

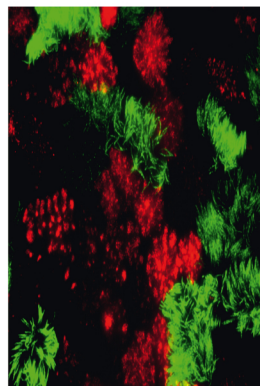
## Les organoïdes pulmonaires

Chloé Bourguignon<sup>1</sup>, Charlotte Vernisse<sup>2</sup>,  
Joffrey Mianné<sup>1</sup>, Mathieu Fieldès<sup>1</sup>, Engi Ahmed<sup>1,3</sup>,  
Aurélie Petit<sup>2</sup>, Isabelle Vachier<sup>2</sup>,  
Thierry Lavabre Bertrand<sup>4</sup>, Said Assou<sup>1</sup>,  
Arnaud Bourdin<sup>2,3</sup>, John De Vos<sup>1,5</sup>

► L'impact en santé publique des pathologies respiratoires chroniques ne cesse de croître. Dans ce contexte, il paraît indispensable d'améliorer les modèles d'études du poumon afin de reproduire au plus proche l'architecture pulmonaire complexe, garante des fonctions d'oxygénation et d'épuration du gaz carbonique. Les connaissances actuelles en physiopathologie respiratoire résultent en partie des études de modèles de reconstitution d'épithélium bronchique *in vitro* à partir de cellules primaires, en deux dimensions sur des inserts, ou en trois dimensions, en organoïdes mimant jusqu'à l'arborescence pulmonaire. Le développement de ces modèles *in vitro* a connu un nouvel essor grâce aux organoïdes pulmonaires issus de cellules souches pluripotentes et la démocratisation des outils d'édition du génome. Ces apports technologiques récents offrent de nouvelles perspectives en matière de thérapeutiques ou de compréhension physiopathologique et pourraient, dans le futur, ouvrir les portes de la médecine régénératrice pulmonaire. ◀

Les pathologies pulmonaires chroniques comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la fibrose pulmonaire primitive, représentent un lourd fardeau en santé publique avec plus de 3 millions de morts par an dans le monde [1]. Cependant, il n'existe aucun traitement curatif à ce jour. La mise au point de modèles pouvant reproduire la complexité architecturale et les fonctionnalités du poumon sont donc un enjeu médical majeur.

Les premiers modèles qui ont contribué à la connaissance du développement, de l'homéostasie et des pathologies du système respiratoire, en dehors des modèles animaux, ont été les cultures organotypiques *in vitro* de tissu pulmonaire [2]. L'avènement plus récent des organoïdes offre un modèle supplémentaire qui pourrait constituer



un tournant dans la modélisation des maladies pulmonaires chroniques et pourrait très significativement accélérer le développement de nouvelles

thérapies. Les organoïdes sont de petits systèmes biologiques structurés en 3 dimensions (3D), résultats de l'auto-organisation des cellules. Ces structures miment *in vitro*, au moins en partie, le développement et la fonction d'un organe en miniature. Ils reproduisent la complexité des types cellulaires et l'organisation de l'organe.

Les premiers organoïdes pulmonaires ont été obtenus à partir de cellules fœtales [3] mais c'est grâce aux cellules souches pluripotentes (CSP) [4] et notamment aux cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS), que leur utilisation a été popularisée, offrant de nouvelles perspectives.

Bien que la définition des organoïdes implique une structure en 3D, la fonction pulmonaire d'interface ouverte sur le milieu extérieur peut être modélisée en 2D de façon légitime, puisqu'une telle organisation est inscrite dans l'architecture de la paroi de la trachée, des bronches, des bronchioles ou des alvéoles. C'est pourquoi cette revue décrira non seulement les organoïdes pulmonaires 3D mais également les épithéliums bronchiques cultivés en 2D, dont les mises au point ont précédé et accompagné celles des structures en 3D.

### Structure et développement pulmonaire : quand complexité rime avec nécessité

L'arbre respiratoire intra-thoracique adulte se divise en deux zones de compositions architecturales et cellulaires bien distinctes qui

<sup>1</sup>IRMB, Univ Montpellier, CHU de Montpellier, Hôpital Saint Eloi, Inserm, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France.

