

Atelier « Organoïdes » : Criblage à haut-débit sur les tumoroides - état de l'art et défis

Louis-Bastien WEISWALD

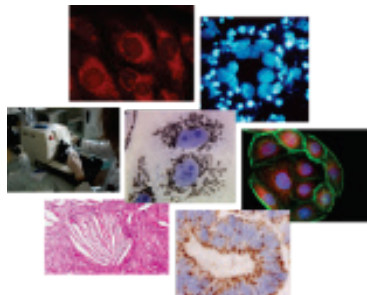
lb.weiswald@baclesse.unicancer.fr

Inserm U1086 ANTICIPE

Unité de Recherche Interdisciplinaire pour la
Prévention et le Traitement des Cancers

Plateforme ORGAPRED – US PLATON

Plateforme « organoïdes tumoraux à visée
prédictive et de recherche »






Les organoïdes

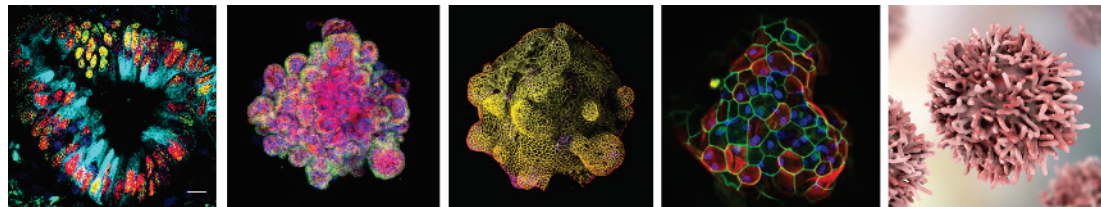
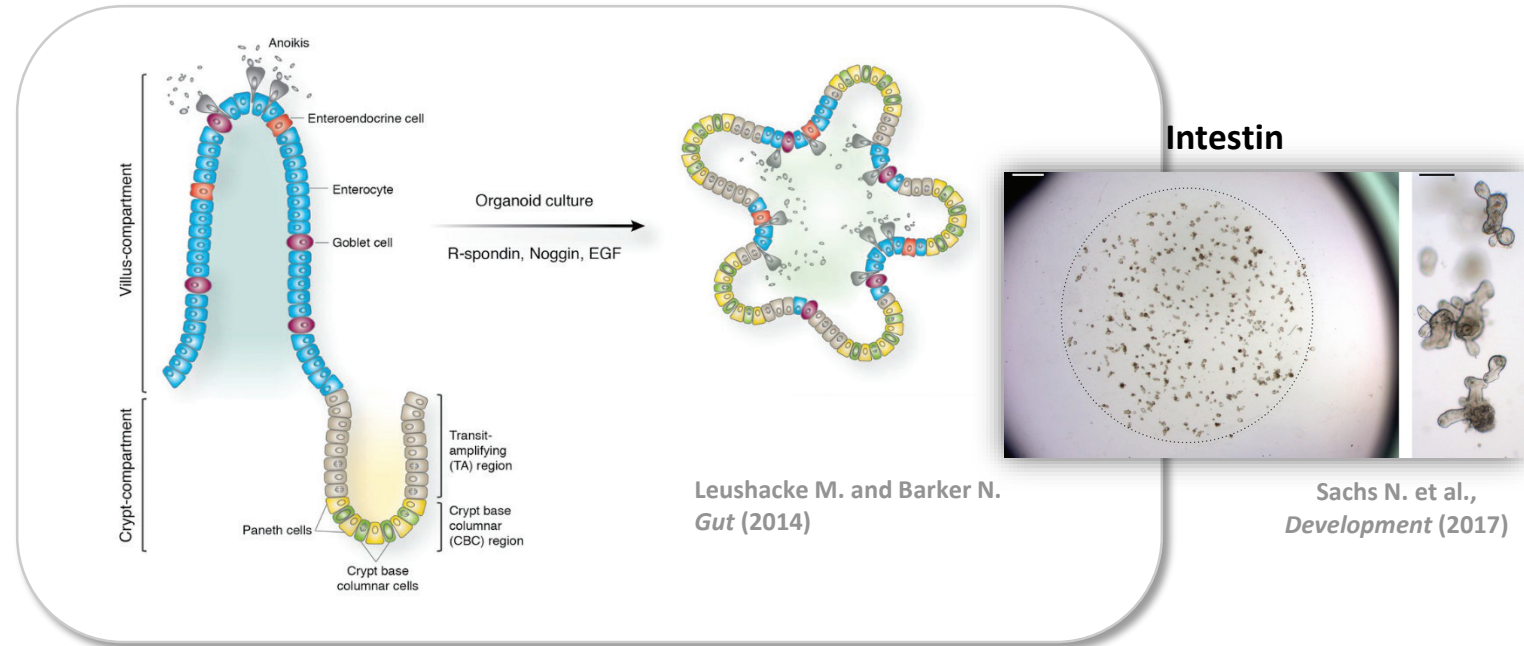
Structures multicellulaires 3D

Reproduisent *in vitro* la **micro-anatomie de leur organe d'origine**

Propriétés **d'auto-renouvellement** et de **différenciation**

- **Auto-organisation** dans l'espace de façon similaire à l'organe d'origine
- Différents types cellulaires spécifiques de l'organe
- Fonction(s) spécifique(s) de l'organe

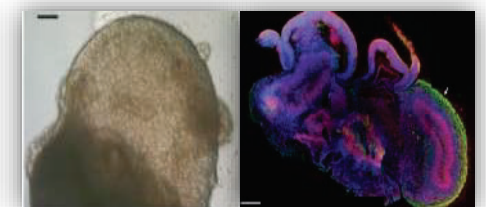
Méthode et milieux de culture
tissu-spécifiques



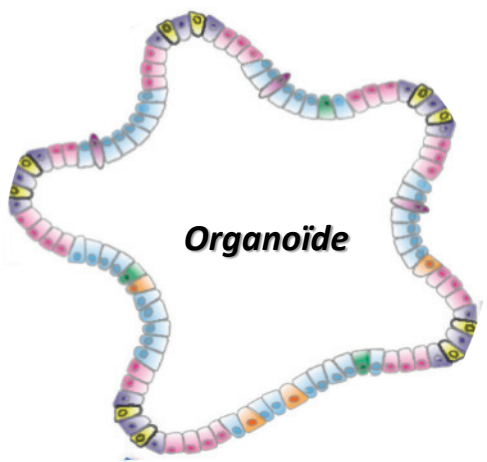
Poumon



Cerveau

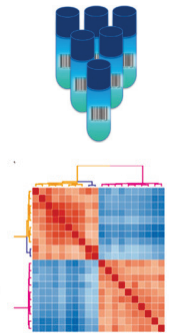


Les organoïdes : applications

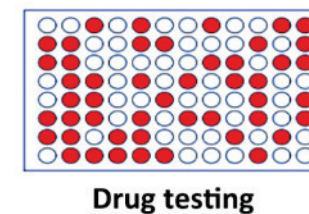
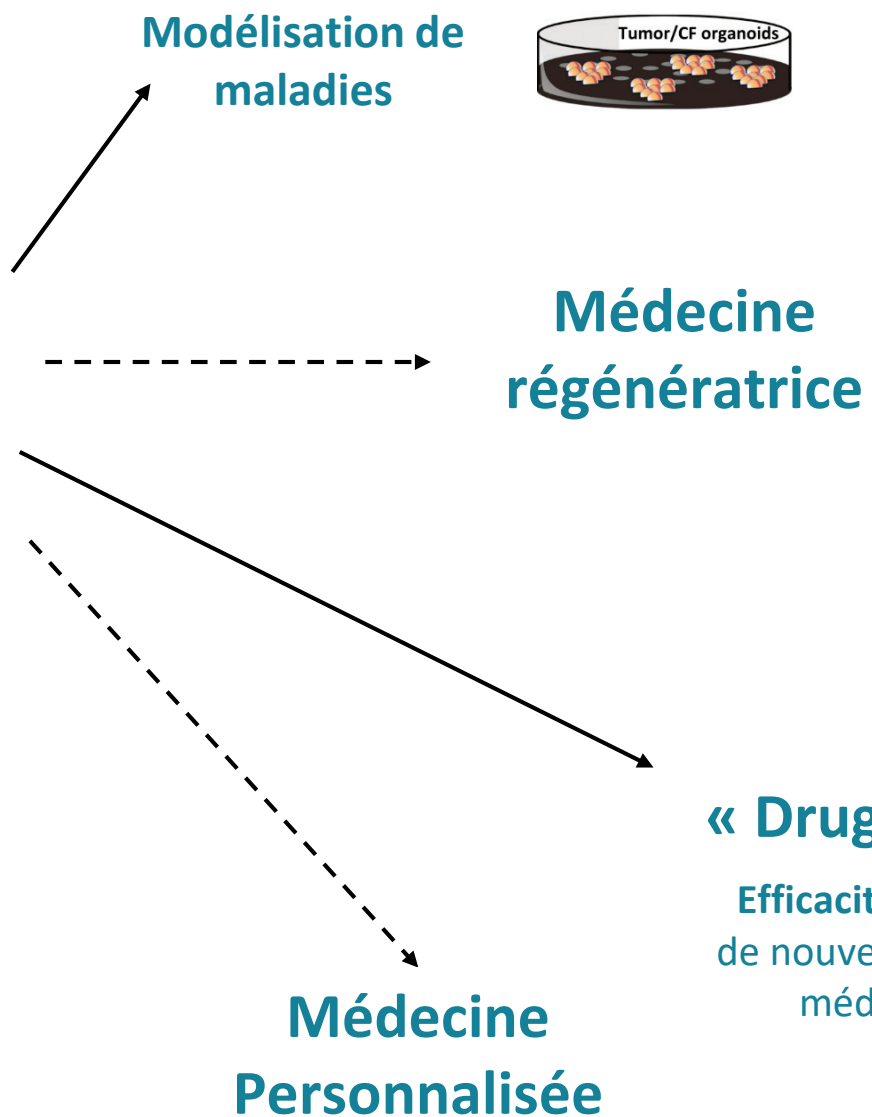


Organoïde

Biobanques d'organoïdes de « patients » & Caractérisation moléculaire
(transcriptome, protéome, épigénome, métabolome)

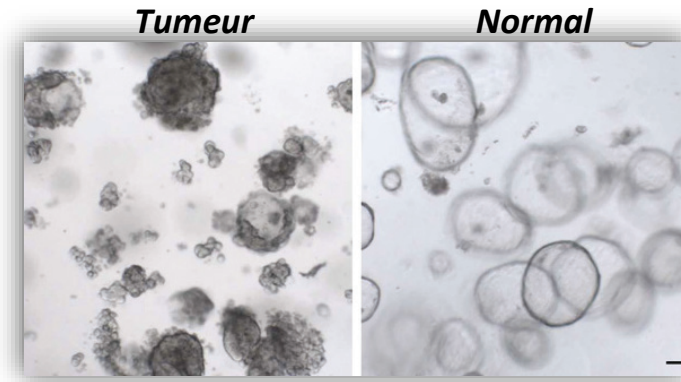
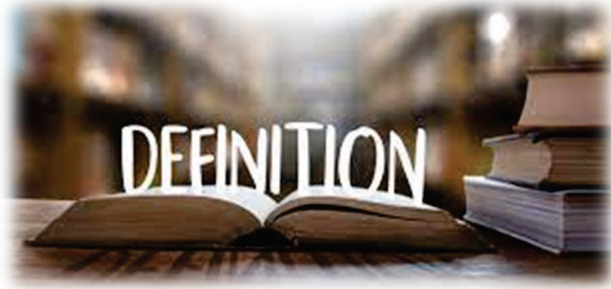


D'après Dutta D. et al., *Trends Mol Med* (2017)



Les organoïdes tumoraux (tumoroides)

Organoïdes gastro-intestinaux



Bartfeld et al., *Gastroenterology* (2015)



Définition des organoïdes normaux non applicable aux organoïdes de tumeurs!

➤ **Tumor organoids** (*Mark Rubin, Englander Institute for Precision Medicine, New York*)

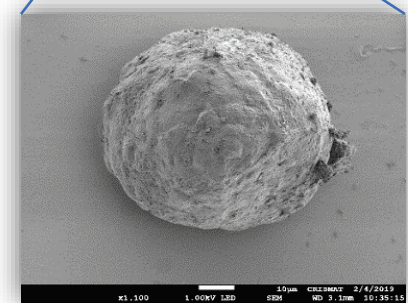
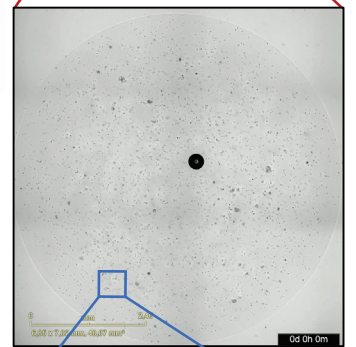
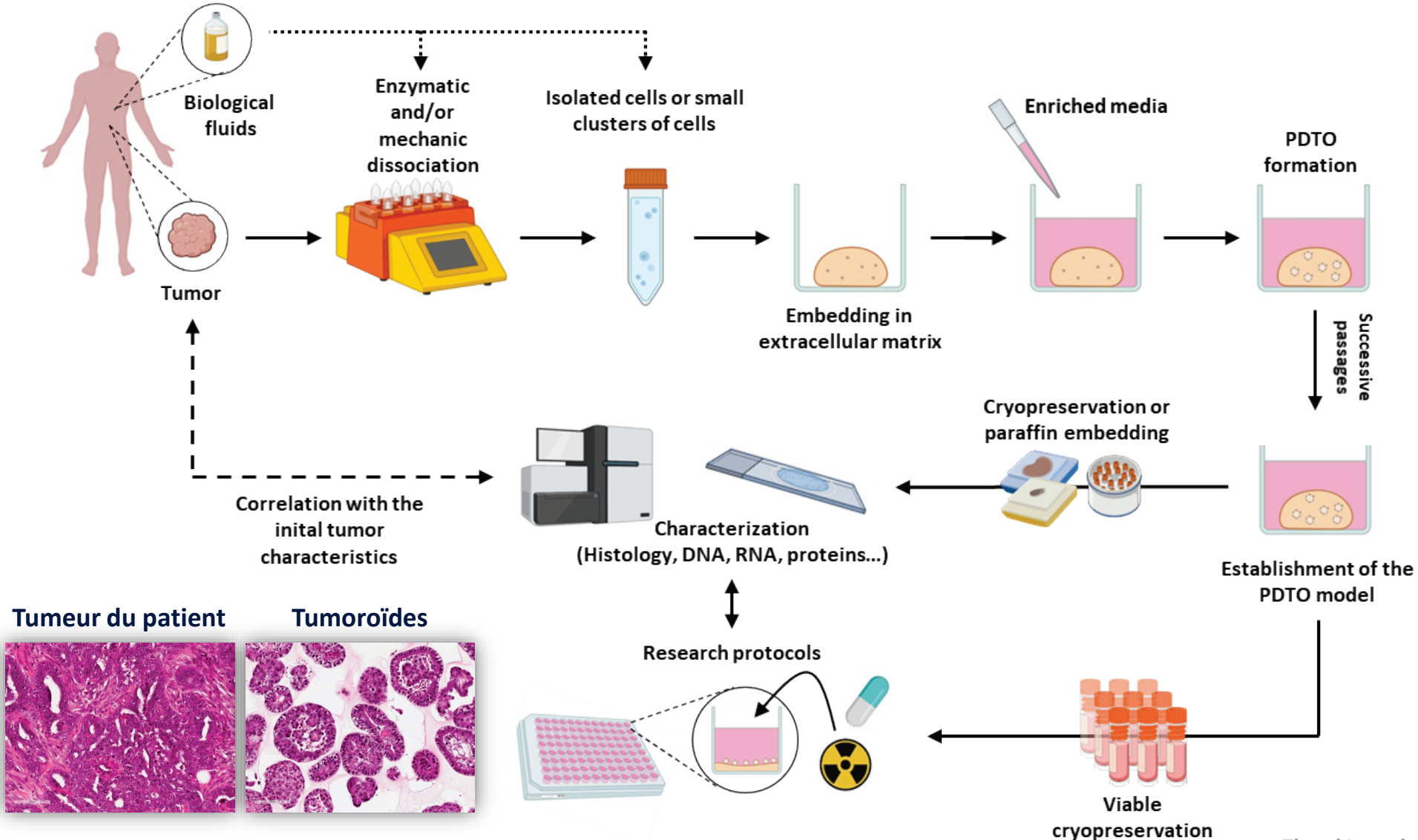
- ❖ Cellules tumorales dérivées de pièces opératoires, de biopsies, ou de fluides de patients
- ❖ Prolifèrent le plus souvent sous forme de sphères
- ❖ Conservation en culture pendant au moins 5 passages
- ❖ Cryopréservation



