles du spectre autistique¹³³. Les organoïdes neuronaux humains ont été utilisés pour étudier l'impact de l'infection directement sur le cerveau du fœtus. Il a été observé que l'exposition d'organoïdes neuronaux (dérivés d'iPSC) au CMVH modifie la distribution des progéniteurs neuronaux et des populations neuronales dans les couches corticales, des régions de nécrose, la présence de vacuoles et de kystes¹³⁴. Les cellules infectées présentent un appauvrissement des réserves de calcium et un dérèglement de la signalisation calcique¹³⁵. À noter que ces observations ne récapitulent pas parfaitement l'infection in vivo, le virus étant connu pour provoquer une réponse immunitaire forte chez la mère et la libération de cytokines induite peut alors affecter le développement de l'enfant¹³⁶, et porter atteinte à l'intégrité et au développement du placenta¹³⁷, données non observables lors de mise en culture d'organoïdes.

ii. Médication de la mère pendant la grossesse

Une très longue liste de médicaments est interdite ou déconseillée aux femmes enceintes. La mise à l'index de ces médicaments est aujourd'hui systématiquement étudiée lors des études précliniques, sur des modèles animaux, mais plusieurs scandales ont également participé à interdire la prescription de certaines molécules au vu des impacts que cela pouvait avoir sur le développement du fœtus. Le plus connu est le scandale du thalidomide dans les années 50, utilisé comme anti-nauséeux pour les femmes enceintes et à l'origine de malformations chez l'enfant allant de l'amélie (absence totale d'un membre) à la des malformations mineures des extrémités des membres, accompagnés souvent des malformations cardiaques, du tube digestif, de l'appareil génito-urinaire¹³⁸. Ce médicament ayant provoqué de très nombreuses fausses-couches et enfants mort-nés, le nombre exact de victimes est difficile à évaluer mais dépasserait les 10 000 cas, principalement en Allemagne¹³⁸. Cette molécule avait pourtant été testée sur des rates gravides, et la différence de métabolisme entre rongeurs et mammifères n'avait pas été prise en compte¹³⁹. Plus récemment, on peut citer le scandale du distilbène, à l'origine de nombreuses malformations génitales¹⁴⁰, ou encore la dépakine, antiépileptique, là encore puissant tératogène ayant conduit à de nombreuses naissances d'enfants malformés¹⁴¹ et porteurs de troubles du comportement et du développement.

L'étude des répercussions sur les enfants à naître de l'utilisation par les femmes enceintes de certains médicaments est donc indispensable, en utilisant des modèles qui reproduisent le mieux possible les conditions réelles de la grossesse. L'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des médicaments thérapeutiques pour les femmes enceintes est un défi en raison des limitations historiques de leur inclusion dans les essais cliniques et des états physiologiques dynamiques pendant la grossesse qui peuvent modifier la pharmacocinétique du métabolisme des médicaments et l'exposition du fœtus aux médicaments.

Les organoïdes neuronaux humains offrent ainsi une solution intéressante pour observer l'impact des molécules sur le neurodéveloppement du fœtus au premier trimestre de la grossesse.

- La paroxétine, inhibiteur sélectif de recapture de la sérotonine, est un antidépresseur fréquemment utilisé pour traiter la dépression pendant la grossesse. La neurotoxicité développementale de cette molécule a été étudiée sur des organoïdes neuronaux humains dérivés d'iPSC¹⁴², et il a été observé qu'à des concentrations sanguines thérapeutiques comprises entre 20 et 60 ng/ml, la paroxétine entraîne une diminution de 80 % de l'expression des marqueurs synaptiques, une diminution de 60 % de la croissance des neurites et une diminution de 40 à 75 % de la population globale de cellules oligodendrocytaires, par rapport aux organoïdes témoins. Ces résultats indiquent que des concentrations thérapeutiques classiques de paroxétine induisent des anomalies dans le développement des cellules cérébrales qui pourraient avoir des effets néfastes sur le fœtus.

- Le sévoflurane est un gaz anesthésiant couramment utilisé en chirurgie, et notamment en chirurgie pédiatrique, car très simple à mettre en place. Aucune donnée concernant l'utilisation du sévoflurane chez la femme enceinte n'est actuellement disponible, en conséquence, le sévoflurane ne peut être utilisé chez la femme enceinte qu'en cas d'indication formelle¹⁴³. Une étude a mis en culture des organoïdes neuronaux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines, et a observé un délai réversible de croissance de la zone ventriculaire, et une augmentation là encore réversible de l'expression des gènes TUJ1 et MAP2 codant pour des protéines clés de la neurogénèse¹⁴⁴. Ces données suggèrent que l'exposition maternelle au sévoflurane pendant le premier trimestre de la grossesse peut provoquer une différenciation neuronale anormale mais réversible dans le cerveau du fœtus.
- La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Il a été observé que cette molécule traversait facilement le placenta, en conséquence de quoi pendant la grossesse, en particulier au cours du premier trimestre, ce médicament ne doit être administré qu'après une évaluation approfondie du rapport bénéfice/risque¹⁴⁵. L'administration de dexaméthasone à des organoïdes neuronaux humains dérivés d'iPSC a entraîné une réponse transcriptionnelle forte des neurones, avec une surexpression de gènes connus pour être associés à des troubles du comportement¹⁴⁶. La molécule entraînait également une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, associée à une diminution de la différenciation neuronale, et ce avec une dose unique dont les effets s'étalaient sur plusieurs jours.

Dans les exemples de ces molécules les modifications transcriptionnelles observées sont susceptibles de se transmettre ensuite de manière héréditaire, ajoutant encore des effets néfastes à ceux déjà observés, bien que ces données ne puissent pas pu être étudiées avec les modèles d'organoïdes utilisés.

Les organoïdes neuronaux restent des modèles limités : avec une approche uniquement moléculaire, ils ne permettent pas une étude complète des multiples répercussions que peut avoir la prise de médicaments au cours de la grossesse, et omettent les potentiels effets « longs termes » sur le développement de l'enfant : troubles du spectre autistiques, psychoses, retard mental etc. Ces effets restent pour le moment très difficiles à anticiper, et aucun modèle de recherche n'est efficace pour répondre à cette problématique.

iii. Exposition du fœtus à l'alcool et au tabac

Alcool et grossesse

Selon les données du Baromètre Santé Publique France 2017, sur le territoire français la consommation ne serait-ce qu'occasionnelle d'alcool pendant la grossesse concernerait environ une femme enceinte sur dix¹⁴⁷. Or boire de l'alcool pendant la grossesse augmente le risque de faible poids de naissance¹⁴⁸, de naissance prématurée¹⁴⁹, de fausse couche¹⁵⁰ et peut aussi entraîner chez l'enfant un ensemble de troubles physiques et cognitifs regroupés sous le terme de « syndrome d'alcoolisation fœtale » ou SAF¹⁵¹. L'alcool est connu pour avoir un effet sur l'activité de différents types de cellules neuronales, mais les effets physiopathologiques fonctionnels précis sur le cortex cérébral du fœtus humain ne sont pas clairs.

Dans une étude de 2020 des organoïdes dérivés d'iPSC traités à l'alcool présentaient un taux d'apoptose élevé, avec une vulnérabilité plus importante pour les neurones que pour les astrocytes¹⁵², ainsi qu'une dérégulation de gènes associés à des pathologies comme des troubles psychiatriques et des troubles du comportement ou du développement. Les doses d'éthanol appliquées aux organoïdes ont été sélectionnées pour être équivalentes ou inférieures au taux d'alcoolémie des buveurs excessifs (qui sont définis comme buvant >4 verres standards) afin de trouver la plus faible concentration d'éthanol pouvant déclencher l'apoptose dans les organoïdes neuronaux. Les organoïdes traités à

l'alcool montraient également des changements tels que des modifications dans les crêtes et la matrice des mitochondries et une désorganisation du cytosquelette.