<sup>2</sup>PhyMedExp, Univ Montpellier, CHU de Montpellier, Inserm, Montpellier, France.

<sup>3</sup>Département de pneumologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

<sup>4</sup>Unité de génétique médicale et cytogénétique, CHU de Nîmes, Montpellier, France.

<sup>5</sup>Département d'ingénierie cellulaire et tissulaire, CHU de Montpellier, Montpellier, France. [a-bourdin@chu-montpellier.fr](mailto:a-bourdin@chu-montpellier.fr) [john.devos@inserm.fr](mailto:john.devos@inserm.fr)

répondent à deux impératifs fonctionnels différents : 1) les voies aériennes de conduction (trachée, bronches et bronchioles) pour le transport et la filtration de l'air, et 2) la zone des échanges gazeux (bronchioles respiratoires, canaux alvéolaires, alvéoles) pour l'apport d'oxygène et l'élimination de gaz carbonique. Ces fonctions requièrent un haut degré de spécialisation cellulaire. La trachée, les bronches et les bronchioles constituent des épithéliums cylindriques ou cubiques formant les voies aériennes. Elles garantissent l'humidification de l'air et la protection des zones distales contre les particules inhalées et les agents pathogènes grâce, d'une part aux cellules à mucus (ou cellules caliciformes) sécrétant le mucus qui capte ces mêmes particules, et, d'autre part, aux cellules ciliées qui en assurent la clairance. Les cellules basales sont les progéniteurs de cet épithélium pseudostratifié. Les cellules neuroendocrines, moins nombreuses, régulent la réponse épithéliale face à des stimulus physiologiques, tels que l'hypoxie, tandis que les ionocytes, nouvellement découverts, sont responsables d'une forte activité de transport d'ions chlorures reposant sur la protéine membranaire CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), un canal chlorure dont des mutations sont à l'origine de la mucoviscidose [5]. La fonction de l'épithélium est modulée par la proportion de ces différents types cellulaires, qui varie le long de l'arbre bronchique avec une augmentation de certaines populations rares au niveau des bronchioles terminales, comme les cellules Club qui sécrètent des glycosaminoglycanes et des peptides antimicrobiens. La fonction ventilatoire est réalisée au niveau des sacs alvéolaires grâce aux pneumocytes de type 1 qui tapissent l'alvéole et permettent les échanges gazeux par diffusion avec les capillaires sous-jacents. Les pneumocytes de type 2 synthétisent le surfactant, essentiel pour réduire la tension de surface au niveau des alvéoles. Ils jouent également le rôle de cellules souches et sont capables de se différencier en pneumocytes de type 1.

Cette organisation étagée et complexe est le fruit d'un long développement qui commence dès le début de la période embryonnaire et s'étend jusqu'à plusieurs années après la naissance. On distingue 5 phases de développement, chacune correspondant à des degrés supérieurs de ramification de l'arbre respiratoire : embryonnaire, pseudo-glandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire. La compréhension de la phase embryonnaire est particulièrement instructive pour la mise au point des protocoles de différenciation des cellules souches pluripotentes en épithélium bronchique. Cette phase débute par la mise en place de l'endoderme définitif, qui devient l'intestin primitif et se subdivise en 3 sections selon un axe antéro-postérieur. L'activation de la voie Activine/Nodal est essentielle pour le déroulement de cette étape. Une invagination se forme ensuite au niveau de l'intestin primitif antérieur. Ce bourgeon endodermique envahit alors le mésoderme environnant avec lequel il entretiendra des relations étroites tout au long du développement pulmonaire. Ce bourgeon apparaît dans la partie ventrale de l'intestin primitif antérieur, région caractérisée par l'expression du facteur de transcription NKX2.1 (aussi nommé *thyroid transcription factor 1* ou TTF-1), sous l'influence de l'inhibition des voies de signalisation du TGF- $\beta$  (*transforming growth factors  $\beta$* ) et des protéines morphogénétiques osseuses (BMP, pour *bone morphogenetic protein*).