= Tumoroides

Les organoïdes tumoraux (ou tumoroides)

❖ Dérivés de tous types de tumeurs



Aperçu des panels d'organoïdes tumoraux disponibles

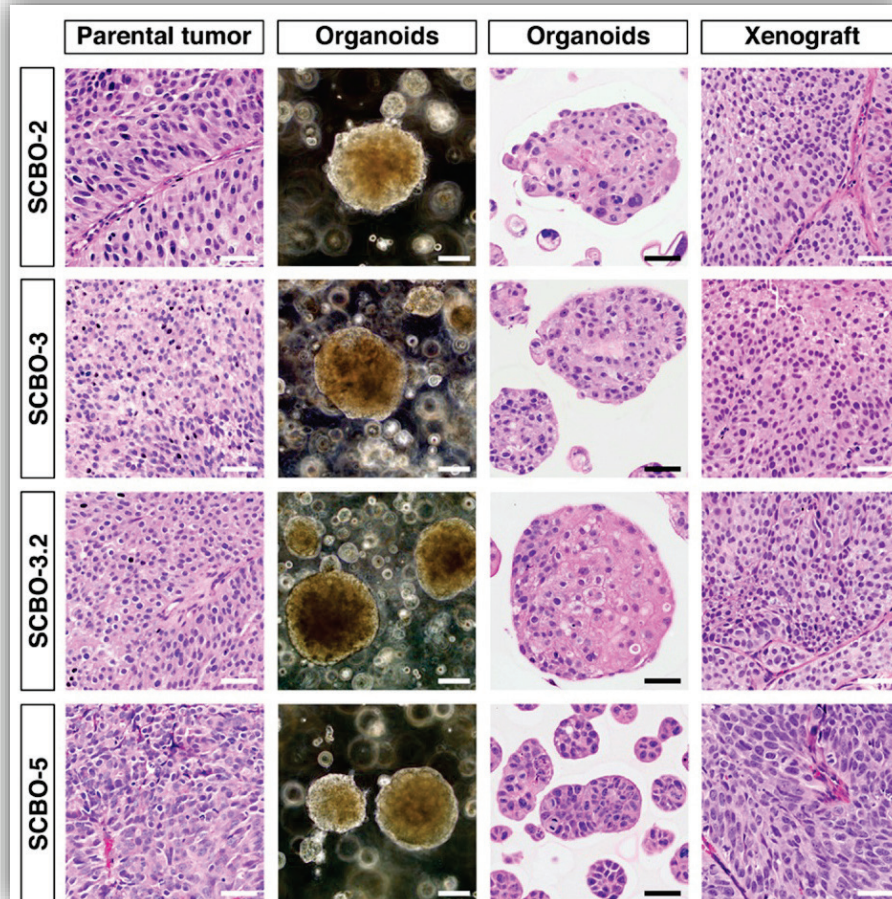
Système	Type de cancer	Taux d'établissement	Références
Digestif	Cancer du pancréas	62% (52/83)	Drihuis E. et al., <i>PNAS</i> 2019
		75% (103/138)	Tiriac H. et al., <i>Cancer Discov</i> 2018
		85% (17/20)	Huang L. et al., <i>Nat Med</i> 2015 Boj SF. et al., <i>Cell</i> 2015
	Cancer colorectal	100%	Fujii M. et al., <i>Cell Stem Cell</i> 2016
		~ 90% (22/27)	van de Wetering M. et al., <i>Cell</i> 2015
	Carcinome hépatocellulaire	26% (10/38)	Nuciforo S. et al., <i>Cell Rep</i> 2018
	Cancer gastrique	100%	Broutier L. et al., <i>Nat Med</i> 2017
		50%	Yan HHN. et al., <i>Cell Stem Cell</i> 2018
Cancer gastrointestinal métastatique	71% (10/14)	Gao M. et al., <i>Ann Surg Oncol</i> 2018	
	70% (> 100)	Vlachogiannis G. et al., <i>Science</i> 2018	
Cancer de l'œsophage	76% (13/17)	Buzzelli JN. et al., <i>Stem Cell Res</i> 2018	
Cancer appendiculaire	31% (10/32)	Li X. et al., <i>Nat Comm</i> 2018	
Respiratoire	Cancer du poumon	75% (9/12)	Votanopoulos Kl. et al., <i>Ann Surg Oncol</i> 2019
	Cancer du poumon non à petites cellules (Tumeur primitive & Métastases)	88% (14/16)	Sachs N. et al., <i>Embo j</i> 2019
		71.43% (10/14)	Li YF. et al., <i>Neoplasma</i> 2020
	Mésothéliome	100% (3/3)	Zhang Z. et al., <i>Plos One</i> 2018
		28% (5/18)	Sachs N. et al., <i>Embo j</i> 2019
Urinaire	100% (2/2)	Mazzocchi AR. et al., <i>Sci Rep</i> 2018	
Reproducteur	Cancer de la prostate (Tumeur primitive & Métastases)	16% (4/25)	Puca L. et al., <i>Cell</i> 2018
	Cancer de la vessie	18% (6/32)	Gao D. et al., <i>Cell</i> 2014
		70% (12/17)	Lee SH. et al., <i>Cell</i> 2018
	Cancer du rein	74% (25/35)	Bolck HA. et al., <i>Eur Urol Focus</i> 2021
Nerveux	Cancer du sein	~ 80% (> 155)	Sachs N. et al., <i>Cell</i> 2018
	Cancer de l'endomètre	100% (15/15)	Turco MY. et al., <i>Nat Cell Bio</i> 2017
	Cancer de l'ovaire	65% (n = 32)	Kopper O. et al., <i>Nat Med</i> 2019
Nerveux	Glioblastome	91.4% (total)	Jacob F. et al., <i>Cell</i> 2020
		66.7% (IDH1 mutant)	
		75% (récidive)	

D'après Foo MA., et al., *Biomarker Res* (2022)

Organoïdes tumoraux et tumeur d'origine

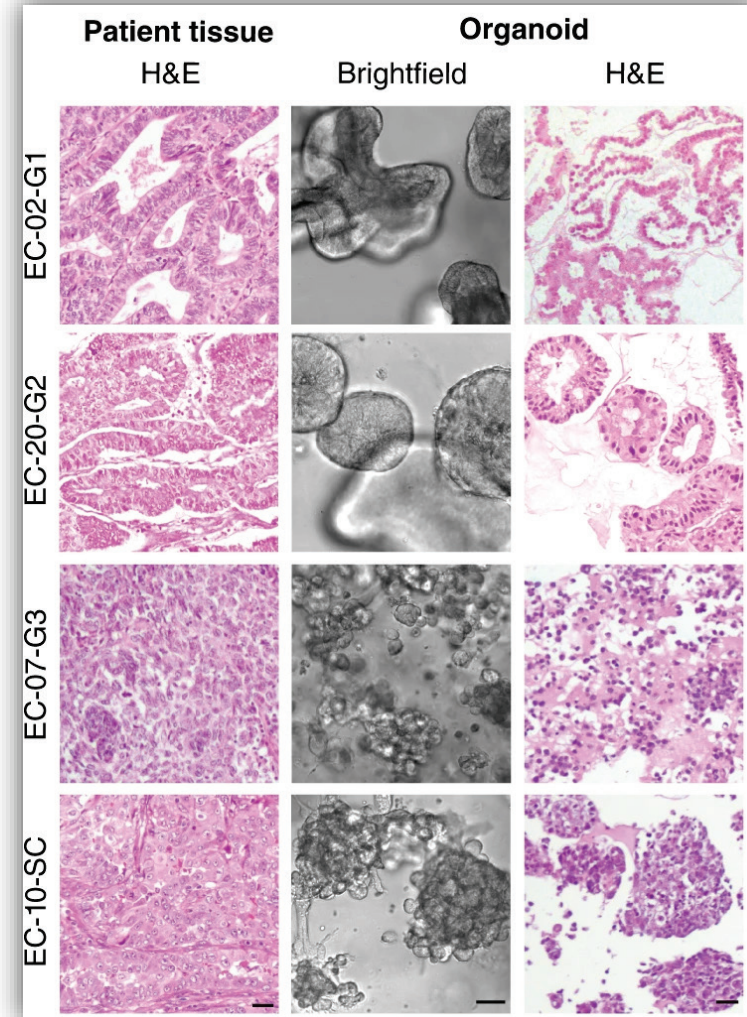
Proche de la tumeur d'origine en termes d'histologie

Organoïdes de cancers de vessie



Lee, S. H. et al., *Cell* (2018)

Organoïdes de cancers de l'endomètre



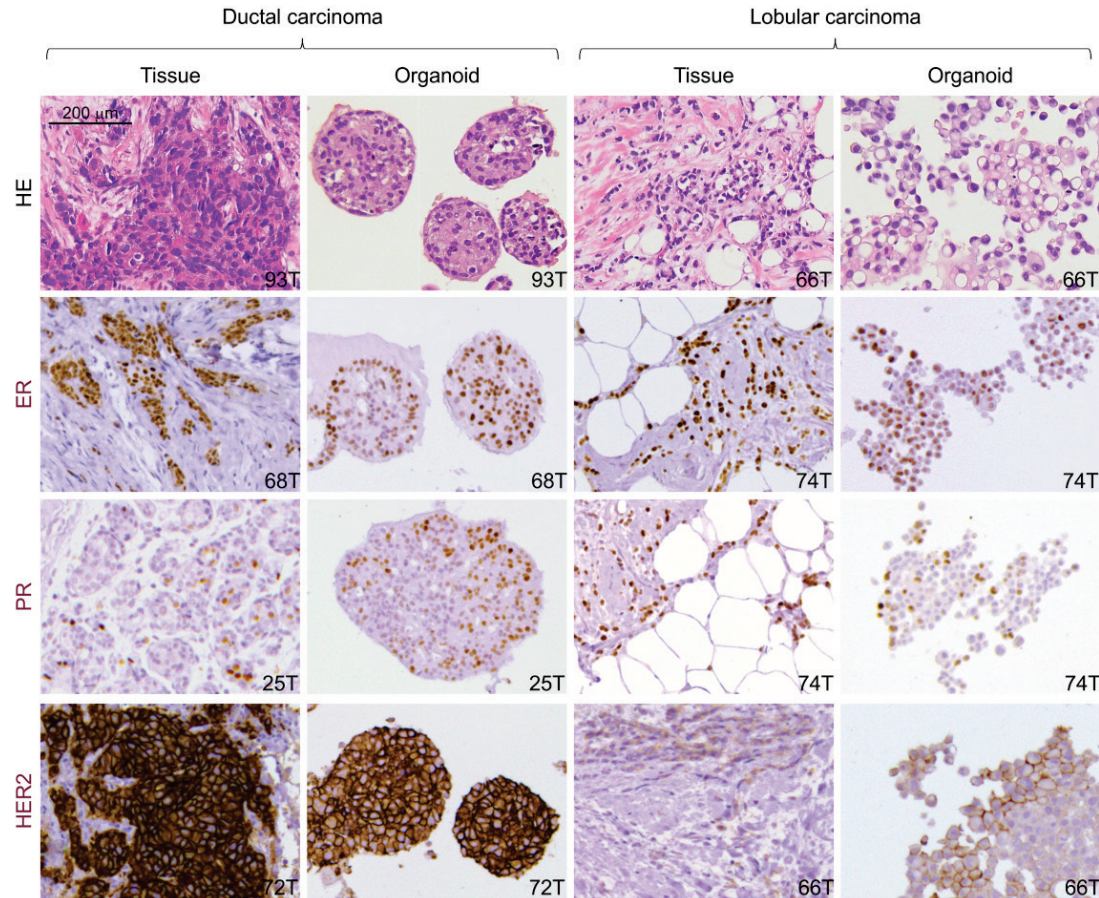
Berg, HF. et al., *Comm Med* (2021)