Une étude de 2017 utilisant des organoïdes neuronaux dérivés d'iPSC a permis d'identifier plusieurs nouveaux gènes et voies de signalisation (GSX2, RSPO2 et la voie de signalisation Hippo) affectés par l'éthanol au cours de la neurogénèse¹⁵³.

Une dernière étude a analysé l'effet de l'alcool sur le développement rétinien, qui dérive directement des tissus neuronaux¹⁵⁴ en utilisant cette fois des organoïdes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines. Les chercheurs ont observé une croissance significativement réduite de croissance des organoïdes, dû à une mort cellulaire plus importante et à un défaut de différenciation des cellules ganglionnaires de la rétine. Ils ont également pu constater une altération de la signalisation calcique due à la régulation négative des gènes RYR1 et CACNA1S.

Tabac et grossesse

D'après le Baromètre Santé Publique France 2017, le tabagisme pendant la grossesse concernerait entre 20 % et 25 % des femmes enceintes¹⁴⁷. Fumer pendant la grossesse est associé à de nombreuses complications comme la grossesse extra-utérine, la rupture prématurée des membranes et la fausse couche. Ce comportement est également lié à un faible poids de naissance, au syndrome de mort subite du nourrisson¹⁵⁵ et à un retard dans la croissance du fœtus et dans son développement neurologique¹⁵⁶.

Dans une étude de 2018¹⁵⁷, des organoïdes neuronaux humains dérivés d'iPSC ont été exposés à des doses de nicotine pendant 5 jours au cours des premiers stades de l'expansion neuroépithéliale. La concentration plasmatique de nicotine chez les gros fumeurs de cigarettes atteint des valeurs de 0,6 µM ou plus, correspondant à un minimum de 10 cigarettes par jour. Ainsi, les organoïdes neuronaux ont été initialement exposés à une concentration de nicotine physiologiquement pertinente (au moins 1 µM). Comme les effets de la nicotine sur le développement du cerveau fœtal dépendent de la concentration, de la durée d'exposition et des cellules cibles, les organoïdes neuronaux ont été traités avec différentes doses de nicotine (0, 1 et 10 µM) pendant différentes périodes (0, 5 et 14 jours).

Il a été constaté que la nicotine induisait la mort cellulaire ainsi qu'une proportion accrue de cellules positives à TUJ1, ce qui suggère une différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux. La régionalisation du cerveau et le développement cortical ont été perturbés dans les organoïdes traités à la nicotine, associé à une modification de l'expression des marqueurs du cerveau antérieur (PAX6 et FOXG1), du cerveau postérieur (PAX2 et KROX20) et de la couche neuronale corticale (TBR1 de la préplaque et CTIP2 de la couche profonde). En outre, la croissance des neurites a montré une différenciation et une migration neuronales anormales dans les organoïdes neuronaux traités à la nicotine. Ces résultats suggèrent que l'exposition à la nicotine entraîne une altération de la neurogénèse au début du développement du cerveau fœtal pendant la gestation, et complètent les données déjà existantes sur le sujet par une compréhension plus fine des mécanismes moléculaires associés.

Pour l'alcool comme pour le tabac, d'autres études seraient nécessaires afin d'évaluer les effets provoqués lors d'exposition à des doses précises, en tenant compte de la capacité pour les molécules à traverser la barrière placentaire, et en intégrant le facteur de concentration des molécules dans le sang fœtal.

VII. Les organoïdes neuronaux humains dans la recherche en neuropathologie

En récapitulant l'organisation cellulaire du cerveau humain, sa composition et son expression génétique, les organoïdes neuronaux humains sont de bon outils pour la compréhension du développement du cerveau et des maladies liées à cet organe. Ils peuvent être utilisés pour modéliser la pathologie d'une catégorie spécifique de malades, voire celle d'un patient particulier (Figure 23), en

commençant le protocole avec ses propres cellules souches et en utilisant les technologies de cellules iPSC. En suivant le développement des organoïdes issus de ces cultures et en observant leurs caractéristiques biomoléculaires, il devient possible d'étudier de manière très précise en laboratoire des phénotypes pathologiques particuliers.

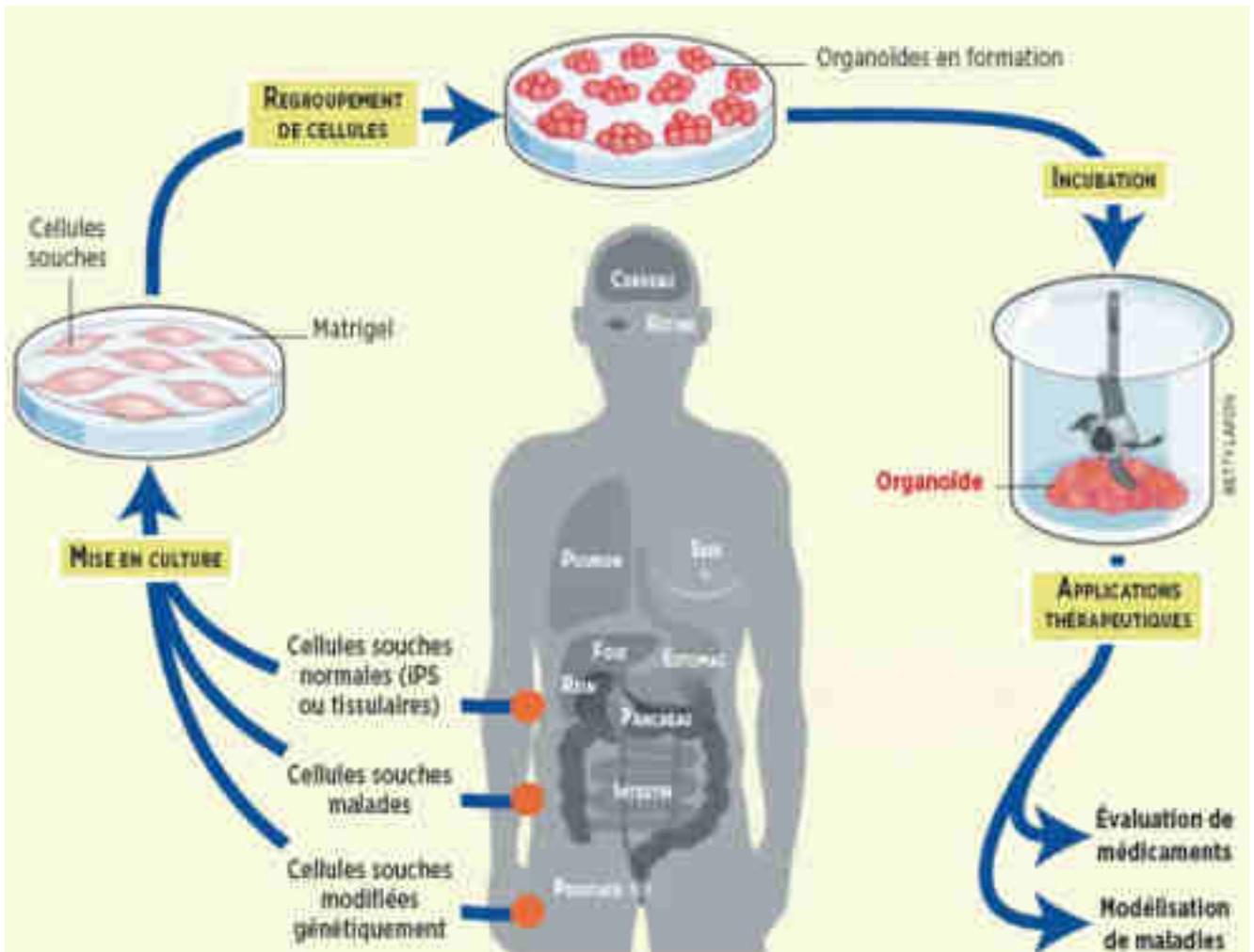


Figure 23 : Formation d'organoïde via la technologie iPSC (nommée iPS dans la figure) à partir de tissus dérivés du patient¹⁵⁸

A. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives englobent un groupe d'affections diverses sur le plan pathologique et clinique, dans lequel on retrouve par exemple la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et plusieurs autres troubles neurologiques caractérisés par une accumulation de protéines mal repliées et par la perte de neurones fonctionnels dans les régions touchées du cerveau humain. Ces maladies neurodégénératives sont une cause fréquente et de plus en plus importante de mortalité et de morbidité dans le monde, en particulier chez les personnes âgées.