Les progéniteurs pulmonaires exprimant NKX2.1 suivent ensuite un schéma de différenciation selon un gradient proximo-distal sous l'effet de facteurs de croissance, tels que BMP4, FGF (*fibroblast growth factor*) et WNT, pour donner naissance à l'arbre bronchique proximal et aux alvéoles distales [6]. Le processus d'alvéolisation débute quelques semaines avant la naissance pour s'achever après l'adolescence [7].

Les modèles animaux ont longtemps été la méthode de choix pour étudier le développement pulmonaire, simuler et prédire la réponse biologique face à des agressions externes afin d'anticiper des succès pharmacologiques chez l'homme. Ils ont permis des avancées considérables dans ce domaine [8], mais ces modèles, en plus d'être coûteux, longs et fastidieux à mettre en place, ne sont pas toujours prédictifs des réponses chez l'homme [9] (→).

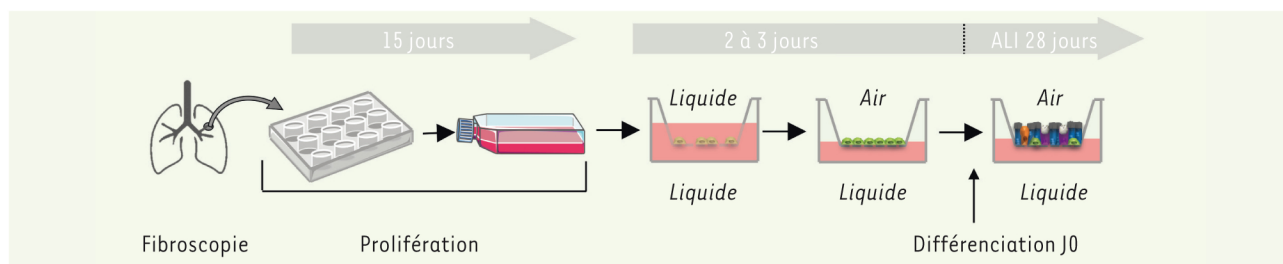
(→) Voir la Synthèse de H. Hardin-Pouzet et S. Morosan, *m/s* n° 2, février 2019, page 153

En effet, il existe des différences structurelles entre le poumon humain et celui des rongeurs. Par exemple, les cellules basales qui permettent le renouvellement épithélial tout au long des voies aériennes chez l'homme, ne sont présentes que dans la trachée chez la souris [10]. Les cellules à mucus sont également moins fréquentes dans les modèles murins [11]. Chez les souris et les rats, la production de surfactant apparaît déjà en place dès le stade sacculaire [12] alors que la maturation des pneumocytes de type 2 dont le surfactant est issu, est bien plus tardive chez l'homme.

## Cellules primaires *in vitro* : de la 2D vers les débuts des organoïdes

### Cellules primaires bronchiques en interface air-liquide : 2-dimensions

La culture *in vitro* de cellules primaires épithéliales bronchiques humaines (CEBH) en interface air-liquide (ALI) est un très bon modèle pour étudier les phénomènes physiopathologiques des voies aériennes : à partir d'une biopsie ou d'un brossage bronchique réalisé lors d'une fibroscopie, les CEBH en ALI permettent de reconstituer un épithélium complet et différencié (*Figure 1*) [13]. Après dissociation mécanique des biopsies, les cellules basales sont amplifiées puis transférées sur une membrane poreuse tendue sur un insert (*Transwell<sup>TM</sup>*). Le milieu nutritif se trouve au pôle baso-latéral, alors que le pôle apical des cellules est au contact de l'air. Les cellules basales, ainsi positionnées à l'interface air-liquide physiologique, se différencient en cellules ciliées et cellules à mucus notamment. En 28 jours de culture ALI, un épithélium différencié et fonctionnel est produit à partir de biopsies de sujets