Organoïdes tumoraux et tumeur d'origine

Proche de la tumeur d'origine en termes de marqueurs tumoraux

Organoïdes des cancers des VADS

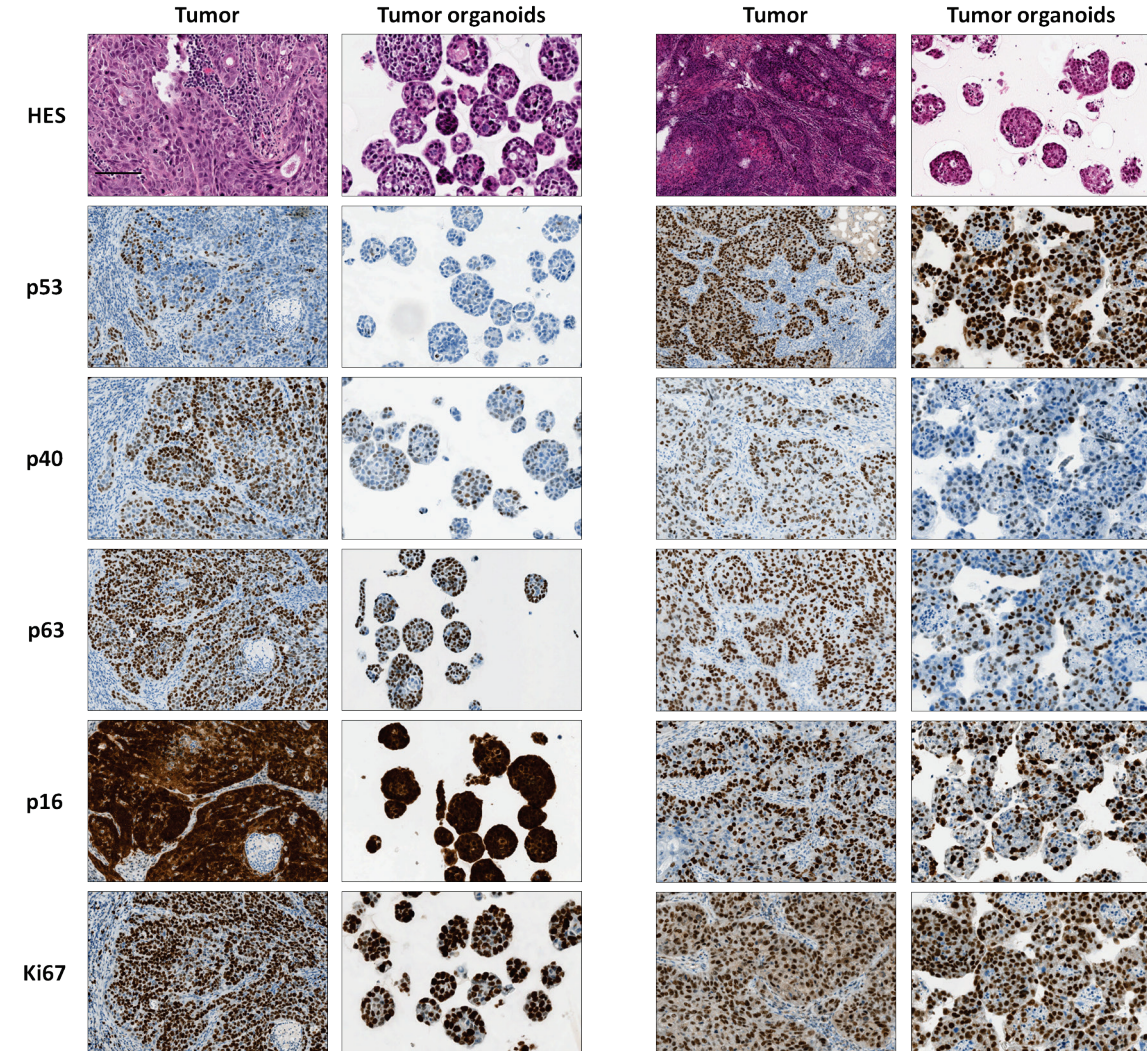
Organoïdes de cancers du sein



Sachs N. et al., *Cell* (2018)

V21-002

V20-020

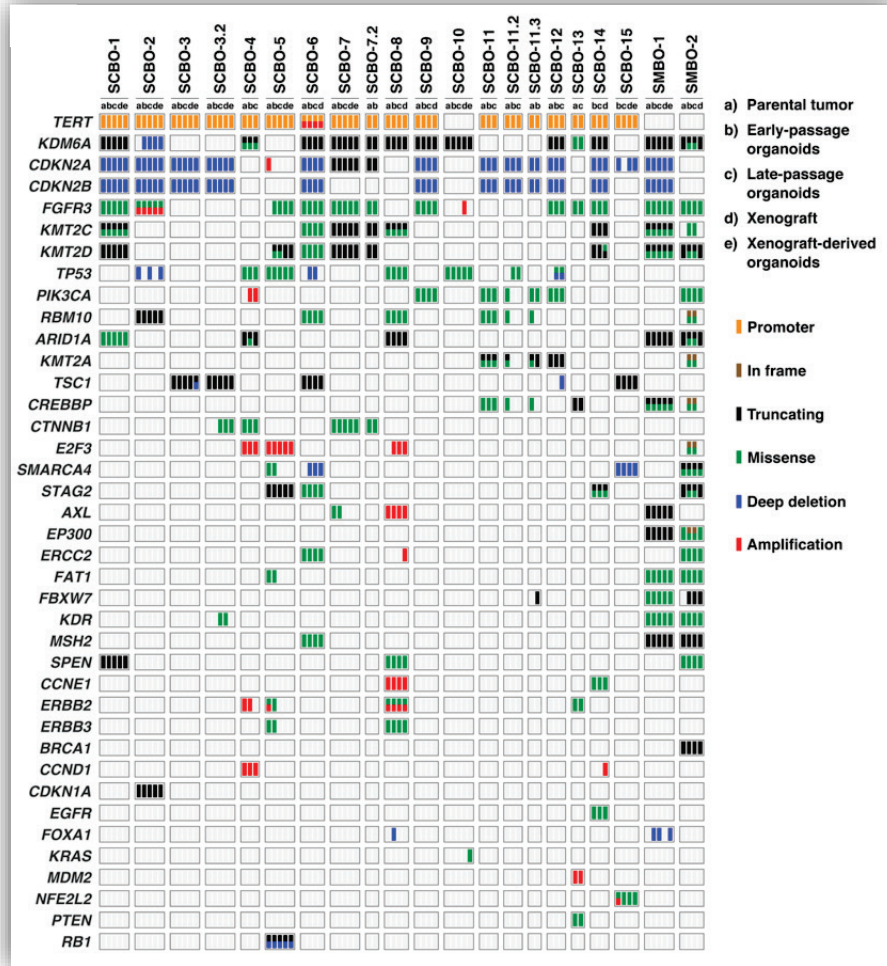


Perréard M. et al., *en préparation*

Organoïdes tumoraux et tumeur d'origine

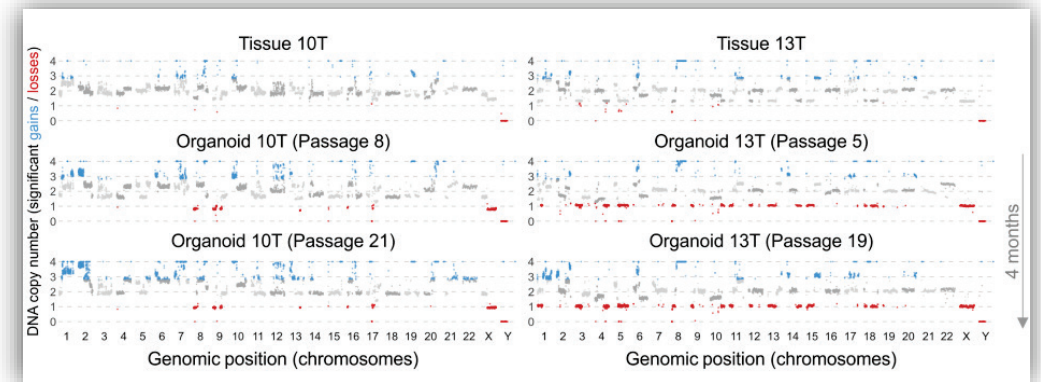
Proche de la tumeur d'origine en termes moléculaires

Mutations détectées (cancers de la vessie)



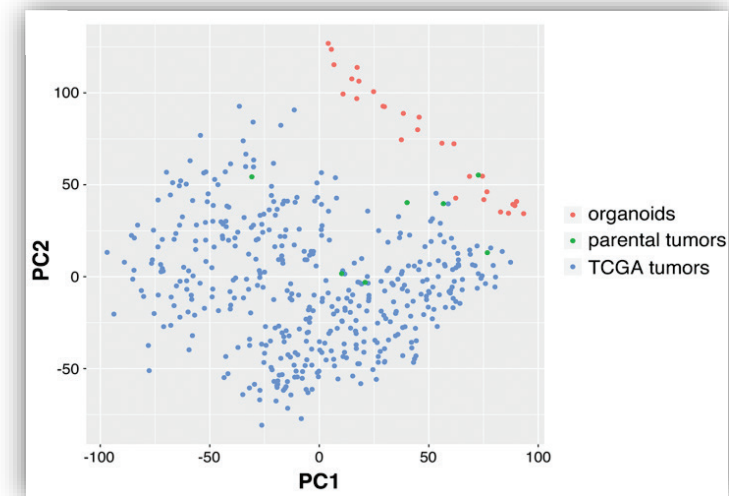
Lee, S. H. et al., *Cell* (2018)

Altérations du nombre de copies (cancer du sein)



Sachs N. et al., *Cell* (2018)

Analyse en composantes principales des données transcriptomiques (cancer de la vessie)

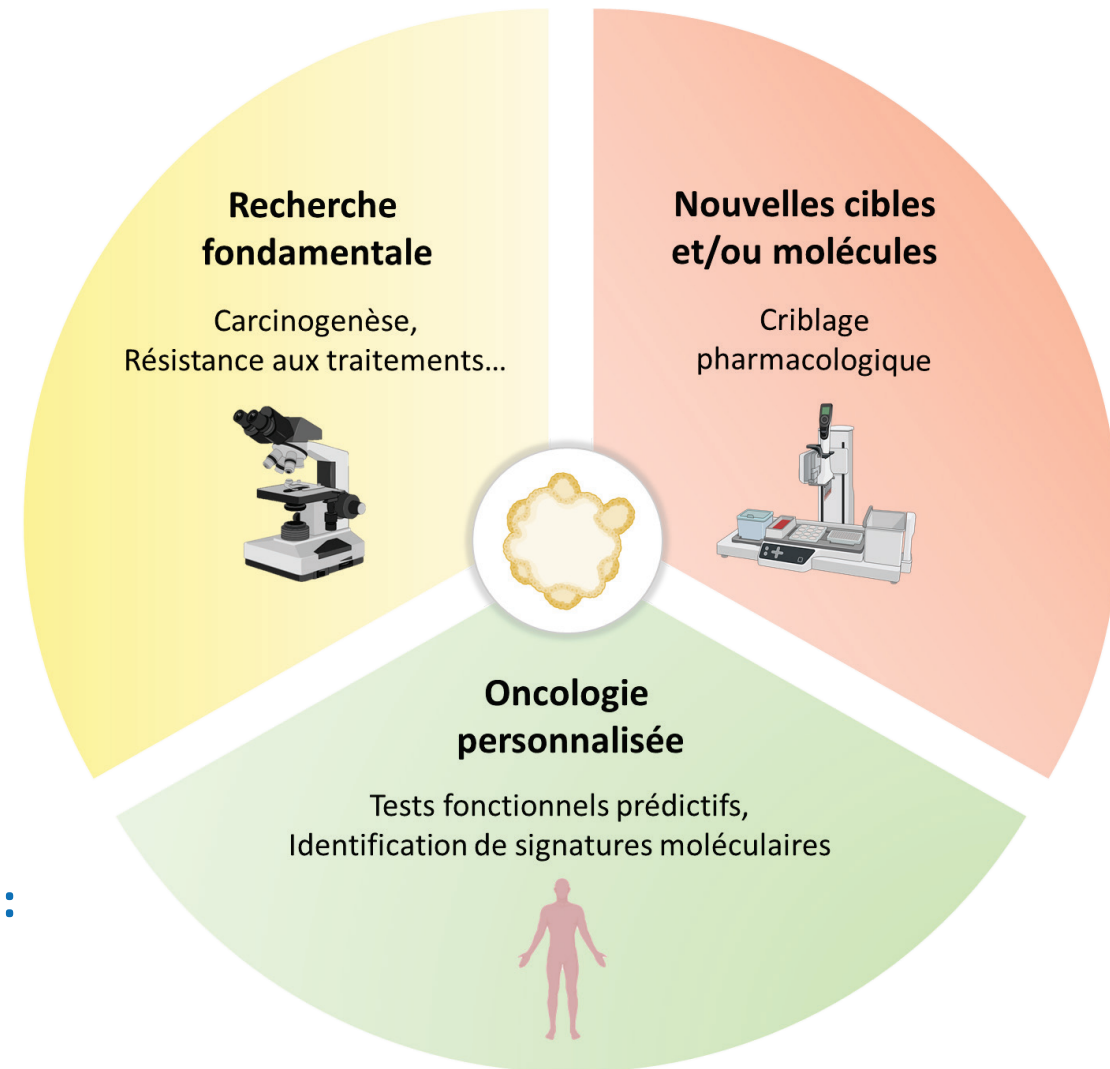


Lee, S. H. et al., *Cell* (2018)

Quelles possibilités offertes par les organoïdes tumoraux ?

- ❑ **Recherche fondamentale**
- ❑ **Validation de molécules en développement** (nécessite une collection de tumoroides)
- ❑ **Criblage pharmacologique** (haut-débit nécessaire)
- ❑ **Identification de signatures moléculaires prédictives** (caractérisation moléculaire requise)
- ❑ **Tests fonctionnels prédictif en cours de prise en charge :**

Oncologie de précision

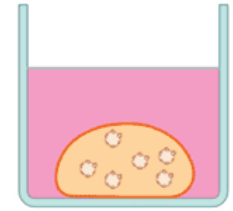


Thorel L. et al., *Med Sci* (2022)

Les tumeurs : évaluation de la réponse au traitement

<https://www.orgapred.com/>

Vernon M. et al., *Mol Cancer Ther* (2020)
Florent R. et al., *Cell Death Dis* (2020)
Wambecke A. et al., *Mol Oncol* (2021)
Hadj Bachir E. et al., *Bio Cell* (2022)
Thorel L. et al., *J Exp Clin Cancer Res* (2023)



Tumoroïdes



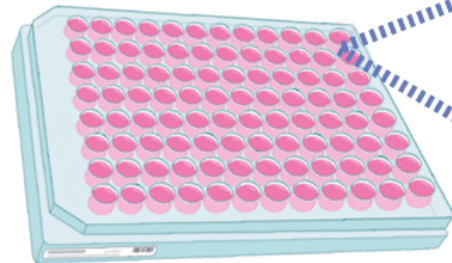
Test de viabilité /
cytotoxicité en point final