Faute d'une bonne compréhension de ces pathologies, la plupart des traitements utilisés actuellement sont peu efficaces, et font des maladies neurodégénératives des pathologies que l'on peut partiellement soigner mais qu'on ne peut guérir. La compréhension des mécanismes en jeu dans la neurodégénérescence est donc essentielle pour permettre le développement et la sélection de thérapies efficaces.

Les systèmes traditionnels de culture de neurones, d'astrocytes ou d'oligodendrocytes en 2D, ainsi que les modèles animaux, ont permis pendant longtemps de faire avancer la recherche et ont fourni des informations précieuses sur les principales voies physiopathologiques liées à ces maladies. L'utilisation de ces modèles reste très limitée. Citons par exemple la mortalité extrêmement précoce de souris knock-down au cours de certaines recherches¹⁵⁹, ou l'interdépendance forte de différents types de tissus neuronaux, situation difficilement reproductible en culture cellulaire classique 2D¹⁶⁰.

Aujourd'hui, le développement des organoïdes neuronaux humains offre un outil révolutionnaire pour l'étude des troubles neurodégénératifs humains, permettant une analyse non invasive de tissus humains dérivés du patient.

i. Alzheimer

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé¹⁶¹, la démence est un syndrome dans lequel on observe une dégradation de la mémoire, du comportement, du raisonnement et de l'aptitude à réaliser les tâches quotidiennes. La démence touche principalement les personnes âgées, mais elle n'est pas une composante normale du vieillissement. En 2021, on comptait plus de 55 millions de personnes atteintes de démence dans le monde, et une prévalence qui continue de croître en partie à cause du vieillissement de la population mondiale : on estime qu'en 2030, ce seront 78 millions de patients atteints, et 139 millions en 2050¹⁶². Cette pathologie est l'une des causes principales de handicap et de dépendance parmi les personnes âgées dans le monde. La démence a des conséquences physiques, psychologiques, sociales et économiques pour les personnes atteintes, mais également pour les personnels en charge des soins, les familles et la société en général.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus courante de démence et serait à elle seule à l'origine de 60 à 70% des cas¹⁶¹.

Les patients atteints souffrent à des degrés divers de déclin cognitif et de graves troubles de la mémoire¹⁶³. Le diagnostic repose sur un tableau clinique répondant à divers critères associés au dosage de plusieurs biomarqueurs. À ce jour, le traitement reste uniquement symptomatique. Le cerveau des patients atteints de MA porte deux types de lésions identifiées : les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Chacune de ces lésions est associée à une protéine : le peptide β -amyloïde pour les dépôts amyloïdes, et la protéine tau hyper-phosphorylée pour les dégénérescences neurofibrillaires. La protéine β -amyloïde, naturellement présente dans le cerveau, s'accumule au cours des années sous l'influence de différents facteurs génétiques et environnementaux.

Selon l'hypothèse de la "cascade amyloïde", l'accumulation de ce peptide induit une toxicité pour les cellules nerveuses, se traduisant par l'augmentation de la phosphorylation d'une protéine associée au cytosquelette des neurones, la protéine Tau, qui entraîne à son tour une désorganisation de la structure des neurones et une dégénérescence dite "neurofibrillaire".¹⁶⁴

Les modèles murins de la MA avec des mutations de la MA dite familiale (FAD) présentent bien des déficits synaptiques et de mémoire induits par l'amyloïde- β , mais ne récapitulent pas complètement d'autres caractéristiques pathologiques clés de la MA, notamment la présence des enchevêtrements neurofibrillaires¹⁶⁵. La culture en 2D de neurones humains dérivés de patients atteints de la MA a montré des niveaux élevés de dépôts toxiques d'amyloïde- β et de protéine Tau hyper-phosphorylée (p-tau), mais n'a pu reproduire les plaques β -amyloïdes ou les enchevêtrements neurofibrillaires¹⁶⁶.

Partant de ces problématiques, Hoon Choi et al.¹⁶⁷ ont cherché à développer en 2014 un modèle organoïde de la MA dérivé de cellules souches neurales humaines (lignée de cellules progénitrices neurales rendue immortelles par transduction rétrovirale avec l'oncogène v-myc., et dérivées de la région du mésencéphale ventral d'un cerveau fœtal humain de 10 semaines) (lignée cellulaire commercialisée par Millipore). Pour ce faire, ils sont partis de la découverte que des mutations dans

les gènes de la protéine précurseur de l'amyloïde- β (APP)¹⁶⁸ et de la préséniline (PS) 1¹⁶⁹ contribuaient à la MA dite familiale (FAD). Ils ont donc cherché à mettre au point un organoïde neuronal dérivé de cellules souches neurales humaines qui surexpriment les mutations humaines de la MA familiale dans les gènes APP et PS1¹⁶⁷. Ces organoïdes de la FAD présentaient un dépôt distinct d'amyloïde- β et de protéine tau hyper-phosphorylée qui est caractéristique des tissus cérébraux touchés par la MA. En outre, le traitement par des inhibiteurs de β - ou γ -sécrétase (enzymes protéolytiques responsables de la coupure du domaine transmembranaire du précurseur de l'amyloïde- β (APP) pour former l'amyloïde- β (A β)) pouvait atténuer la tauopathie et diminuer le niveau d'amyloïde- β dans les organoïdes. Cet organoïde neuronal a donc récapitulé avec succès les principales caractéristiques de la pathologie de la MA, et s'est avéré être un modèle *in vitro* reproductible et efficace pour promouvoir le processus de recherche sur les maladies neurodégénératives¹⁶⁷.

En 2018, Cesar Gonzalez et al.¹²³ ont développé un organoïde cérébral de la MA produit directement à partir d'iPSC dérivées de patients ayant développé une MA familiale, et là encore des caractéristiques pathologiques propres à la MA, notamment les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires, ont été détectées dans les organoïdes produits. Cette découverte a démontré la possibilité de développement de modèles *in vitro* de la maladie d'Alzheimer spécifiques de patients, dérivés de cellules somatiques de patients, et a fourni une nouvelle plate-forme pour la découverte de médicaments cibles et une intervention thérapeutique efficace.

En 2019, Swagata Ghatak et al. ont voulu étudier l'hyperexcitabilité observées dans cerveaux humains atteints de la MA et dans les modèles de souris transgéniques MA. Cette hyperexcitabilité aberrante est causée par un dysfonctionnement synaptique qui représente le corrélat physiopathologique majeur du déclin cognitif, et les mécanismes sous-jacent à cette activité électrique restent incompris. Afin d'étudier les origines de cette hyperactivité ils ont comparé par électrophysiologie et immunofluorescence des organoïdes neuronaux dérivés d'iPSC et portant des mutations liées à la MA (mutations dans le gène codant pour la préséniline-1 ou pour la protéine précurseur de l'amyloïde) par rapport à des contrôles corrigés par des gènes isogéniques. Dans les organoïdes MA, ils ont constaté une augmentation de l'activité « d'éclatement » excitatrice, qui pourrait s'expliquer en partie par une diminution observée de la longueur des neurites (axones et dendrites). Ces observations ont permis de comprendre le mécanisme de l'hyperexcitabilité visible au cours des stades précoces de la MA, parfois avant même l'observation des premiers symptômes¹⁷⁰.

ii. Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est le deuxième trouble neurodégénératif le plus fréquent après la MA¹⁷¹. Entre 1990 et 2015, au niveau mondial, le nombre de personnes atteintes de la maladie de Parkinson a doublé pour atteindre plus de 6 millions. Principalement dû au vieillissement, ce nombre devrait encore doubler pour atteindre plus de 12 millions d'ici 2040. D'autres facteurs, notamment l'évolution des modes de vie et l'industrialisation croissante, pourraient faire passer ce nombre à plus de 17 millions¹⁷².