**Figure 1. Culture ALI obtenue à partir de biopsies bronchiques.** Les biopsies sont dissociées mécaniquement puis repiquées en boîte de Pétri afin d'isoler les cellules basales par adhérence préférentielle. Ces cellules basales prolifèrent pendant plusieurs semaines, puis une phase de différenciation débute lorsqu'on les dépose sur un *Transwell*<sup>®</sup> - une membrane poreuse tendue sur un insert - où elles sont recouvertes de milieu de culture au niveau apical et basolatéral. Après adhérence des cellules, l'interface air-liquide (ALI) est mise en place en aspirant le milieu de culture au niveau apical, exposant à l'air libre la face apicale des cellules, tout en leur permettant de continuer à être nourries par le milieu présent en basolatéral. Ce système ALI reproduit ainsi en culture les conditions naturelles des cellules bronchiques. Une fois le système ALI établi, les cellules basales se différencient et l'épithélium bronchique constitué notamment des cellules ciliées, des cellules caliciformes et des cellules Club, apparaît.

sains ou de patients atteints de pathologies respiratoires. Ce système a été utilisé avec succès pour étudier l'asthme ou les infections virales, par exemple [14]. L'introduction récente d'un nouveau milieu de culture (*Pneumacult*<sup>TM</sup>) a permis de mieux développer les cultures de CEBH en conditions ALI, dans une architecture pseudostratifiée proche de l'architecture 3D de la bronche [15].

### La troisième dimension

Bien que ce modèle permette de reproduire un épithélium pseudo-stratifié *in vitro* et qu'il puisse être enrichi par co-culture avec d'autres types cellulaires [16], la culture de CEBH en conditions ALI ne reproduit pas l'architecture tri-dimensionnelle essentielle pour assurer des interactions et des fonctions cellulaires fidèles aux processus *in vivo* [4]. Certaines équipes ont proposé de combiner ce modèle à une matrice pour créer une 3<sup>e</sup> dimension : broncho-sphères [17], trachéo-sphères [18] ou alvéolo-sphères, en isolant des pneumocytes de type 2 par tri cellulaire [19], voire des structures mimant *in vitro* la ramification des bronches au cours du développement, réalisant ainsi les premiers organoïdes [20]. Les matrices utilisées sont des hydrogels, le plus souvent le *Matrigel*. Celui-ci est une préparation solubilisée extraite du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), une tumeur riche en laminine (60 %), collagène IV (30 %) et entactine (8 %) - cette dernière molécule contribuant à l'organisation structurale en liant la laminine et le collagène. Le *Matrigel* contient également des protéoglycanes héparane sulfate et des facteurs de croissance. Ses propriétés de polymérisation à température ambiante en font une matrice biologiquement et physiquement active semblable à la matrice basale. Notons cependant l'influence favorable de l'ajout de cellules d'origine mésodermique (fibroblastes, cellules endothéliales) pour la structuration et la maturation de ces structures en 3D. Ce type de modèle a permis à Gao *et al.* [17], grâce à des outils d'édition génomique, d'identifier deux facteurs de transcription impliqués dans les processus de ciliogenèse (ZNF750), et de différenciation et de coordination des fonctions de barrière (GRHL2). Un autre exemple d'utilisation de ce modèle, couplé à une approche haut débit en plaques de 384 puits, a montré que l'interleu-

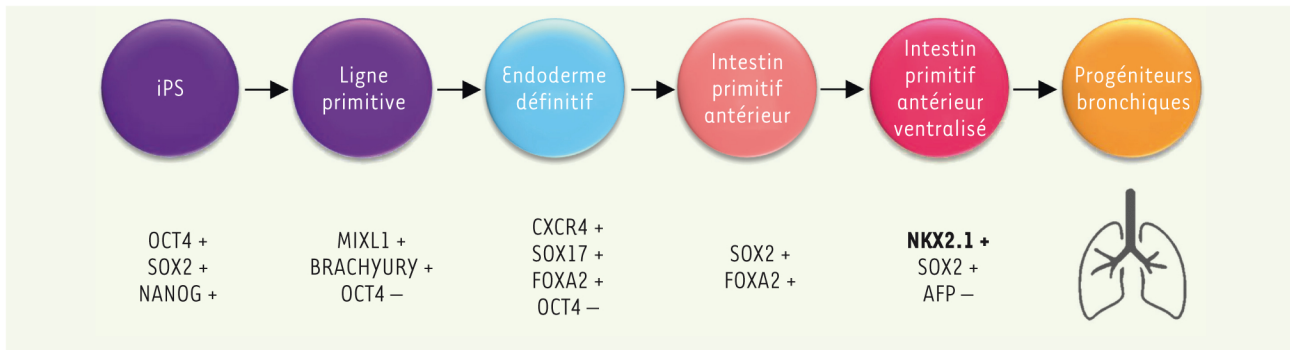
kine 13 induisait la production de mucus, tandis que le blocage du récepteur Notch2 par un anticorps diminuait la proportion de cellules à mucus par rapport aux cellules ciliées [21].