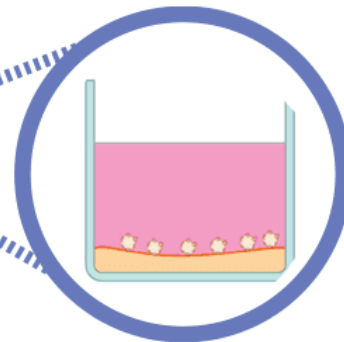
Collection des
tumoroïdes



Traitement



Ensemencement en microplaques
recouvertes de matrice



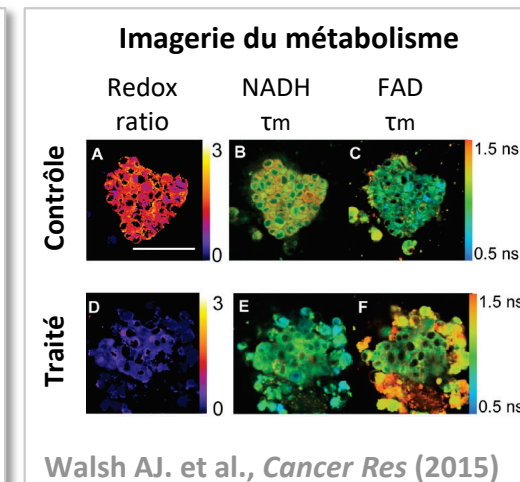
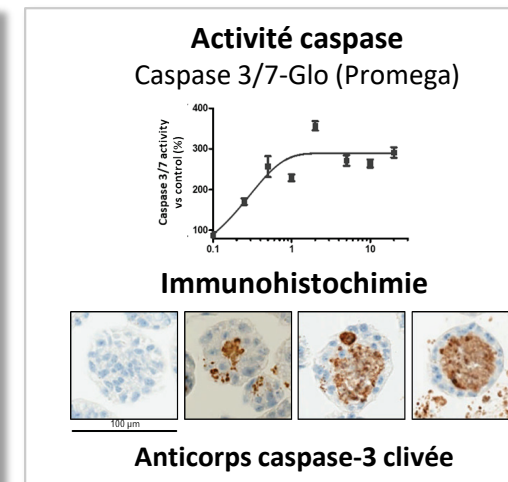
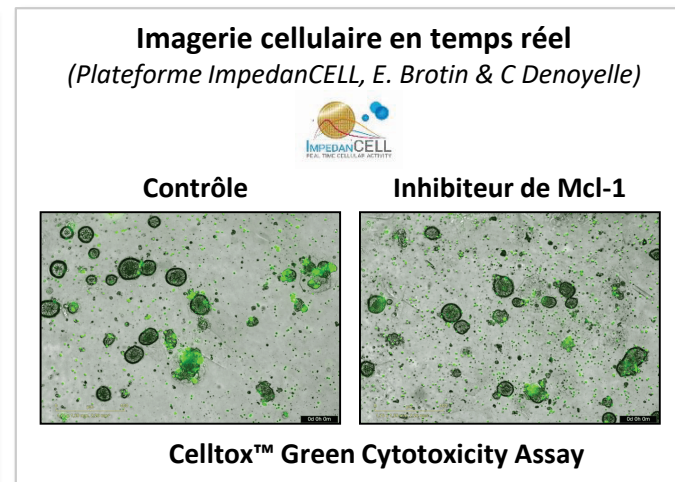
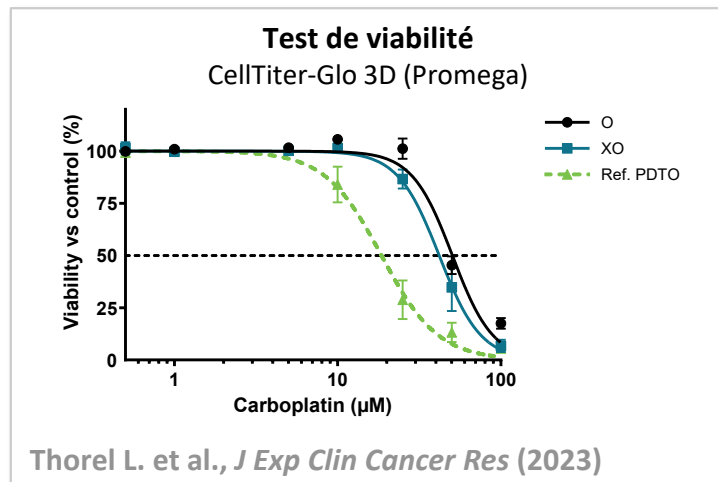
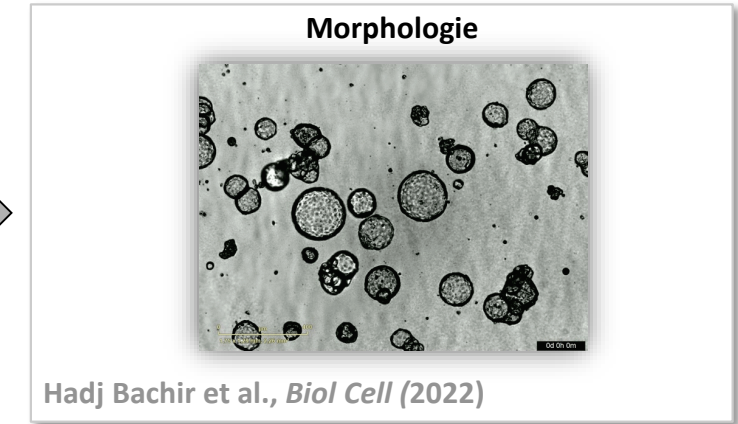
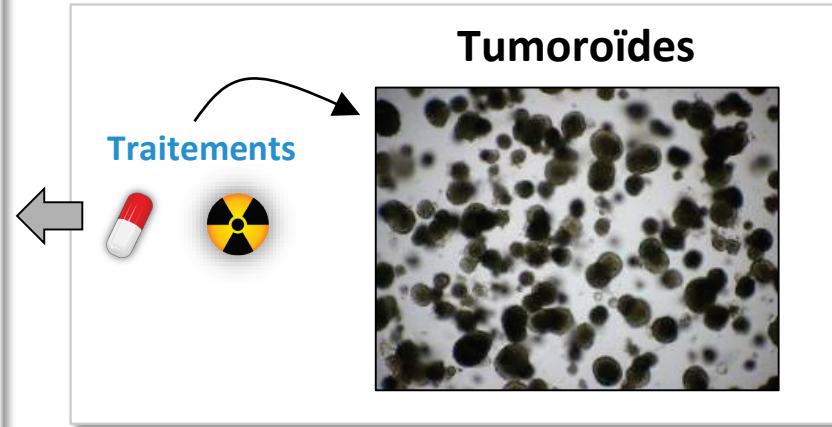
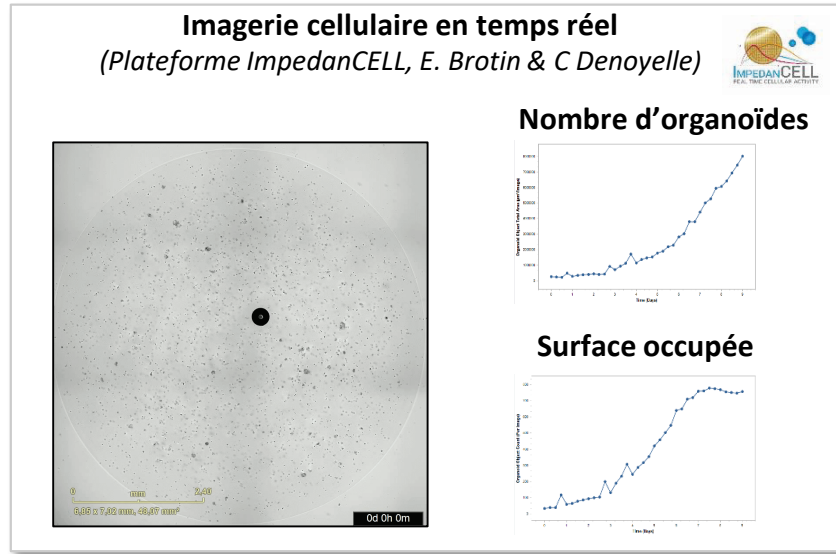
Evaluation de la
réponse



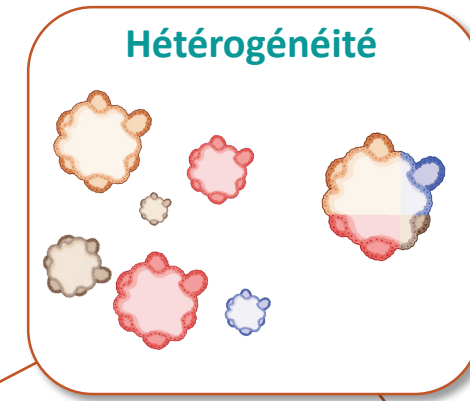
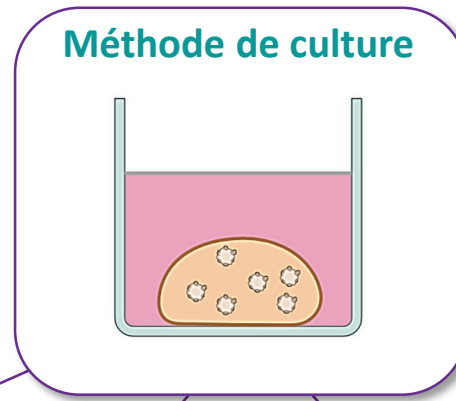
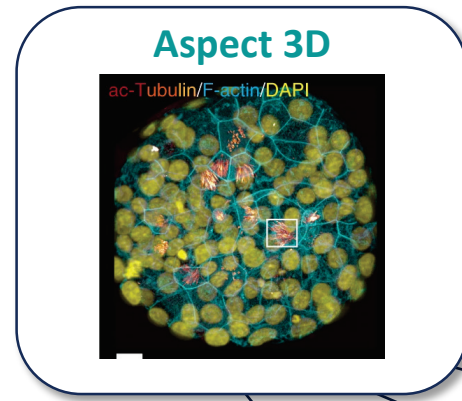
Suivi en temps réel (morphologie,
apoptose, cytotoxicité, etc.)



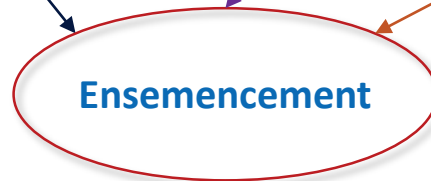
Evaluation de la réponse aux traitements



Impact des caractéristiques des tumoroïdes sur le criblage



Coût
Délai
Automatisation



Distribution homogène
Automatisation



Pénétration des molécules
Impact de la MEC



Read-out adaptés
Standardisation

Automatisation de la culture

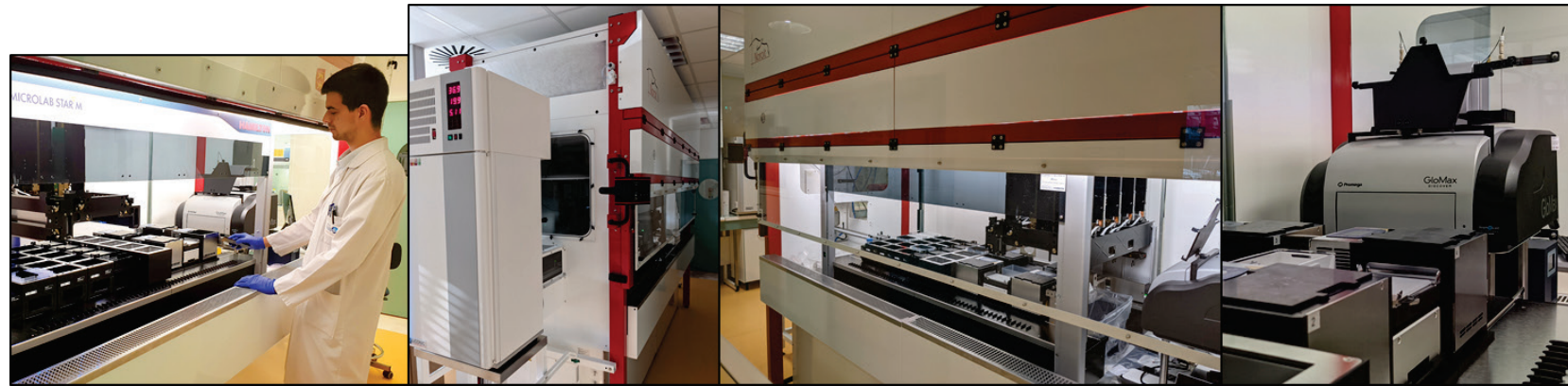
Robot pipetteur à façon Microlab STAR (Hamilton) couplé à un lecteur de microplaques
Glomax (Promega)



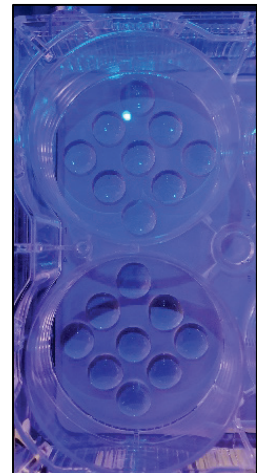
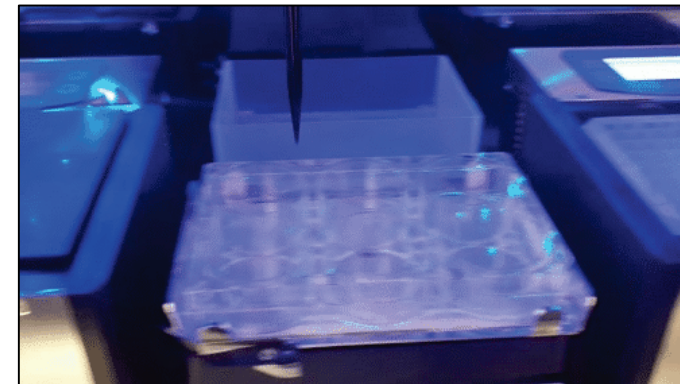
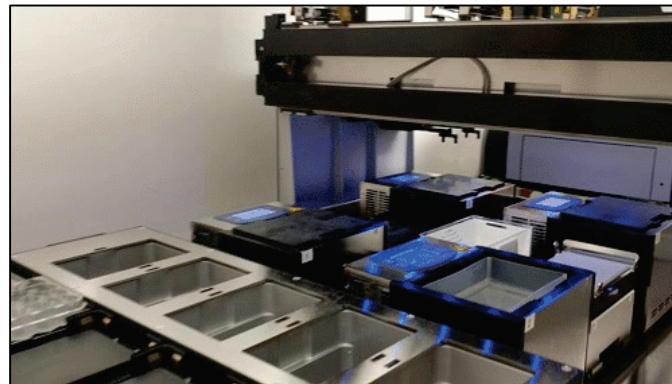
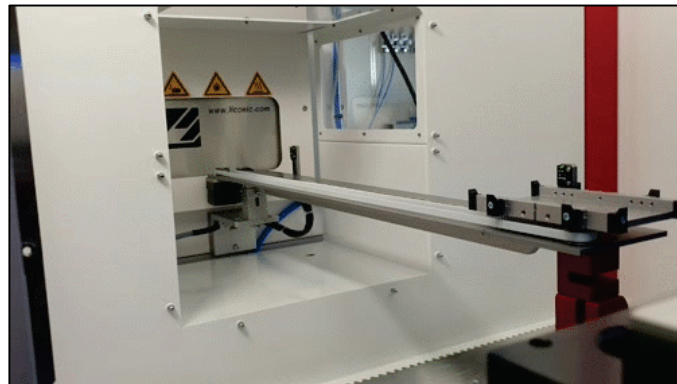
Guillaume
Desmartin