La MP se manifeste spécifiquement par la dégénérescence progressive des neurones à dopamine dans la substance noire du cerveau et le dérèglement du contrôle de la motricité fine dans les ganglions de la base. Les trois principaux symptômes moteurs associés sont l'akinésie, l'hypertonie et les tremblements au repos¹⁷³. Dans la MP l'altération de la formation de lysosomes et les dysfonctionnements du système lysosomal observés sont associés à l'accumulation de la protéine α -synucléine mal repliée dans les corps de Lewy. Cette protéine, naturellement présente chez les sujets sains, est retrouvée au sein des amas pathogènes sous une forme "malade", présentant un problème de conformation qui favoriserait son agrégation anormale. Lorsque la protéine est en quantité

anormalement élevée, ou lorsqu'elle présente une mutation associée à des formes héréditaires de la MP, elle bloque la fusion du lysosome avec l'autophagosome provoquant le dysfonctionnement d'une voie de l'autophagie¹⁷⁴.

La découverte récente du gène LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) qui code pour l'enzyme dardarine, a révolutionné la génétique de la MP¹⁷⁵ puisqu'une seule mutation, G2019S, explique à elle seule une proportion importante des formes autosomiques dominantes de la MP mais également des formes communes idiopathiques présentes dans certains sous-groupes de patients parkinsoniens¹⁷⁶. Cette mutation est directement associée à la perte progressive des neurones dopaminergiques dans le processus pathologique de la MP¹⁷⁶.

En 2019, Kim et al. ont généré des organoïdes de mésencéphale dérivés d'iPSCs présentant la mutation LRRK2 G2019S afin de mieux comprendre le rôle de la mutation LRRK2 dans les mécanismes pathogéniques de la MP¹⁷⁷.

En comparaison au groupe témoin (organoïdes de mésencéphale ne présentant pas la mutation LRRK2 G2019S), l'expression des marqueurs des neurones dopaminergiques (TH, AADC, VMAT2 et DAT) dans les organoïdes présentant la mutation LRRK2 G2019S était considérablement réduite au 60e jour. Des caractéristiques pathologiques semblables à celles de la MP ont également été détectées dans ces organoïdes, notamment la localisation anormale des vésicules d' α -synucléine pS129 et la mitophagie avec des marqueurs d'autophagie. En outre, après traitement par un inhibiteur de la kinase LRRK2, l'accumulation d' α -synucléine phosphorylée et la mort des neurones dopaminergiques ont été atténuées. Ces découvertes indiquent que les organoïdes neuronaux constituent bien un modèle prometteur pour la recherche autour de la MP, modèle utilisable par exemple pour le criblage de candidats médicaments¹⁷⁷.

B. Facteurs exogènes, drogues, infections

i. Infections virales du système nerveux central

Les organoïdes neuronaux sont de plus en plus utilisés pour l'étude de la pathogenèse des infections virales du SNC chez l'enfant et chez l'adulte. Ils permettent de palier aux nombreuses limites des modèles cellulaires 2D ou des modèles animaux dans le domaine : certains virus ont un tropisme particulier pour les cellules nerveuses humaines, impactent des populations de neurones qui n'existent pas dans les modèles animaux, ou provoquent des dégâts liés à l'architecture du cerveau, inobservables dans les cultures cellulaires en 2D.

Les recherches effectués en utilisant des organoïdes neuronaux humains ont ainsi permis plusieurs découvertes.

Infection par le virus Herpès Simplex de type 1

Le virus HSV1, virus Herpès Simplex de type 1, est un virus enveloppé à ADN double brin de la famille des Herpesviridae. Il est la cause la plus fréquente d'encéphalite et en l'absence de traitement antiviral, l'infection néonatale du SNC par le HSV1 entraîne une mortalité élevée et des séquelles neurologiques à long terme. Sur des organoïdes neuronaux de quelques jours seulement, il a été observé que le virus provoque une perturbation de la neurogénèse en infectant les progéniteurs neuronaux : les organoïdes formés sont plus petits, et l'architecture générale des organoïdes est modifiée^{178,179} (organoïdes dérivés de cellules souches embryonnaires et d'iPSC). La réactivation d'une infection latente dans des organoïdes matures, significativement moins fréquente que dans des cultures cellulaires en 2D, provoque une dégénérescence des processus neuronaux et la fusion cellule-cellule, avec génération de syncytia neuronaux¹⁸⁰ (organoïdes dérivés d'iPSC). Enfin, l'utilisation d'organoïdes neuronaux a également pu démontrer que le virus HSV1 inhibait la réponse interféron dans les cellules infectées¹⁷⁸.

Leucoencéphalite multifocale progressive suite à une infection par le virus John Cunningham

Le virus John Cunningham (JCV) est un polyomavirus à ADN qui provoque des infections opportunistes chez les personnes immunodéprimées en entraînant une leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP), une maladie démyélinisante mortelle¹⁸¹. La LEMP constitue une démence subaiguë notée par l'apparition progressive de troubles neurologiques divers (déficits sensitifs et/ou moteurs, troubles du comportement, syndrome cérébelleux), en fonction de la localisation des lésions cérébrales. La plupart du temps, elle conduit au décès au bout de quelques mois. La pathogenèse de la LEMP est mal comprise en raison de l'absence de modèles *in vitro* ou animaux permettant d'étudier les mécanismes de la maladie, car le virus n'infecte efficacement que les cellules humaines. Les organoïdes neuronaux humains se sont révélés être un modèle approprié pour l'étude de la maladie, l'infection des organoïdes cérébraux par le JCV entraînant bien une réplication virale et une infection spécifique des astrocytes et des oligodendrocytes alors que les neurones n'étaient pas infectés¹⁸², comme observé dans la pathologie (organoïdes dérivés d'iPSC).

Infection par le SRAS-CoV-2

Le SRAS-CoV-2 est un virus à ARN monocaténaire enveloppé, appartenant à la famille des Coronaviridae. Des symptômes et des séquelles neurologiques, pendant ou après une infection par le SRAS-CoV-2, ont été signalés¹⁸³. L'utilisation d'organoïdes neuronaux humains a permis de cartographier l'expression des récepteurs du SARS-CoV-2 dans le cerveau, et de mettre en évidence une expression prédominante dans les cellules épithéliales du plexus choroïde^{184,185} (organoïde dérivé de cellules souches embryonnaires humaines et d'iPSC, respectivement), une couche de cellules épithéliales qui tapisse les ventricules et produit le liquide céphalo-rachidien. Sur ces cellules l'infection a provoqué une régulation négative des jonctions serrées et une altération des fonctions sécrétoires, ainsi qu'une forte libération de cytokines inflammatoires¹⁸⁵.

Cultivés pendant plusieurs dizaines de jours au maximum, les organoïdes neuronaux utilisés pour obtenir ces conclusions présentent toutefois des limites : à ce stade de développement, leur profil génétique demeure le profil d'expression génétique d'un cerveau humain fœtal : l'extrapolation des résultats des infections virales sur les organoïdes neuronaux à la réalité de l'infection virale du cerveau humain adulte est moins évidente que l'extrapolation des résultats à l'infection virale sur un cerveau humain du nourrisson ou de l'enfant.

L'absence de barrière hémato-encéphalique empêche également de conclure correctement en ne prenant pas en compte la neuro-invasion virale observable *in vivo*. Ainsi, certaines complications neurologiques, notamment dans l'infection par le SRAS-CoV-2 si le virus ne passait pas la barrière hémato-encéphalique, pour être attribuées *in vivo* à la réponse immunitaire induite par le virus plus que par l'infection directe du système nerveux central.

ii. Impact de la consommation de drogue sur le système nerveux central : exemple des consommateurs de méthamphétamine

La méthamphétamine (METH) ou N-méthyl-amphétamine est une drogue de synthèse sympathicomimétique et psychoanaleptique, extrêmement addictive, composée d'éphédrine et de pseudoéphédrine. Il s'agit d'un stimulant puissant qui induit un état euphorique temporaire, mais qui entraîne aussi souvent des troubles du système nerveux central, tels que des psychoses, des dommages mentaux et des déficits neurodéveloppementaux¹⁸⁶.