### Organoïdes issus de cellules fœtales

Les cultures en 2 ou 3 dimensions de cellules primaires adultes sont très intéressantes pour étudier les mécanismes physiologiques ou pathologiques survenant à l'âge adulte mais, du fait du stade de différenciation avancé des cellules prélevées, et malgré des processus de transdifférenciation, ces modèles ne sont pas pertinents pour la compréhension des phénomènes intervenant lors du développement pulmonaire. À ce titre, bien que l'accès à ces cellules soit délicat, certains auteurs ont rapporté l'utilisation de cellules pulmonaires fœtales [22, 23]. Les informations issues de ces études sont précieuses : elles montrent que des cellules pulmonaires fœtales prélevées au stade canaliculaire peuvent générer l'ensemble des cellules de l'arbre respiratoire adulte [22] et que ces tissus immatures peuvent être utilisés pour comprendre le développement pulmonaire ou pour mimer *in vitro* la dysplasie broncho-pulmonaire [23].

### Lung on a chip : quand la bio-ingénierie s'en mêle

Afin de contrôler le plus finement possible le micro-environnement cellulaire *in vitro*, l'équipe de Donald Ingber a développé un système micro-fluidique mimant l'interface air-liquide alvéolaire en 3D. Il s'agit d'une fine membrane poreuse et flexible de polydiméthylsiloxane (PDMS), recouverte sur sa face supérieure d'une matrice extra-cellulaire sur laquelle repose une couche de cellules épithéliales alvéolaires au contact de l'air, et, sur sa face inférieure,



**Figure 2. Étapes-clés des protocoles de différenciation pulmonaire à partir de cellules souches pluripotentes, mimant *in vitro* le développement de l'épithélium respiratoire.** iPS : cellules souches pluripotentes induites.

d'une couche de cellules endothéliales immergée dans un milieu de culture [24]. Ce « *lung on a chip* » (ou poumon sur puce) reproduit dans quelques millimètres carrés la complexité et la diversité de l'épithélium pulmonaire. Grâce à un système de pressions négatives mimant les mouvements respiratoires, il a été utilisé pour mettre en évidence l'importance des contraintes mécaniques dans la réponse inflammatoire liée aux nanoparticules de silice. En effet, dans ce modèle, le stress mécanique augmente la capture des particules par les cellules endothéliales et épithéliales, accentuant ainsi les réponses toxiques et inflammatoires induites par les nanoparticules. Cependant, cette technologie n'est, pour le moment, maîtrisée que par une seule équipe.