Lucie
Lecouflet



Culture des tumorôides (changement de milieux, ensemencement des dômes)



Automatisation du test

Conditions standards (20 000 tumoroïdes / plaques 96 puits)

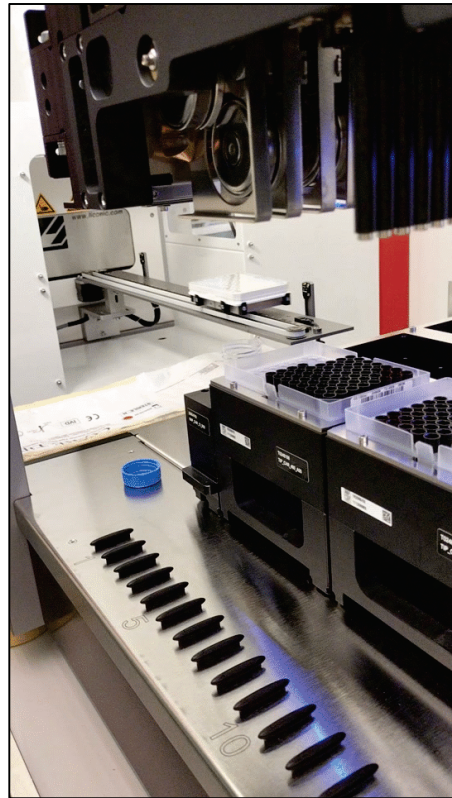
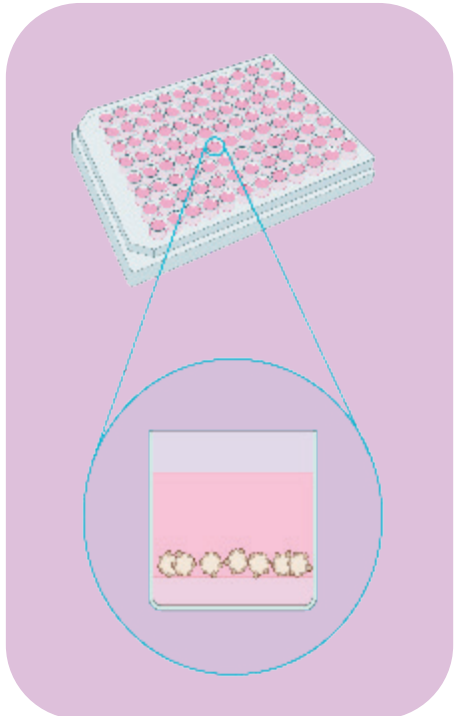


Romane Florent

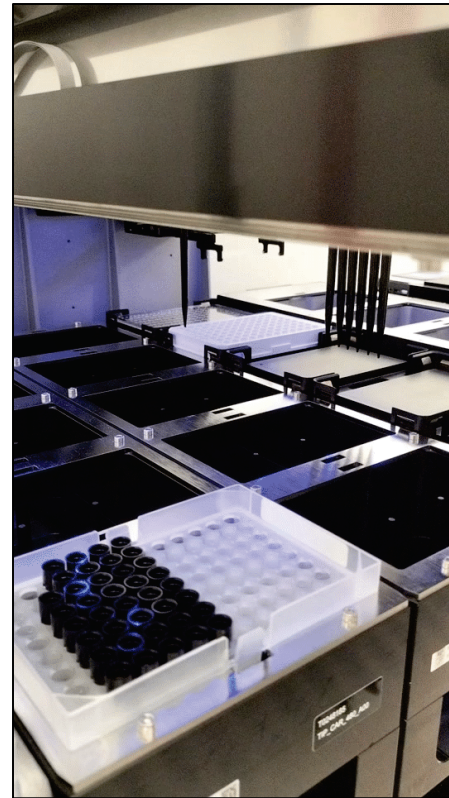
Plaque 96 puits

- 200 PDTO/puits
- Coating avec 50/50 milieu/matrice

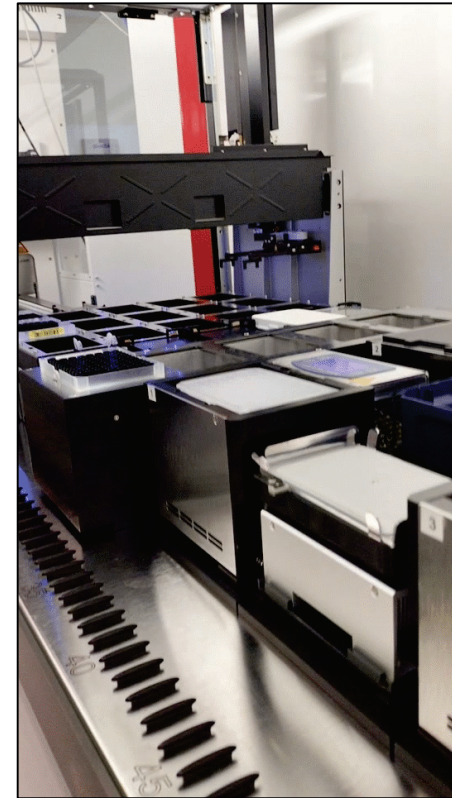
Traitements des tumoroïdes et analyse (jusqu'à 80 plaques)



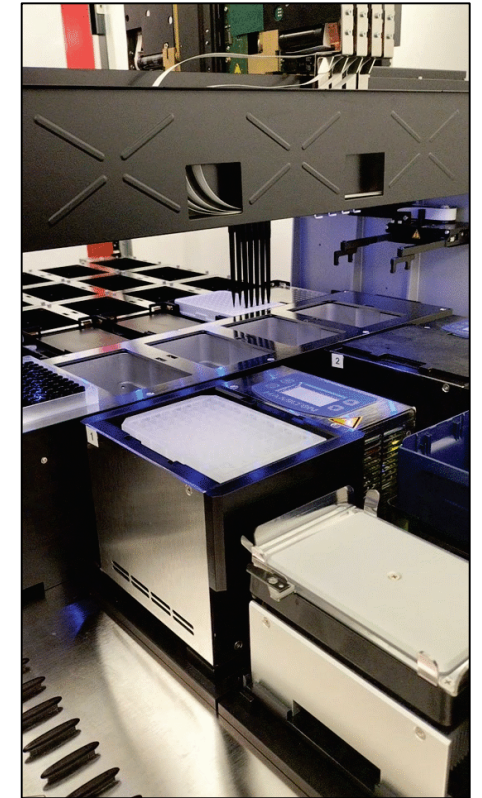
Transfert de la plaque coatée



Ajout d'eau dans les interstices



Ensemencement des tumoroïdes

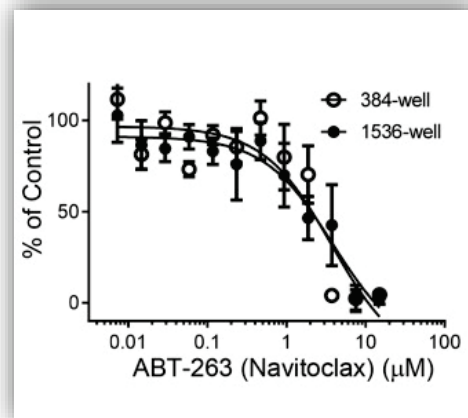
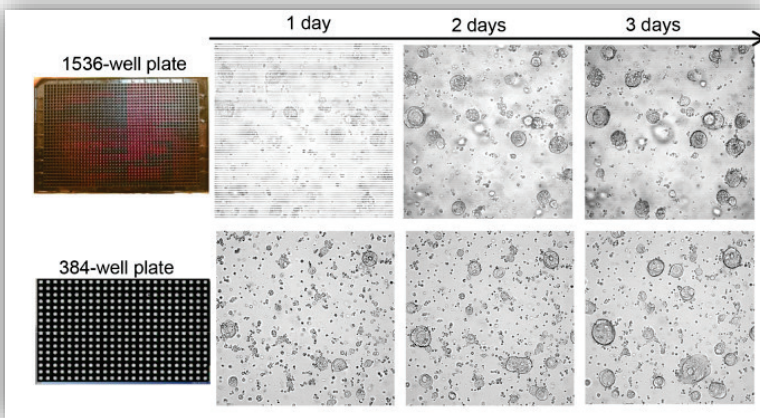
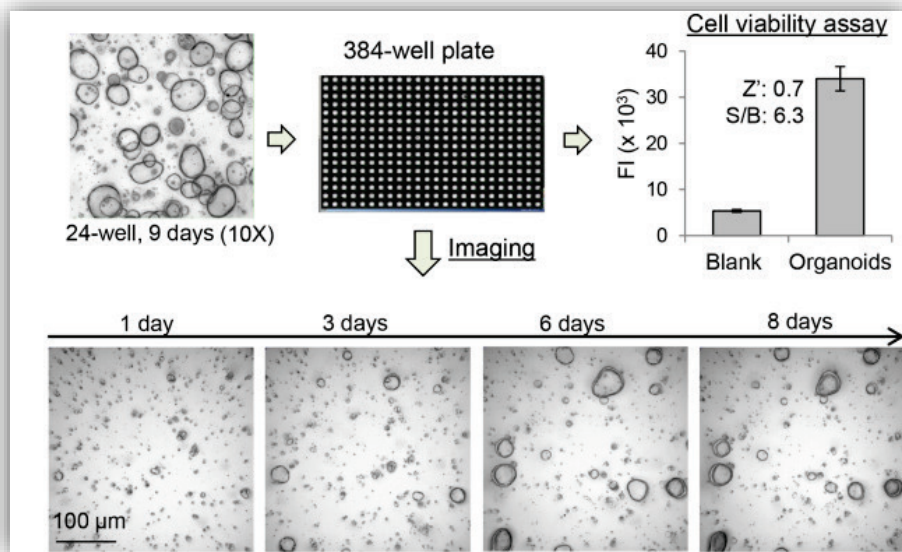


Ajout des molécules

Miniaturisation et automatisation du test

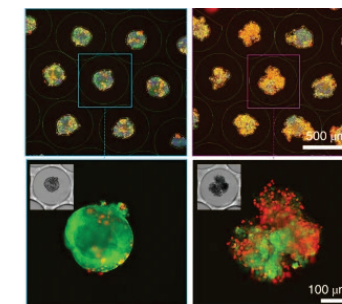
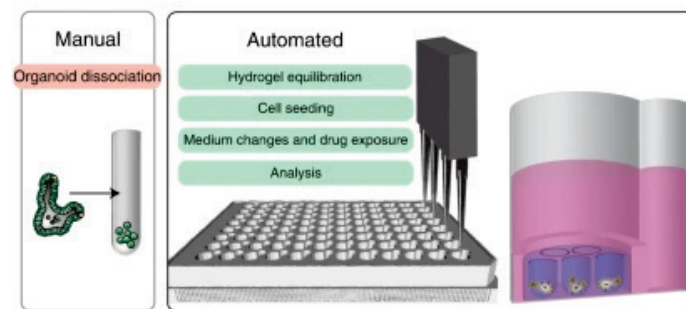
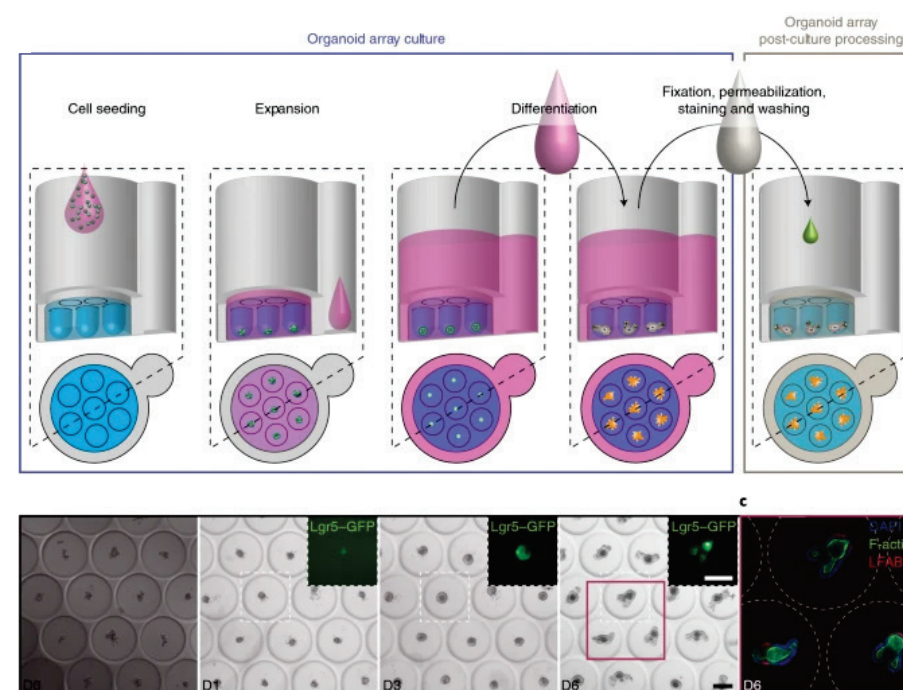
Plaques 1536 puits : à partir de suspension cellulaire

Organoïdes de côlon



Du Y. et al., *J Mol Cell Bio* (2020)

Puces organoïdes : microcavités en hydrogel



Brandeborg N. et al., *Nat Biomed Eng* (2020)

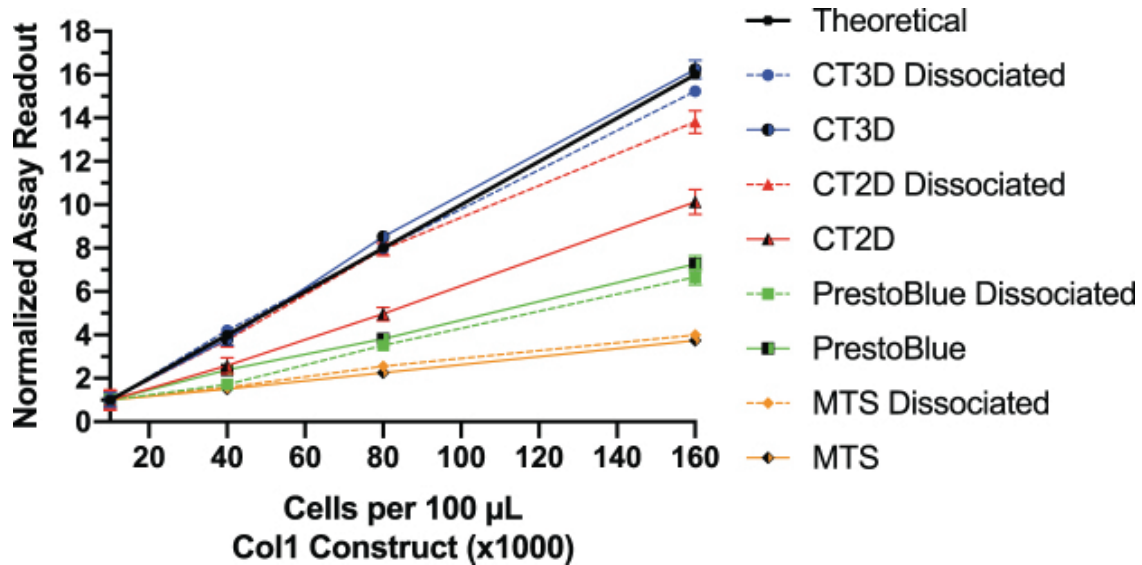
Analyse de la réponse : test de viabilité