Ces dernières années, la consommation de méthamphétamine a augmenté de façon spectaculaire. Aux États-Unis, environ 1,3 million de personnes de plus de 12 ans ont déclaré avoir consommé de la METH. Selon l'enquête des Nations unies de 2011, environ 2,5 % des Australiens ont essayé la METH, ce qui

est 3 à 5 fois plus élevé que les États-Unis, le Canada et le Royaume-Uni. En 2013, 7 % des Australiens de plus de 14 ans ont déclaré avoir consommé de la METH, dont 50 % de l'ice, la forme la plus pure de METH¹⁸⁷.

Les effets immédiats de la consommation aiguë ou à court terme de METH comprennent une augmentation de la vigilance, de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle, de la température corporelle et une perte d'appétit. L'utilisation régulière et à long terme de la méthamphétamine peut entraîner des caries dentaires graves, des infections, une perte de poids, la malnutrition, des lésions rénales, des lésions hépatiques, des problèmes respiratoires, la paranoïa, un comportement violent, la psychose, une anxiété et une dépression graves¹⁸⁸. Il est à noter que les symptômes peuvent persister pendant de nombreuses années après l'arrêt de la consommation de METH¹⁸⁷.

Des études cliniques ont montré que l'abus de METH à court et à long terme affecte un large éventail de processus biologiques, y compris le stress oxydatif, l'apoptose dans les lignées cellulaires dopaminergiques, le stress du réticulum endoplasmique et la désacétylation des microtubules¹⁸⁹.

Dans une étude publiée en 2020, une équipe de l'Université San Diego de Californie dirigée par Jason Dang a traité des organoïdes neuronaux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines avec de la METH pour étudier les effets des drogues sur le développement du cerveau du fœtus¹⁹⁰. L'analyse de l'expression génétique différentielle a montré que le traitement à la méthamphétamine entraînait la régulation à la hausse de l'expression des gènes liés à l'inflammation/aux réponses immunitaires et au stress oxydatif et une régulation à la baisse de l'expression des gènes impliqués dans la neurogenèse et le développement des organoïdes neuronaux. De plus, des astrocytes activés¹⁹¹ ainsi qu'une teneur élevée en facteurs liés à l'inflammation et à l'immunité, tels que IL-6 et NLRP1, ont été détectés dans les organoïdes traités à la METH. À noter qu'une activation des astrocytes se produit en réponse à de nombreuses pathologies du SNC, comme un accident vasculaire cérébral, un traumatisme, la croissance d'une tumeur ou une maladie neurodégénérative. Les mécanismes du processus d'activation des astrocytes restent assez énigmatiques et aboutissent à ce que l'on appelle la "gliose réactive", une réaction aux caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques¹⁹¹.

Ces résultats ont prouvé que le traitement à la méthamphétamine pouvait induire une neuroinflammation dans les organoïdes neuronaux et ont montré l'efficacité des organoïdes neuronaux comme modèle pour l'étude des maladies neuroinflammatoires complexes¹⁹². La possibilité de développer un environnement immunitaire dans les organoïdes neuronaux pourra permettre d'élargir encore leur application dans l'étude de la neuroinflammation et des réponses immunitaires associées¹⁹⁰.

VIII. Conclusion

Le développement des organoïdes neuronaux humains, comme modèles de recherche tridimensionnels *in vitro*, a permis de promouvoir la recherche en neuropathologie, et de dépasser de nombreux obstacles. L'utilisation des organoïdes pour la recherche permet d'espérer dans le futur une meilleure compréhension de pathologies à l'épidémiologie croissante, et offre un support robuste pour l'exploration de phénotypes pathologiques particuliers.

Toutefois de nombreux points restent à améliorer dans la conception et l'utilisation de ces outils, et d'importantes limites freinent encore la possibilité d'une utilisation optimale de cette découverte. Néanmoins, les organoïdes neuronaux humains constituent une avancée majeure pour la compréhension de la pathogenèse des troubles neurologiques, et ont ouvert la porte au développement de thérapies ciblées plus efficaces.

Dans les prochaines années, on peut imaginer que l'émergence croissante de nouvelles technologies favorisera l'optimisation de la technologie des organoïdes afin qu'elle puisse encore mieux servir la recherche scientifique.

Bibliographie

1. Mak, I. W., Evaniew, N. & Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* **6**, 114–118 (2014).
2. Papapetrou, E. P. Induced pluripotent stem cells, past and future. *Science* **353**, 991–992 (2016).
3. *Embryologie et histologie humaines, Gérard Tachdjian, 2016, Elsevier Masson.*
4. Cellules souches embryonnaires humaines · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-embryonnaires-humaines/>.
5. Cellules souches pluripotentes induites (IPS) · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-pluripotentes-induites-ips/>.
6. Stem Cells: from Embryonic Origin to Induced Pluripotency – An Overview. <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/august/stem-cells-from-embryonic-origin-to-induced-pluripotency-an-overview/>.
7. Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G. & Song, H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* **19**, 672–682 (2009).
8. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science* **255**, 1707–1710 (1992).
9. Kaminska, A., Radoszkiewicz, K., Rybkowska, P., Wedzinska, A. & Sarnowska, A. Interaction of Neural Stem Cells (NSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) as a Promising Approach in Brain Study and Nerve Regeneration. *Cells* **11**, 1464 (2022).
10. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
11. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
12. Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1276–1284 (2008).
13. Staerk, J. *et al.* Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **7**, 20–24 (2010).
14. Zhou, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat. Protoc.* **7**, 2080–2089 (2012).
15. Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. *www.rndsystems.com* <https://www.rndsystems.com/resources/articles/differentiation-potential-induced-pluripotent-stem-cells>.
16. Sokoloff, L. *The metabolism of the central nervous system in vivo.* (1960).
17. Netter, F. H. *Atlas of Human Anatomy Including Student Consult Interactive Ancillaries and Guides.* (2014).
18. Cerveau : comprendre le fonctionnement du cerveau humain. *Institut du Cerveau* <https://institutducerveau-icm.org/fr/actualite/comprendre-le-cerveau-et-son-fonctionnement/>.
19. Jeans, A. & Esiri, M. Brain histology. *Pract. Neurol.* **8**, 303–310 (2008).
20. Kim, Y., Park, J. & Choi, Y. K. The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review. *Antioxidants* **8**, 121 (2019).
21. Colonna, M. & Butovsky, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 441–468 (2017).
22. Jiang, X. & Nardelli, J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol. Dis.* **92**, 3–17 (2016).
23. 35.1 Neurons and Glial Cells - Biology | OpenStax.
24. Gilbert, S. F. & Gilbert, S. F. *Developmental Biology.* (Sinauer Associates, 2000).
25. 28.2 Embryonic Development - Anatomy and Physiology | OpenStax. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/28-2-embryonic-development?query=notochord&target=%7B%22index%22%3A0%2C%22type%22%3A%22search%22%7D#fs-id1632656>.
26. Corallo, D., Trapani, V. & Bonaldo, P. The notochord: structure and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 2989–3008 (2015).

27. Gerhard, D. Neuroscience. 5th Edition. *Yale J. Biol. Med.* **86**, 113 (2013).
28. Neurogenèse adulte chez l'humain : la fin d'une polémique ? *CNRS Le journal*
<https://lejournel.cnrs.fr/nos-blogs/aux-frontieres-du-cerveau/neurogenese-adulte-chez-lhumain-la-fin-dune-polemique-0>.
29. Pollerberg, G. E., Thelen, K., Theiss, M. O. & Hochlehnert, B. C. The role of cell adhesion molecules for navigating axons: Density matters. *Mech. Dev.* **130**, 359–372 (2013).
30. Koh, S.-H. & Park, H.-H. Neurogenesis in Stroke Recovery. *Transl. Stroke Res.* **8**, 3–13 (2017).
31. Boldrini, M. *et al.* Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* **22**, 589–599.e5 (2018).
32. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**, 1247125 (2014).
33. Wang, F. *et al.* Reciprocal interactions between β 1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: A different perspective in epithelial biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14821–14826 (1998).
34. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
35. Hodge, R. D. *et al.* Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* **573**, 61–68 (2019).
36. Oberheim, N. A. *et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 3276–3287 (2009).
37. Boldog, E. *et al.* Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat. Neurosci.* **21**, 1185–1195 (2018).
38. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**, 140–143 (1906).
39. Wilson, H. V. A New Method by Which Sponges May Be Artificially Reared. *Science* **25**, 912–915 (1907).
40. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.* **145**, 204–220 (1977).
41. Li, M. L. *et al.* Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 136–140 (1987).
42. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7634–7638 (1981).
43. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
44. O'Connor, N., Mulliken, J., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS. *The Lancet* **317**, 75–78 (1981).
45. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
46. Simian, M. & Bissell, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* **216**, 31–40 (2017).
47. Eiraku, M. *et al.* Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* **3**, 519–532 (2008).
48. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **9**, 2329–2340 (2014).
49. Chang, C. & Hemmati-Brivanlou, A. Cell fate determination in embryonic ectoderm. *J. Neurobiol.* **36**, 128–151 (1998).
50. Quadrato, G. *et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* **545**, 48–53 (2017).
51. Quadrato, G., Brown, J. & Arlotta, P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. *Nat. Med.* **22**, 1220–1228 (2016).
52. Velasco, S. *et al.* Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human

- cerebral cortex. *Nature* **570**, 523–527 (2019).
53. Bhaduri, A. *et al.* Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature* **578**, 142–148 (2020).
 54. Paşca, A. M. *et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat. Methods* **12**, 671–678 (2015).
 55. Sloan, S. A. *et al.* Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron* **95**, 779-790.e6 (2017).
 56. Madhavan, M. *et al.* Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat. Methods* **15**, 700–706 (2018).
 57. Cunningham, C. L., Martínez-Cerdeño, V. & Noctor, S. C. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **33**, 4216–4233 (2013).
 58. Ormel, P. R. *et al.* Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat. Commun.* **9**, 4167 (2018).
 59. Chambers, S. M. *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275–280 (2009).
 60. Abud, E. M. *et al.* iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron* **94**, 278-293.e9 (2017).
 61. Woodbury, M. E. & Ikezu, T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **9**, 92–101 (2014).
 62. Benito-Kwiecinski, S. & Lancaster, M. A. Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **12**, a035709 (2020).
 63. Renner, M. *et al.* Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J.* **36**, 1316–1329 (2017).
 64. Jo, J. *et al.* Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell* **19**, 248–257 (2016).
 65. Chavali, V. R. M. *et al.* Dual SMAD inhibition and Wnt inhibition enable efficient and reproducible differentiations of induced pluripotent stem cells into retinal ganglion cells. *Sci. Rep.* **10**, 11828 (2020).
 66. Qian, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **165**, 1238–1254 (2016).
 67. Xiang, Y. *et al.* Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell* **21**, 383-398.e7 (2017).
 68. Sakaguchi, H. *et al.* Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat. Commun.* **6**, 8896 (2015).
 69. Xiang, Y. *et al.* hESC-Derived Thalamic Organoids Form Reciprocal Projections When Fused with Cortical Organoids. *Cell Stem Cell* **24**, 487-497.e7 (2019).
 70. Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K. & Sasai, Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* **10**, 537–550 (2015).
 71. Nishimura, T., Utsunomiya, Y., Hoshikawa, M., Ohuchi, H. & Itoh, N. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1444**, 148–151 (1999).
 72. Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J. & Knoblich, J. A. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods* **14**, 743–751 (2017).
 73. Cartographie des sites d’accessibilité de la chromatine : ATAC seq. *France Génomique* <https://www.france-genomique.org/expertises-technologiques/regulome/cartographie-des-sites-daccessibilite-de-la-chromatine-atac-seq/>.
 74. Nasr, B. *et al.* Self-Organized Nanostructure Modified Microelectrode for Sensitive Electrochemical Glutamate Detection in Stem Cells-Derived Brain Organoids. *Biosensors* **8**, 14 (2018).
 75. Leonzino, M. *et al.* The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. *Cell Rep.* **15**, 96–103 (2016).

76. Huttenlocher, P. R. & Dabholkar, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **387**, 167–178 (1997).
77. Giandomenico, S. L. *et al.* Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat. Neurosci.* **22**, 669–679 (2019).
78. Zhao, X. *et al.* Review on the Vascularization of Organoids and Organoids-on-a-Chip. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 223 (2021).
79. Paredes, I., Himmels, P. & Ruiz de Almodóvar, C. Neurovascular Communication during CNS Development. *Dev. Cell* **45**, 10–32 (2018).
80. Mansour, A. A. *et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* **36**, 432–441 (2018).
81. Pham, M. T. *et al.* Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport* **29**, 588–593 (2018).
82. Ahn, Y. *et al.* Human Blood Vessel Organoids Penetrate Human Cerebral Organoids and Form a Vessel-Like System. *Cells* **10**, 2036 (2021).
83. Shi, Y. *et al.* Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development in vivo. *PLoS Biol.* **18**, e3000705 (2020).
84. Cakir, B. *et al.* Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat. Methods* **16**, 1169–1175 (2019).
85. Lee, S. *et al.* Direct Reprogramming of Human Dermal Fibroblasts Into Endothelial Cells Using ER71/ETV2. *Circ. Res.* **120**, 848–861 (2017).
86. Jayaraman, D., Bae, B.-I. & Walsh, C. A. The Genetics of Primary Microcephaly. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **19**, 177–200 (2018).
87. Bond, J. *et al.* A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* **37**, 353–355 (2005).
88. Gruber, R. *et al.* MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1325–1334 (2011).
89. Yingling, J. *et al.* Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* **132**, 474–486 (2008).
90. Gabriel, E. *et al.* CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J.* **35**, 803–819 (2016).
91. Li, R. *et al.* Recapitulating cortical development with organoid culture in vitro and modeling abnormal spindle-like (ASPM related primary) microcephaly disease. *Protein Cell* **8**, 823–833 (2017).
92. Zhang, W. *et al.* Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62–CEP170–KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors. *Nat. Commun.* **10**, 2612 (2019).
93. Javed, A. O. *et al.* Microcephaly Modeling of Kinetochore Mutation Reveals a Brain-Specific Phenotype. *Cell Rep.* **25**, 368–382.e5 (2018).
94. Dhaliwal, N., Choi, W. W. Y., Muffat, J. & Li, Y. Modeling PTEN overexpression-induced microcephaly in human brain organoids. *Mol. Brain* **14**, 131 (2021).
95. Esk, C. *et al.* A human tissue screen identifies a regulator of ER secretion as a brain-size determinant. *Science* **370**, 935–941 (2020).
96. Fair, S. R. *et al.* Cerebral organoids containing an AUTS2 missense variant model microcephaly. *Brain* **146**, 387–404 (2022).
97. Karzbrun, E. & Reiner, O. Brain Organoids—A Bottom-Up Approach for Studying Human Neurodevelopment. *Bioengineering* **6**, 9 (2019).
98. Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R. & Ledbetter, D. H. Lissencephaly: A Human Brain Malformation Associated With Deletion of the LIS1 Gene Located at Chromosome 17p13. *JAMA* **270**, 2838–2842 (1993).
99. Reiner, O. & Sapir, T. LIS1 functions in normal development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 951–956 (2013).
100. Keays, D. A. *et al.* Mutations in α -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell* **128**, 45–57 (2007).
101. Pilz, D. T. *et al.* LIS1 and XLIS (DCX) Mutations Cause Most Classical Lissencephaly, but