Protocoles et tests biochimiques pour les lignées cellulaires parfois **pas adapté à l'aspect tridimensionnel du modèle** (pénétration des réactifs, lyse)

Comparaison de tests de viabilité : culture 3D en hydrogel

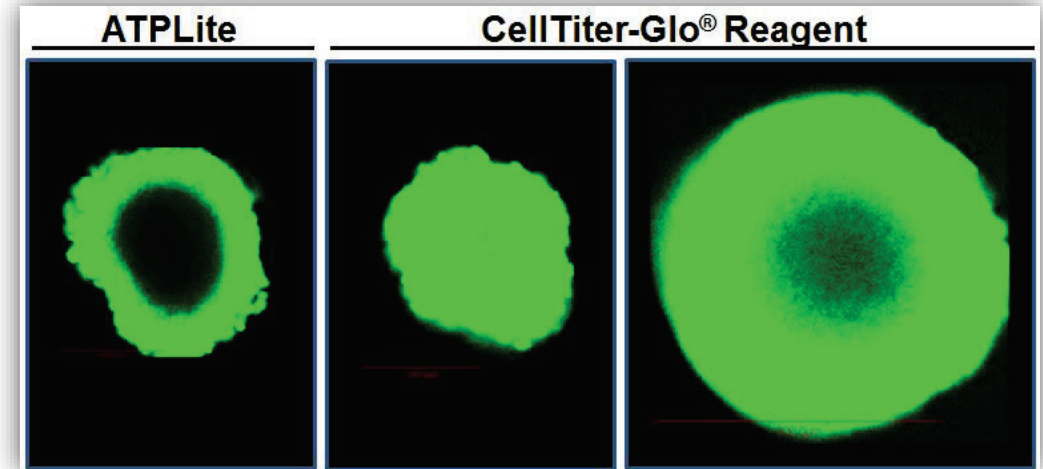
- CellTiter-Glo 3D
- CellTiter-Glo 2D
- PrestoBlue
- MTS

Cellules HCT116
Après dissociation ou non de
l'hydrogel



Dominijanni AJ. et al., *Tissue Eng Part C Methods* (2021)

CellTiter-Glo 3D®: L'ATP des cellules vivantes catalyse la formation d'un produit luminescent, l'oxyluciférine, à partir de la luciférine grâce à la luciférase.



Augmentation de la concentration en détergent pour **améliorer la lyse**

Mais :

- Test en **point final**
- Pas d'information sur **l'hétérogénéité**

Analyse de la réponse : imagerie

Hétérogénéité de réponse aux traitements

Inter-tumoroïdes

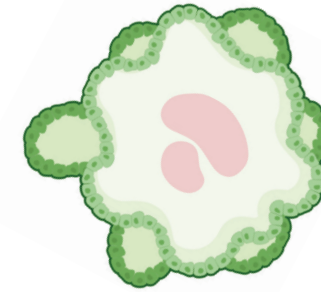
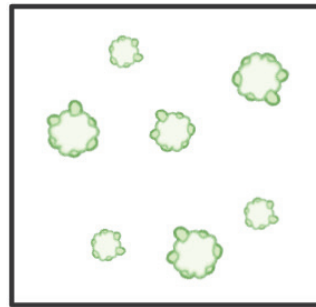
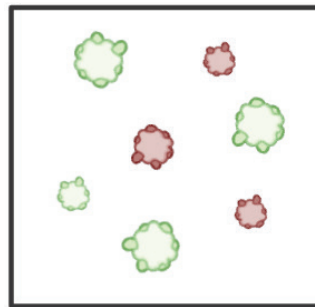
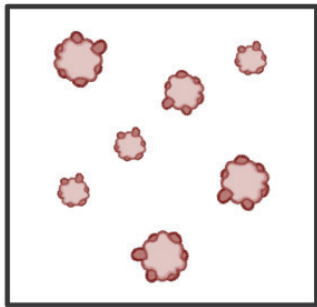
Intra-tumoroïde

Morts
Sensible

Morts et **vivants**
Réponse partielle

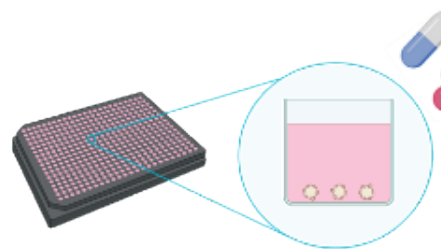
Vivants
Résistante

Zone morte **Zone vivante**



Sous-populations résistantes
potentiellement responsable
de **rechute** des **patients**

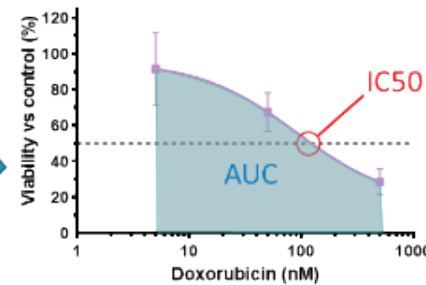
Analyse de la réponse par imagerie cellulaire



Traitement en plaque 384 puits



Suivi morphologique sur 7 jours

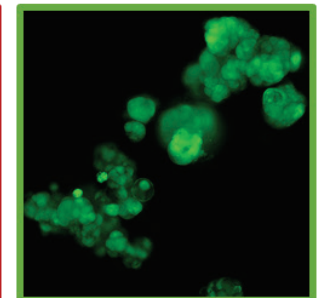
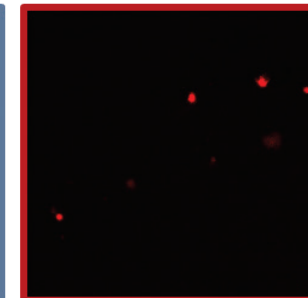
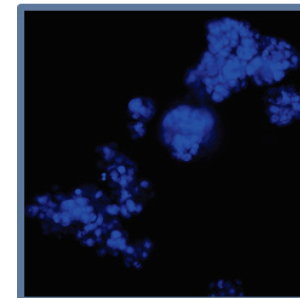


Test biochimique

Hoechst 3342

Iodure de propidium

Calcéïne

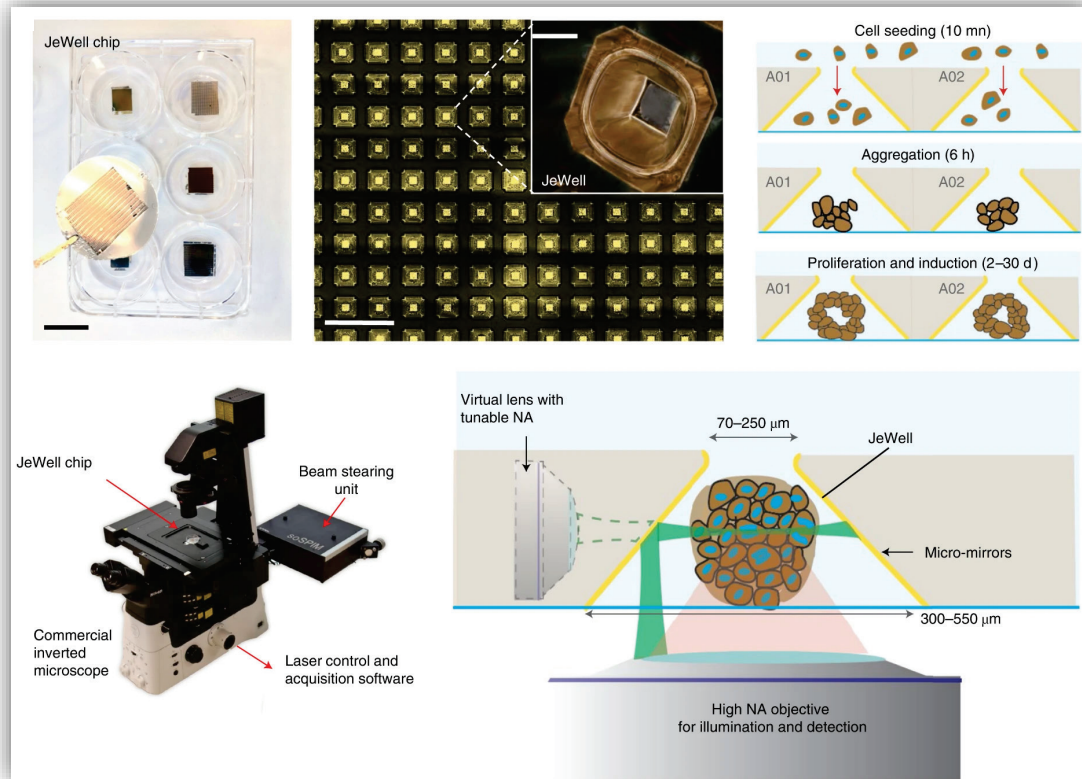


Analyse de la réponse : imagerie

Défis

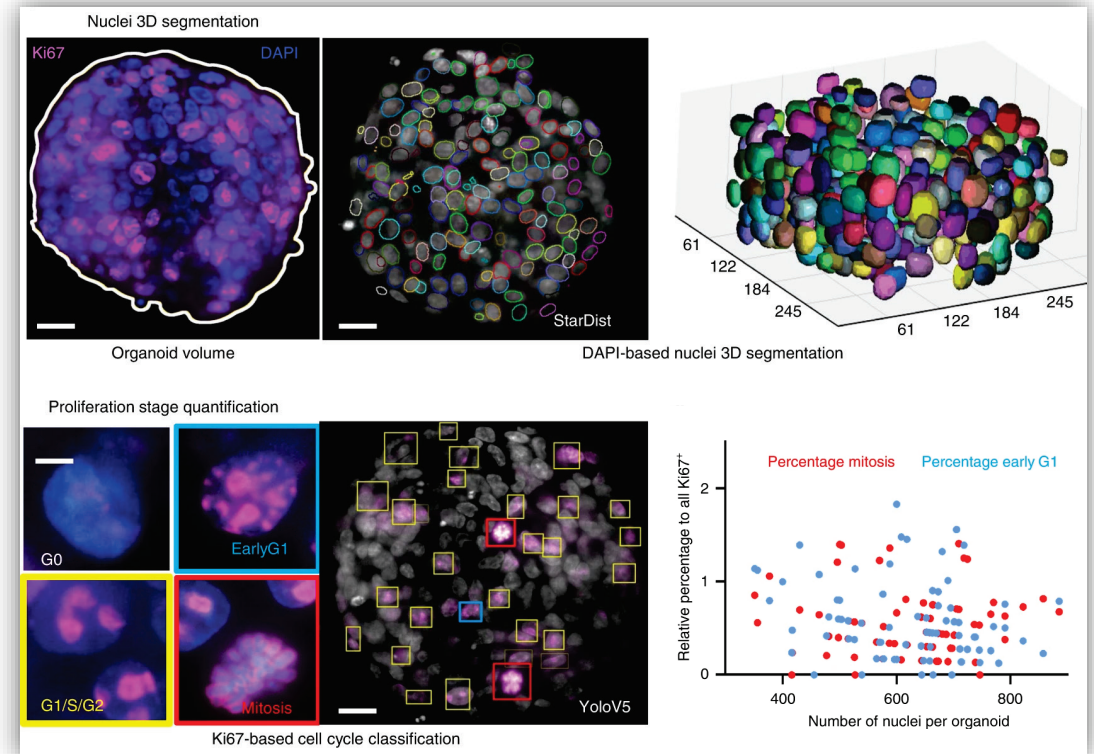
- Sondes capables de pénétrer jusqu'au centre des tumoroides / non toxiques
- Imagerie d'échantillons épais
- Temps d'acquisition et d'analyse

Puces de culture d'organoïdes microfabriquées: JeWell



96 organoïdes / 3 longueurs d'onde : **1 h** et **173 Go**.

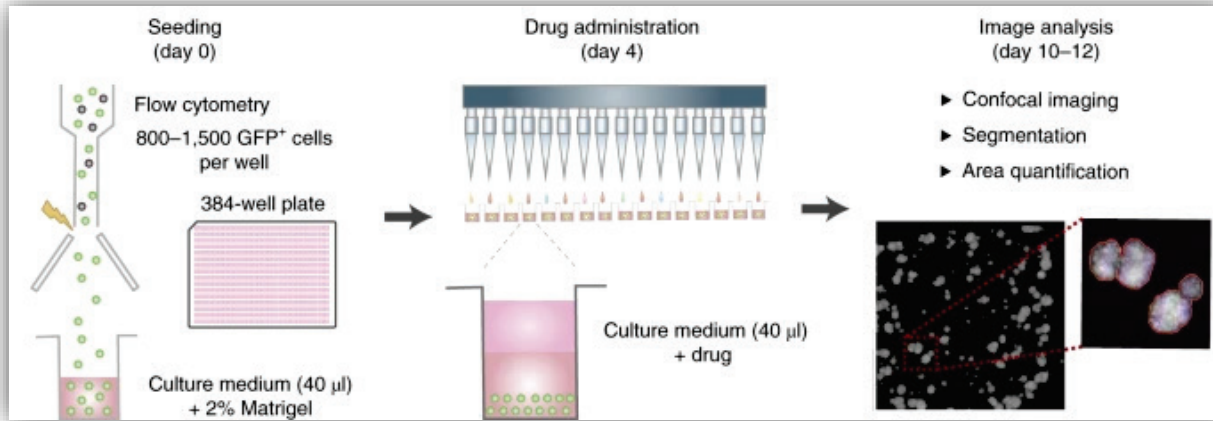
Prolifération dans les sphéroïdes HCT116