- Different Patterns of Malformation. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 2029–2037 (1998).
102. Strømme, P. *et al.* Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat. Genet.* **30**, 441–445 (2002).
 103. Vajsar, J. & Schachter, H. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **1**, 29 (2006).
 104. Saito, K. Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
 105. Shenoy, A. M. *et al.* Muscle-Eye-Brain Disease. *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* **11**, 124–126 (2010).
 106. Bershteyn, M. *et al.* Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *Cell Stem Cell* **20**, 435–449.e4 (2017).
 107. Iefremova, V. *et al.* An Organoid-Based Model of Cortical Development Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome. *Cell Rep.* **19**, 50–59 (2017).
 108. Qian, X., Song, H. & Ming, G. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Dev. Camb. Engl.* **146**, dev166074 (2019).
 109. Li, Y. *et al.* Induction of expansion and folding in human cerebral organoids. *Cell Stem Cell* **20**, 385–396.e3 (2017).
 110. Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Cohen, S. R., Hanna, J. H. & Reiner, O. Human Brain Organoids on a Chip Reveal the Physics of Folding. *Nat. Phys.* **14**, 515–522 (2018).
 111. Rothenbücher, T. S. P. *et al.* Next generation human brain models: engineered flat brain organoids featuring gyrification. *Biofabrication* **13**, 011001 (2021).
 112. Lancaster, M. A. Crinkle-Cut Brain Organoids. *Cell Stem Cell* **22**, 616–618 (2018).
 113. Tallinen, T., Chung, J. Y., Biggins, J. S. & Mahadevan, L. Gyrification from constrained cortical expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12667–12672 (2014).
 114. Tallinen, T. *et al.* On the growth and form of cortical convolutions. *Nat. Phys.* **12**, 588–593 (2016).
 115. La trisomie 21. *Institut Lejeune* <https://www.institulejeune.org/comprendre/la-trisomie-21.html>.
 116. de Graaf, G., Buckley, F. & Skotko, B. G. Estimation of the number of people with Down syndrome in Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* **29**, 402–410 (2021).
 117. Gough, G. *et al.* Chapter 3 - Modeling Down syndrome in cells: From stem cells to organoids. in *Progress in Brain Research* (ed. Dierssen, M.) vol. 251 55–90 (Elsevier, 2020).
 118. Tang, X.-Y. *et al.* DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. *J. Clin. Invest.* **131**, e135763.
 119. Xu, L. *et al.* Abnormal mitochondria in Down syndrome iPSC-derived GABAergic interneurons and organoids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1868**, 166388 (2022).
 120. Xu, R. *et al.* OLIG2 Drives Abnormal Neurodevelopmental Phenotypes in Human iPSC-Based Organoid and Chimeric Mouse Models of Down Syndrome. *Cell Stem Cell* **24**, 908–926.e8 (2019).
 121. Oliver, C. & Holland, A. J. Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review. *Psychol. Med.* **16**, 307–322 (1986).
 122. Holland, A. J., Hon, J., Huppert, F. A., Stevens, F. & Watson, P. Population-based study of the prevalence and presentation of dementia in adults with Down's syndrome. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **172**, 493–498 (1998).
 123. Gonzalez, C. *et al.* Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Mol. Psychiatry* **23**, 2363–2374 (2018).
 124. Zhao, H. H. & Haddad, G. G. Alzheimer's disease like neuropathology in Down syndrome cortical organoids. *Front. Cell. Neurosci.* **16**, 1050432 (2022).
 125. Fernandez Bessone, I. *et al.* DYRK1A Regulates the Bidirectional Axonal Transport of APP in Human-Derived Neurons. *J. Neurosci.* **42**, 6344–6358 (2022).
 126. Campbell, N. B., Patel, Y., Moore, T. L., Medalla, M. & Zeldich, E. Extracellular Vesicle Treatment Alleviates Neurodevelopmental and Neurodegenerative Pathology in Cortical Spheroid Model of Down Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 3477 (2023).
 127. Huang, T., Fakurazi, S., Cheah, P.-S. & Ling, K.-H. REST Targets JAK–STAT and HIF-1

- Signaling Pathways in Human Down Syndrome Brain and Neural Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9980 (2023).
128. Elgueta, D., Murgas, P., Riquelme, E., Yang, G. & Cancino, G. I. Consequences of Viral Infection and Cytokine Production During Pregnancy on Brain Development in Offspring. *Front. Immunol.* **13**, 816619 (2022).
129. Zika (maladie à virus). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>.
130. Garcez, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* **352**, 816–818 (2016).
131. Dang, J. *et al.* Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* **19**, 258–265 (2016).
132. Infection à cytomégalovirus (CMV) - symptômes, causes, traitements et prévention. VIDAL <https://www.vidal.fr/maladies/douleurs-fievres/infection-a-cytomegalovirus-cmv.html>.
133. Zhang, X.-Y. & Fang, F. Congenital human cytomegalovirus infection and neurologic diseases in newborns. *Chin. Med. J. (Engl.)* **132**, 2109–2118 (2019).
134. Brown, R. M. *et al.* Human Cytomegalovirus Compromises Development of Cerebral Organoids. *J. Virol.* **93**, e00957-19 (2019).
135. Sison, S. L. *et al.* Human Cytomegalovirus Disruption of Calcium Signaling in Neural Progenitor Cells and Organoids. *J. Virol.* **93**, e00954-19 (2019).
136. Sakao-Suzuki, M. *et al.* Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **1**, 570–588 (2014).
137. Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E. & Pereira, L. Human Cytomegalovirus Infection of Placental Cytotrophoblasts In Vitro and In Utero: Implications for Transmission and Pathogenesis. *J. Virol.* **74**, 6808–6820 (2000).
138. Un sédatif d'origine allemande, vendu dans divers pays est responsable de milliers de malformations congénitales. *Le Monde.fr* (1962).
139. Peut-on se passer des modèles animaux? *CNRS Le journal* <https://lejournel.cnrs.fr/articles/peut-se-passer-des-modeles-animaux>.
140. Trente ans après... Les enfants du distilbène. *Le Monde.fr* (1983).
141. Rapport sur les pistes de recherche concernant les effets à court et long termes de l'exposition intra-utérine à la dépakine et autres antiépileptiques - Septembre 2021 · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/rapport/rapport-sur-les-pistes-de-recherche-concernant-les-effets-a-court-et-long-termes-de-lexposition-intra-uterine-a-la-depakine-et-autres-antiepileptiques/>.
142. Zhong, X. *et al.* Antidepressant Paroxetine Exerts Developmental Neurotoxicity in an iPSC-Derived 3D Human Brain Model. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 25 (2020).
143. Résumé des caractéristiques du produit - SEVORANE, liquide pour inhalation par vapeur - Base de données publique des médicaments. <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=66282739&typedoc=R>.
144. Lee, J. A. *et al.* Effects of Sevoflurane Exposure on Fetal Brain Development Using Cerebral Organoids. *J. Mol. Neurosci.* **72**, 2440–2450 (2022).
145. Dexaméthasone : substance active à effet thérapeutique. VIDAL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/dexamethasone-1201.html>.
146. Cruceanu, C. *et al.* Cell-Type-Specific Impact of Glucocorticoid Receptor Activation on the Developing Brain: A Cerebral Organoid Study. *Am. J. Psychiatry* **179**, 375–387 (2022).
147. Santé Publique France. Baromètre santé 2017. Alcool et tabac. Consommation d'alcool et de tabac pendant la grossesse. *santepubliquefrance.fr* <https://www.santepubliquefrance.fr/import/barometre-sante-2017.-alcool-et-tabac.-consommation-d-alcool-et-de-tabac-pendant-la-grossesse>.
148. Valero De Bernabé, J. *et al.* Risk factors for low birth weight: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **116**, 3–15 (2004).
149. Miyake, Y., Tanaka, K., Okubo, H., Sasaki, S. & Arakawa, M. Alcohol consumption during pregnancy and birth outcomes: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *BMC Pregnancy Childbirth* **14**, 79 (2014).
150. Feodor Nilsson, S., Andersen, P. K., Strandberg-Larsen, K. & Nybo Andersen, A.-M. Risk