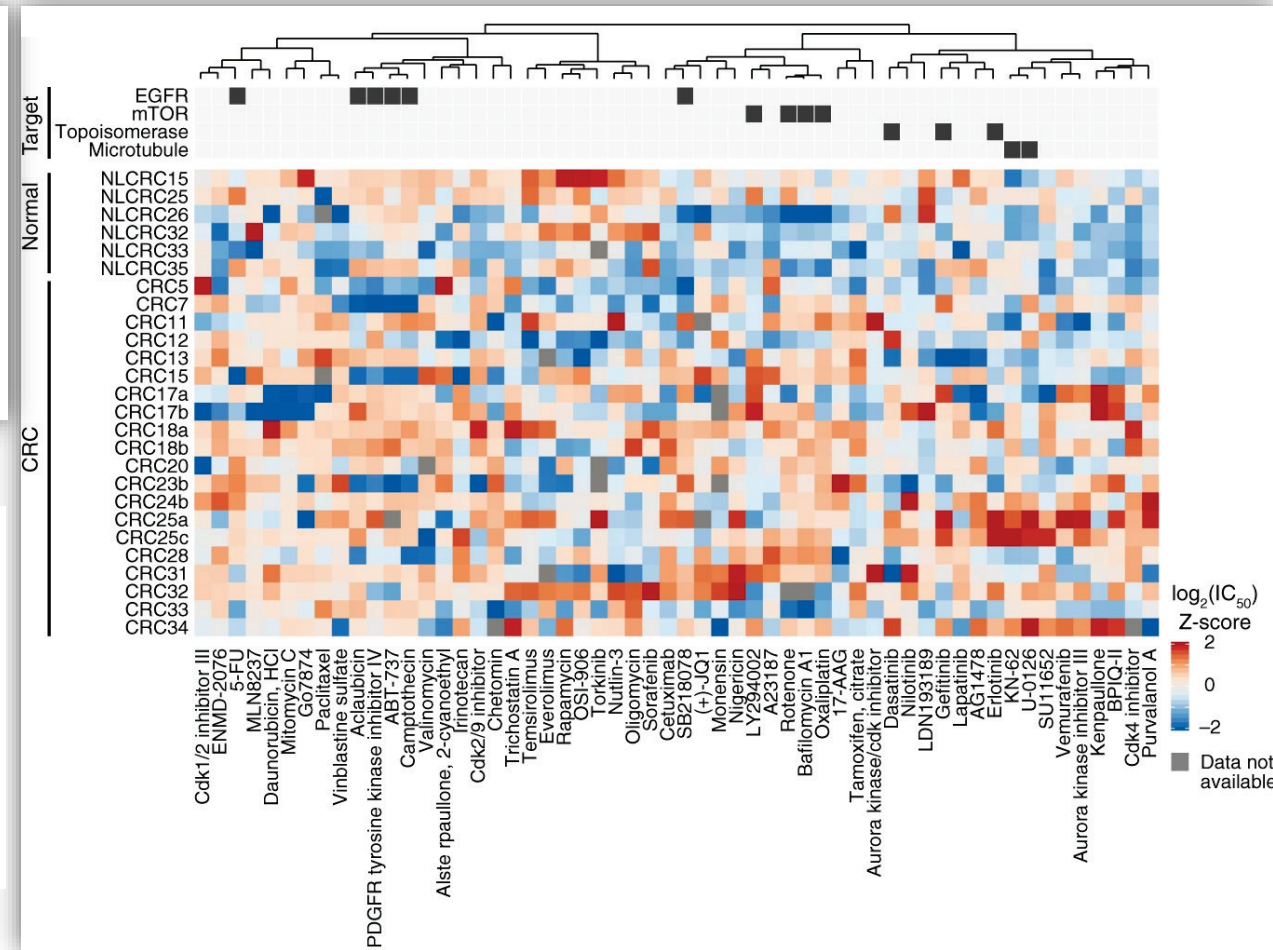
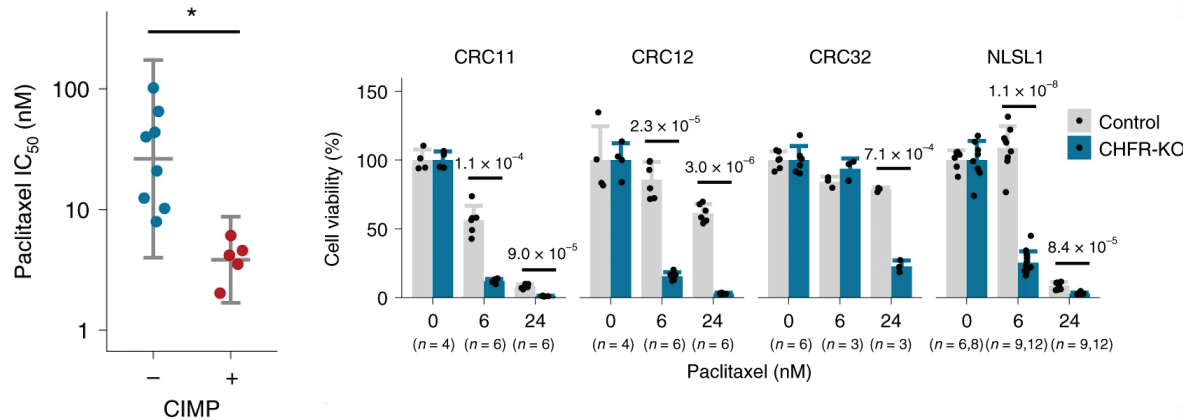
Beghin A. et al., *Nat Methods* (2022)

Analyse de la réponse : imagerie

Criblage de **56 molécules** sur 20 lignées de tumoroïdes de cancer colorectal et lignées d'organoïdes de côlon normal



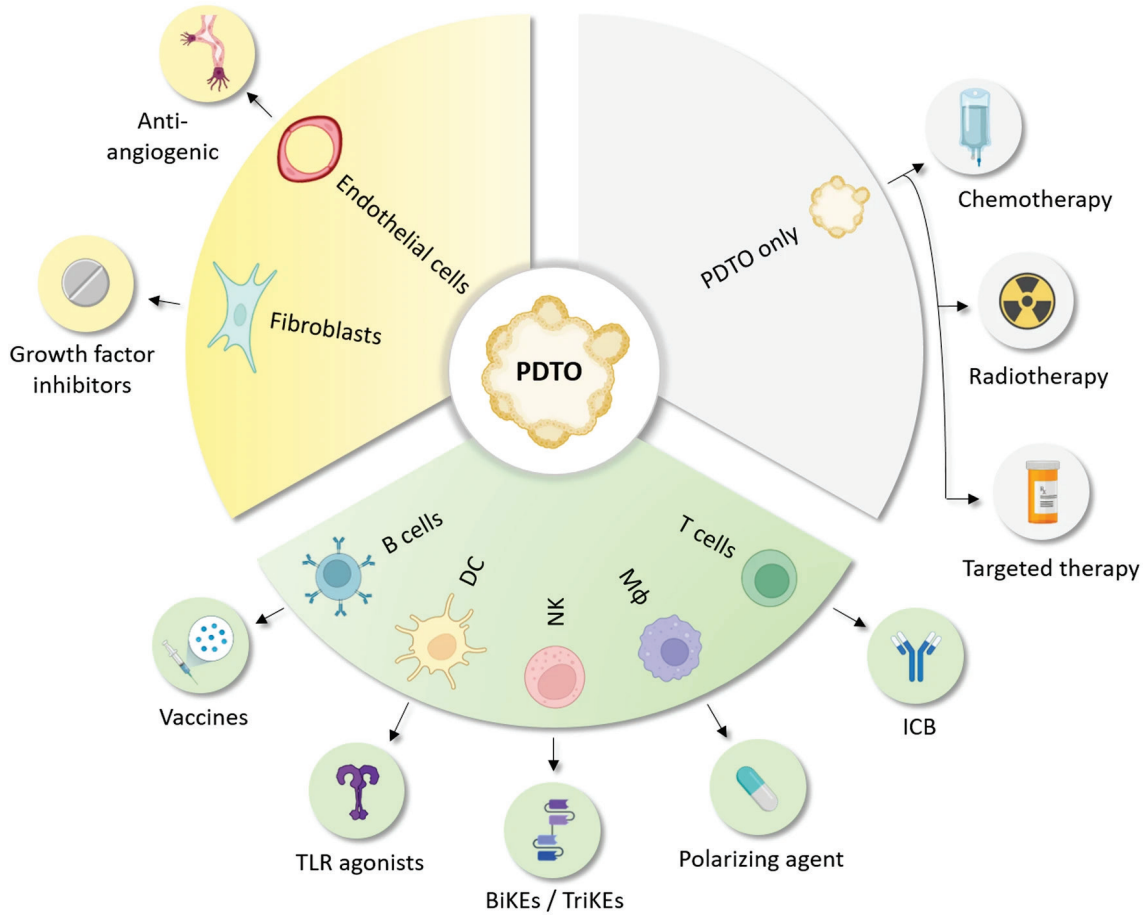
Toshimitsu K. et al., *Nat Chem Biol* (2022)



- Paclitaxel efficace sur les tumoroïdes **CIMP+**
- Identification de **CHFR** comme un déterminant de la sensibilité au paclitaxel

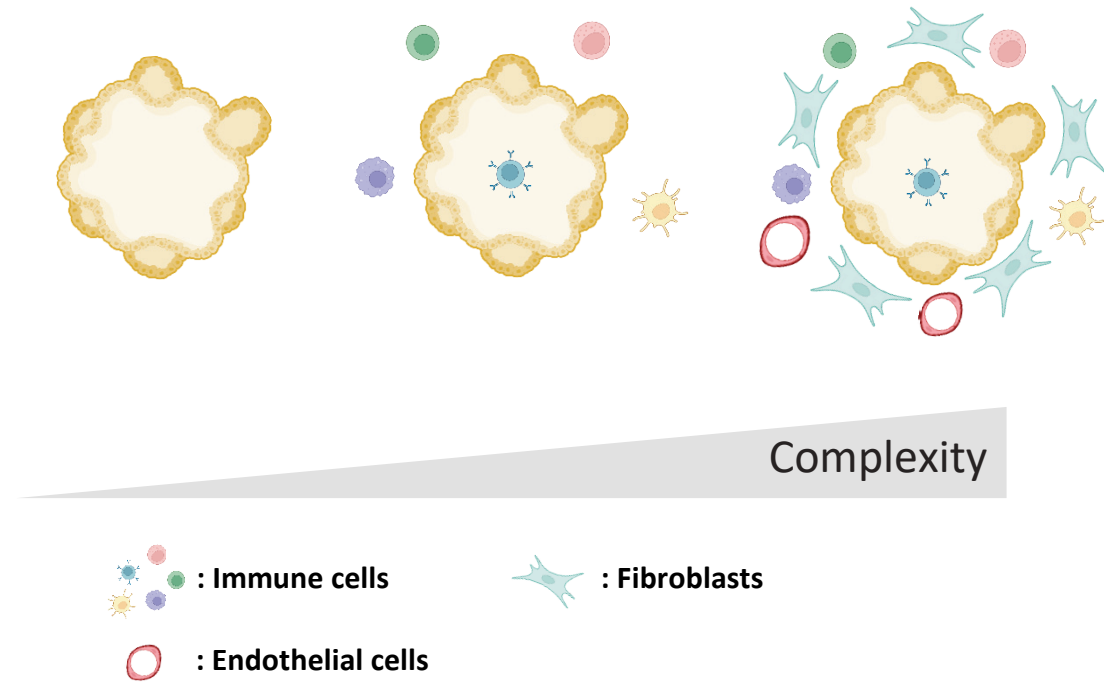
Criblage de molécules liées au microenvironnement tumoral

Thérapies ciblant le microenvironnement tumoral



Thorel L. et al., *Exp Mol Med* (2024)

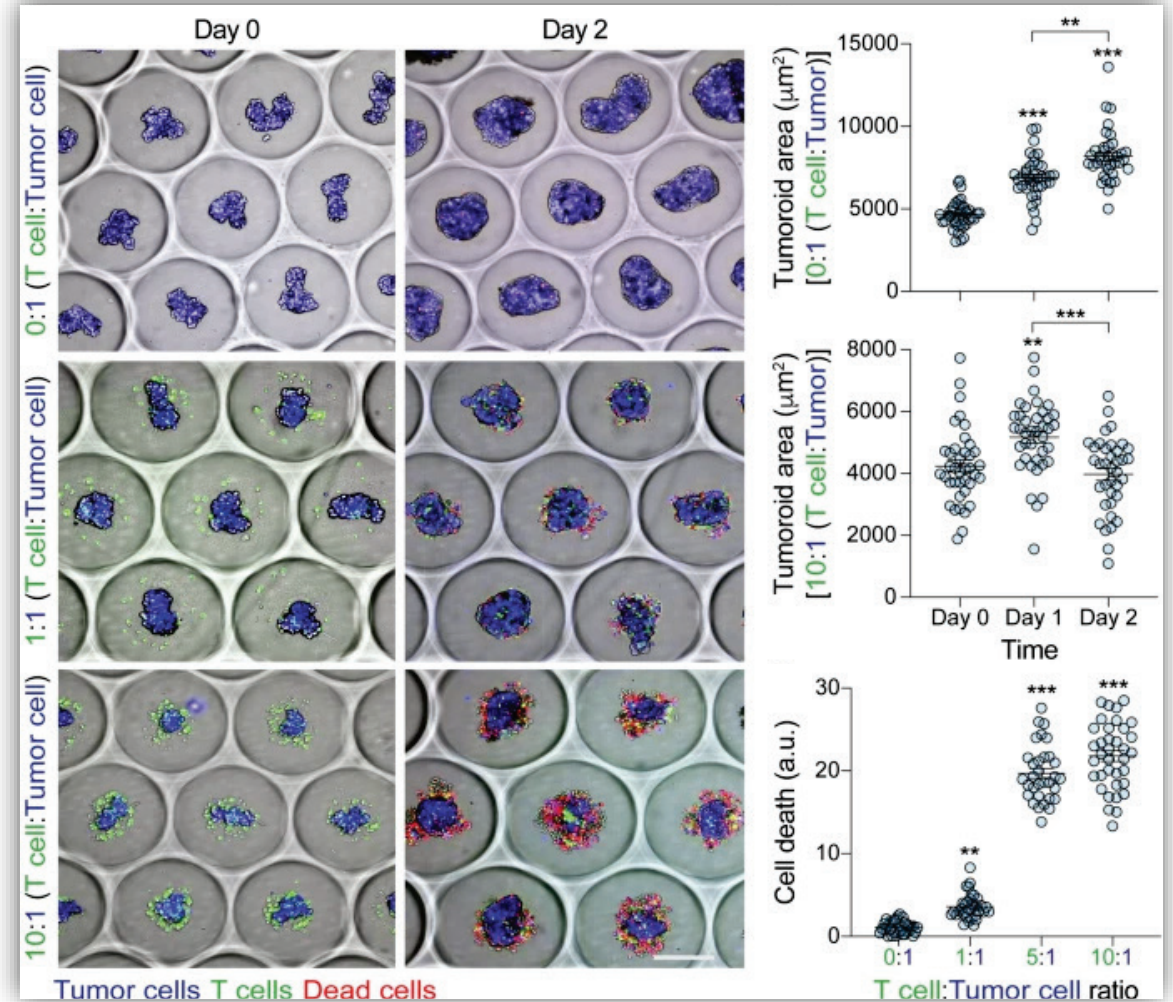
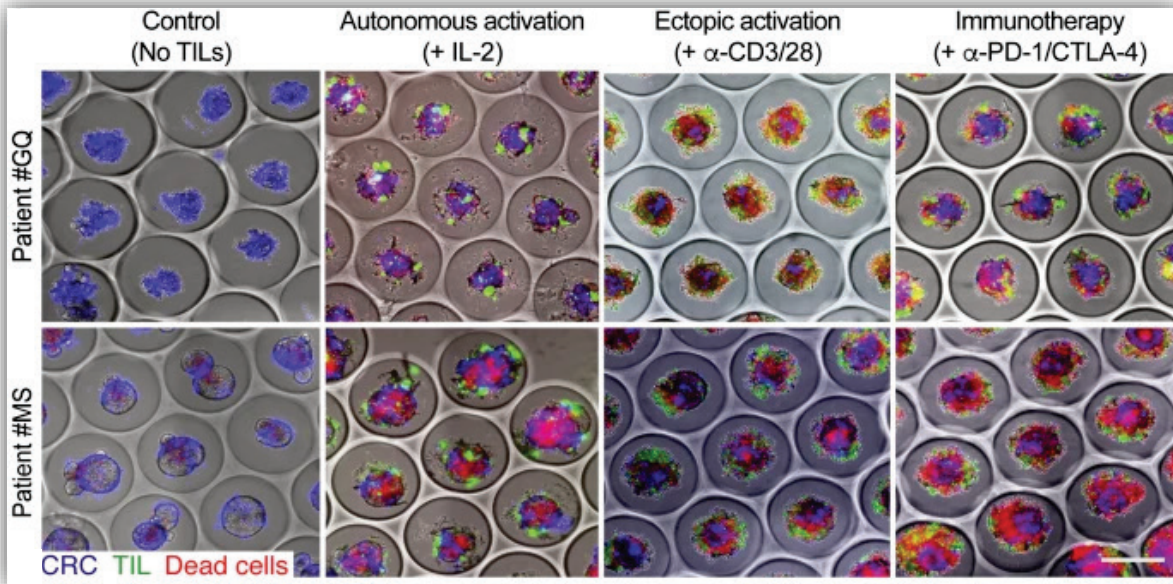
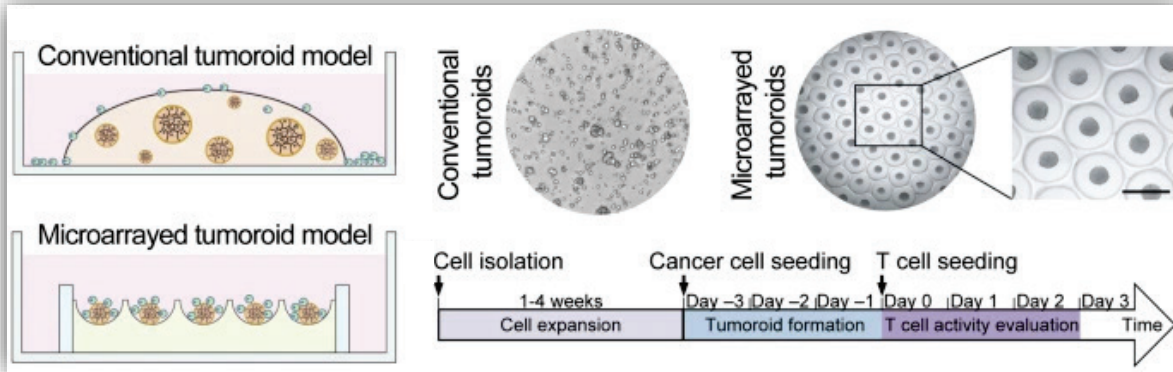
Vers la complexification des modèles de tumoroides



Tumoroides co-cultivés avec des cellules immunitaires

Criblage de molécules liées au microenvironnement tumoral

Puces organoïdes : microcavités en hydrogel contenant des tumorôides et des cellules immunitaires



➤ Evaluation de la réponse aux immunothérapies

➤ Standardisation et automatisation

Conclusions

Criblage à haut-débit sur les tumoroides : de plus en plus une réalité...

- Format **plaques 384 puits** fréquent
- **Développements technologiques** (microfluidique, microsystemes, bioingénierie...)
- Développements pour l'**analyse de la réponse 3D**
- **Importants investissements** de l'industrie pharmaceutiques pour ces modèles

mais...

- Tests fonctionnels réalisés le plus souvent sur **petits tumoroides** (< 50 µm)
- Taille des librairies de molécules testées encore **modestes**
- Tests simultanés sur un **grand nombre de lignées de tumoroides** encore compliqué
- Utilisation de **Matrigel** (reproductibilité, 3R)
- **Consentement** des patients
- Tests fonctionnels sur **co-culture** à ses débuts



RÉSEAU NATIONAL

RIBBON

PLATEFORMES DE PRODUCTION
ET DE BIOBANQUES D'ORGANOÏDES

Mise en réseau des plateformes de production et des Centres de Ressources Biologiques

Objectifs 2023-2024 :

Réseau National de Plateformes **IBiSA** associées à des **CRB** certifiés



Portail web commun :

Catalogues des modèles d'organoïdes disponibles
et présentation des moyens d'y accéder



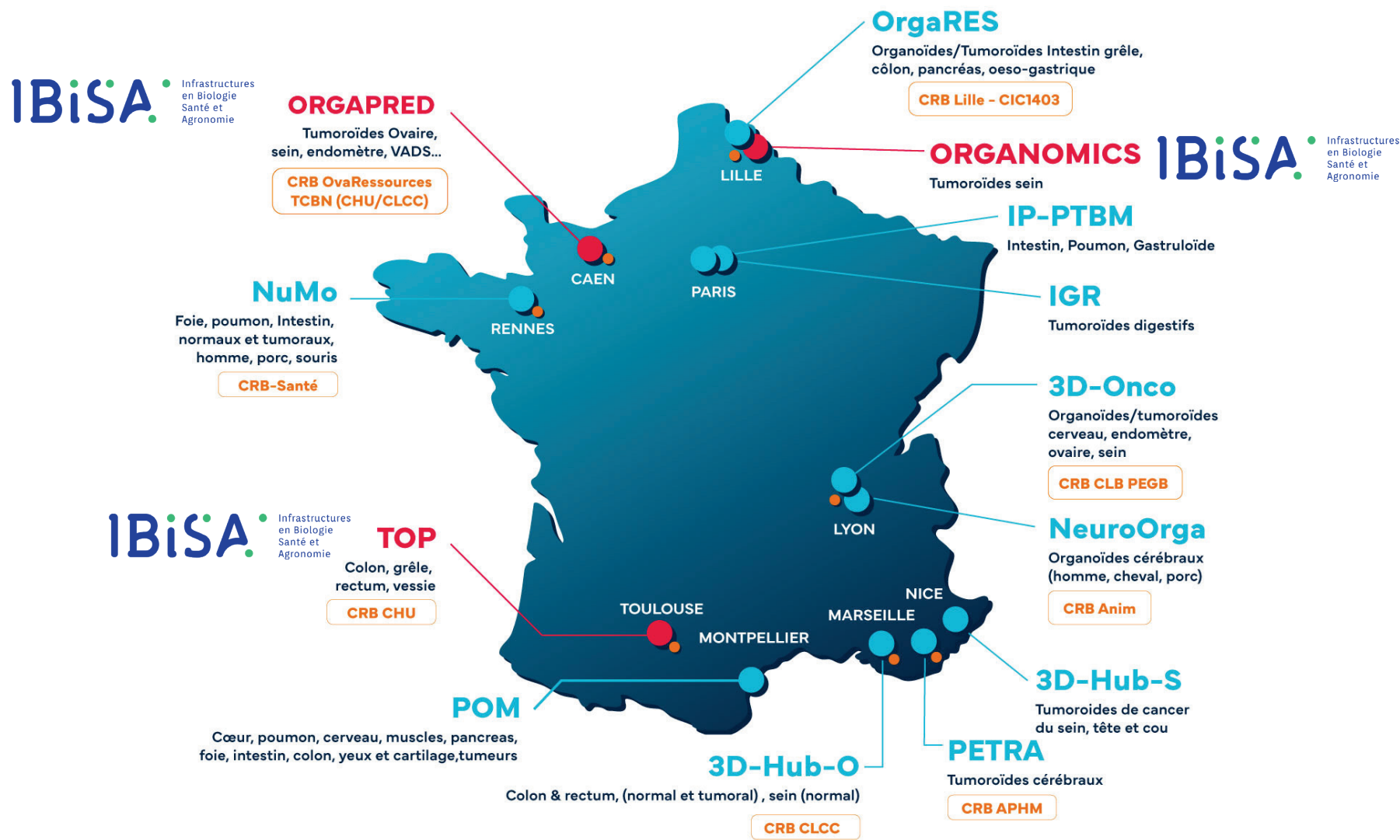
AAP

« Initiatives collectives
et réseaux de partage »

- Mise à disposition de **modèles « contrôlés »**, de savoir-faire, d'équipements de haute technicité, auprès de la communauté scientifique, académique comme industrielle
- **Partage** de savoirs scientifiques et organisationnels, de modèles etc. entre les plateformes et entre les CRB du réseau

Réseau RIBBON : plateformes impliquées

13 Plateformes de production identifiées en France sur 9 sites

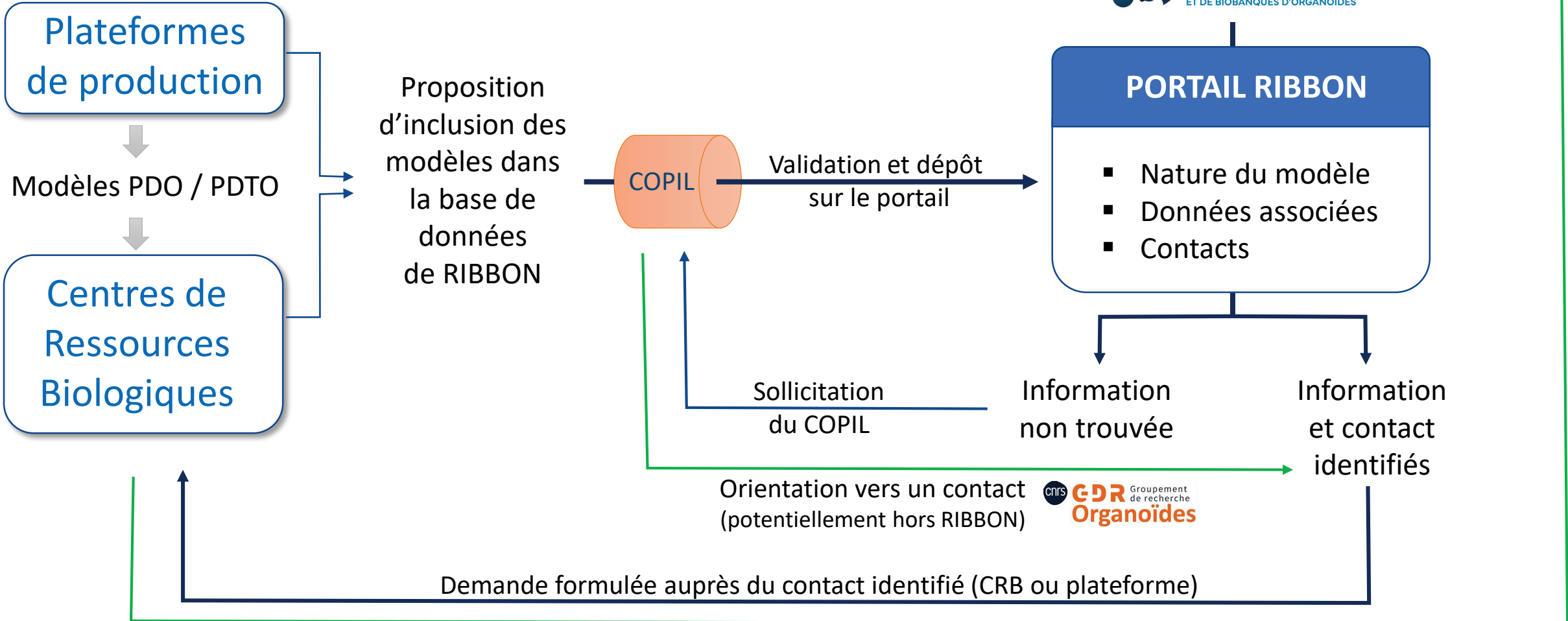


IBiSA • Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie

IBiSA • Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie

IBiSA • Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie

Modalités de fonctionnement



Proposition d'une prestation / collaboration

<https://ribbon.unicaen.fr/>

500 modèles déjà identifiés

Objectif : 50-100 modèles référencés d'ici fin 2024

Portail web

https://ribbon.unicaen.fr

Rechercher

VOUS SOUHAITEZ RECHERCHER UN MODÈLE D'ORGANOÏDE ?

Vous pouvez rechercher un organoïde (à l'aide de l'icône « Rechercher ») et prendre contact avec le CRB et/ou le site de production qui le possède.

Se connecter

La création d'un compte est obligatoire pour enregistrer un organoïde ou une structure.

Pour ce faire : cliquer sur « Se connecter » puis sur « Connexion via SSO ». Cherchez l'établissement (université, INSERM, CNRS) auquel vous appartenez via la barre d'outils. Identifiez-vous.

Si votre établissement n'est pas référencé, vous pourrez obtenir une connexion via un compte CRU en cliquant sur l'onglet connexion qui vous proposera cette possibilité. Le compte CRU peut être créé à partir de cette page avec votre adresse de messagerie professionnelle.

Une demande de validation du compte sera envoyée au groupe pilote du réseau RIBBON gérant l'interface web. Vous pourrez y accéder dès que votre compte aura été validé.

Enregistrer

VOUS SOUHAITEZ ENREGISTRER UN SITE DE PRODUCTION ?

Avant de pouvoir déposer vos modèles, il est nécessaire d'enregistrer votre structure. Pour cela, cliquez sur enregistrer afin de remplir les informations nécessaires.

Lorsque le COPIL aura enregistré votre structure, il vous sera ensuite possible de déposer un ou plusieurs organoïdes en cliquant sur l'icône « Déposer un nouvel organoïde ».

À noter qu'il vous sera demandé la liste des personnes pouvant enregistrer des organoïdes pour le compte de votre structure : ceci nécessite qu'elles possèdent un compte personnel sur le site.

Déposer

VOUS SOUHAITEZ DÉPOSER UN MODÈLE D'ORGANOÏDE ?

Cet enregistrement se fait en cliquant sur l'icône « Déposer ». Nous vous conseillons de vous assurer, au préalable, de pouvoir répondre aux critères de validation (consentement du patient, déclaration de collection CODECOH, etc.). Cependant, l'enregistrement peut se faire en plusieurs temps avant de demander la validation de l'organoïde par le COPIL.

Une fois que cette validation sera effective, votre organoïde apparaîtra dans le listing des organoïdes disponibles. Il vous sera néanmoins toujours possible de procéder à des modifications/ajouts.