- factors for miscarriage from a prevention perspective: a nationwide follow-up study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **121**, 1375–1384 (2014).
151. DEJONG, K., OLYAEI, A. & LO, J. O. Alcohol Use in Pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **62**, 142–155 (2019).
152. Arzua, T. *et al.* Modeling alcohol-induced neurotoxicity using human induced pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoids. *Transl. Psychiatry* **10**, 347 (2020).
153. Zhu, Y. *et al.* Probing impaired neurogenesis in human brain organoids exposed to alcohol. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **9**, 968–978 (2017).
154. Gong, Y. *et al.* Ethanol Causes Cell Death and Neuronal Differentiation Defect During Initial Neurogenesis of the Neural Retina by Disrupting Calcium Signaling in Human Retinal Organoids. *Stem Cell Rev. Rep.* (2023) doi:10.1007/s12015-023-10604-3.
155. Malloy, M. H., Hoffman, H. J. & Peterson, D. R. Sudden infant death syndrome and maternal smoking. *Am. J. Public Health* **82**, 1380–1382 (1992).
156. Castles, A., Adams, E. K., Melvin, C. L., Kelsch, C. & Boulton, M. L. Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses. *Am. J. Prev. Med.* **16**, 208–215 (1999).
157. Wang, Y., Wang, L., Zhu, Y. & Qin, J. Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure. *Lab. Chip* **18**, 851–860 (2018).
158. Rédacteur. La fabrique de micro-organes humains. *Sciences et Avenir* https://www.sciencesetavenir.fr/sante/la-fabrique-de-micro-organes-humains_30005 (2016).
159. Ghosh, M. C., Zhang, D.-L. & Rouault, T. A. Iron misregulation and neurodegenerative disease in mouse models that lack iron regulatory proteins. *Neurobiol. Dis.* **81**, 66–75 (2015).
160. Keren-Shaul, H. *et al.* A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer’s Disease. *Cell* **169**, 1276–1290.e17 (2017).
161. La démence. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
162. World Alzheimer Report 2021 | Portail pour la connaissance et l’action. <https://www.knowledge-action-portal.com/fr/node/6264>.
163. Karlawish, J., Jack, C. R., Rocca, W. A., Snyder, H. M. & Carrillo, M. C. Alzheimer’s disease: The next frontier-Special Report 2017. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **13**, 374–380 (2017).
164. Weller, J. & Budson, A. Current understanding of Alzheimer’s disease diagnosis and treatment. *F1000Research* **7**, F1000 Faculty Rev-1161 (2018).
165. Chin, J. Selecting a mouse model of Alzheimer’s disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **670**, 169–189 (2011).
166. Choi, S. H. & Tanzi, R. E. iPSCs to the rescue in Alzheimer’s research. *Cell Stem Cell* **10**, 235–236 (2012).
167. Choi, S. H. *et al.* A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer’s disease. *Nature* **515**, 274–278 (2014).
168. Nakamura, A. *et al.* High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer’s disease. *Nature* **554**, 249–254 (2018).
169. Kelleher, R. J. & Shen, J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 629–631 (2017).
170. D, L.-L. & C, G.-B. Neuron-intrinsic origin of hyperexcitability during early pathogenesis of Alzheimer’s disease: An Editorial Highlight for ‘Hippocampal hyperactivity in a rat model of Alzheimer’s disease’ on <https://doi.org/10.1111/jnc.15323>. *J. Neurochem.* **158**, (2021).
171. Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A. & Svensson, E. Pain in Parkinson’s disease: Prevalence and characteristics. *Pain* **141**, 173–177 (2009).
172. Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S. & Bloem, B. R. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J. Park. Dis.* **8**, S3–S8 (2018).
173. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson’s disease. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 896–912 (2015).
174. Gibb, W. R. & Lees, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson’s disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **51**, 745–752 (1988).
175. Houlden, H. & Singleton, A. B. The genetics and neuropathology of Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **124**, 325–338 (2012).
176. Benson, D. L., Matikainen-Ankney, B. A., Hussein, A. & Huntley, G. W. Functional and

behavioral consequences of Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutation. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 1697–1705 (2018).

177. Kim, H. *et al.* Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Rep.* **12**, 518–531 (2019).

178. Krenn, V. *et al.* Organoid modeling of Zika and Herpes Simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. *Cell Stem Cell* **28**, 1362-1379.e7 (2021).

179. Qiao, H. *et al.* Herpes simplex virus type 1 infection leads to neurodevelopmental disorder-associated neuropathological changes. *PLoS Pathog.* **16**, e1008899 (2020).

180. D'Aiuto, L. *et al.* Modeling Herpes Simplex Virus 1 Infections in Human Central Nervous System Neuronal Cells Using Two- and Three-Dimensional Cultures Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Virol.* **93**, e00111-19 (2019).

181. Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1257–1260 (1971).

182. Barreras, P. *et al.* A human-derived 3D brain organoid model to study JC virus infection. *J. Neurovirol.* **28**, 17–26 (2022).

183. Misra, S. *et al.* Frequency of Neurologic Manifestations in COVID-19. *Neurology* **97**, e2269–e2281 (2021).

184. Pellegrini, L. *et al.* SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* **27**, 951-961.e5 (2020).

185. Jacob, F. *et al.* Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism Predominates in Choroid Plexus Epithelium. *Cell Stem Cell* **27**, 937-950.e9 (2020).

186. Weafer, J., Van Hedger, K., Keedy, S. K., Nwaokolo, N. & de Wit, H. Methamphetamine acutely alters frontostriatal resting state functional connectivity in healthy young adults. *Addict. Biol.* e12775 (2019) doi:10.1111/adb.12775.

187. Prakash, M. D. *et al.* Methamphetamine: Effects on the brain, gut and immune system. *Pharmacol. Res.* **120**, 60–67 (2017).

188. Shetty, V. *et al.* The relationship between methamphetamine use and increased dental disease. *J. Am. Dent. Assoc.* **141**, 307–318 (2010).

189. Chang, L., Alicata, D., Ernst, T. & Volkow, N. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addict. Abingdon Engl.* **102 Suppl 1**, 16–32 (2007).

190. Dang, J. *et al.* Glial cell diversity and methamphetamine-induced neuroinflammation in human cerebral organoids. *Mol. Psychiatry* **26**, 1194–1207 (2021).

191. Pekny, M. & Nilsson, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**, 427–434 (2005).

192. Du, S.-H. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Mediates Methamphetamine-Induced Neuroinflammation through Caspase-11 Signaling Pathway in Astrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 409 (2017).



FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : Fischer

Prénom : Marie

Née le : 28/09/1998 à Schiltigheim (67)

TITRE DE LA THÈSE :

LA PLACE DES ORGANOÏDES NEURONAUX HUMAINS DANS LA RECHERCHE
EN NEURODÉVELOPPEMENT ET NEUROPATHOLOGIE

Date et lieu de la soutenance : le 8 avril 2024 à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
N° d'ordre :

RESUMÉ : Mis au point pour la première fois en 2014, les organoïdes neuronaux humains sont de nouveaux types de cultures cellulaires tridimensionnelles, conçues pour récapituler les caractéristiques essentielles (fonction, organisation, composition) du système nerveux central humain. Ils constituent ainsi un nouveau modèle de recherche pour une compréhension approfondie des mécanismes en jeu dans le neurodéveloppement et pour l'étude des neuropathologies. Cette thèse présente cette nouvelle technologie, en fournissant un panorama détaillé de son application et de ses contributions dans la recherche scientifique au cours des dernières années.

MOTS-CLÉS : organoïde, cellule souche, culture cellulaire, modèle cellulaire, neurodéveloppement, neuropathologie, cerveau, système nerveux central, neurone

Nom du Directeur de la Thèse : Maxime Lehmann