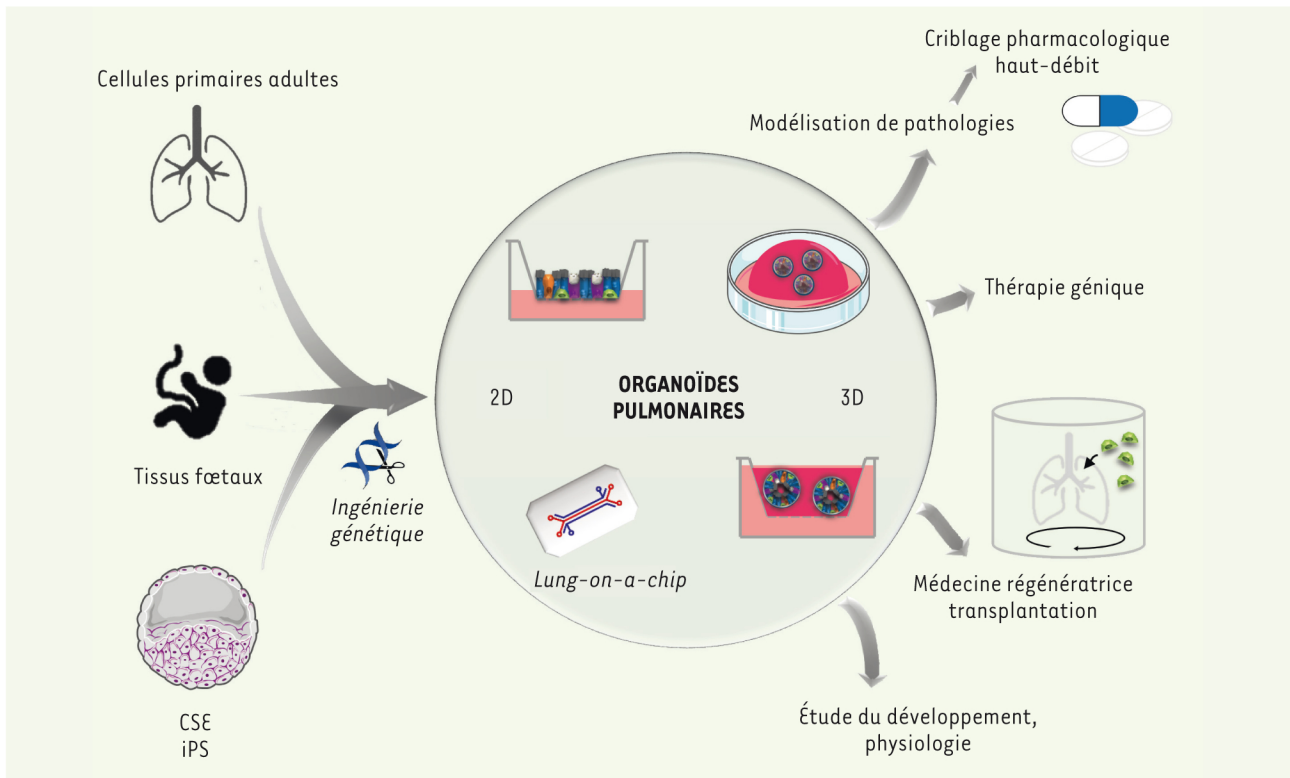
Les cellules primaires bronchiques isolées de tissus adultes ou fœtaux présentent néanmoins un inconvénient majeur : elles ne sont disponibles qu'en quantité très limitée. En effet, elles ne peuvent être obtenues qu'à partir de procédures médicales invasives (fibroscopie) et/ou dans des cadres éthiques restreints (utilisation de tissus fœtaux à visée de recherche). De plus, leur durée de culture limitée, leur faible potentiel de pré-amplification *in vitro* et la grande variabilité interindividuelle sont des limites qui justifient de rechercher d'autres sources cellulaires pour produire des organoïdes.

### Organoïdes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines

Les CSP, les cellules souches embryonnaires humaines ou les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) sont une source alternative très prometteuse [25]. En effet, les CSP ont un potentiel d'auto-renouvellement illimité et peuvent se différencier vers tous les types cellulaires, y compris ceux du système respiratoire. Plusieurs protocoles de culture 2D d'épithéliums respiratoires dérivés de CSP ont été publiés [26-28]. Ils reproduisent *in vitro* les conditions du développement embryonnaire du système respiratoire, intégrant les étapes d'endoderme définitif, d'intestin primitif antérieur ventralisé, puis de progéniteurs pulmonaires (Figure 2), et permettent d'obtenir des épithéliums constitués des principaux types cellulaires bronchiques ou alvéolaires (pour une revue, voir [7]).

Les CSP permettent également de produire des organoïdes 3D. Certaines équipes réalisent les premières étapes de différenciation en culture monocouche 2D [29-32]. Les progéniteurs pulmonaires exprimant NKX2.1 sont ensuite purifiés grâce à des marqueurs membranaires qui leur sont spécifiques – CPM (*carboxypeptidase M*)<sup>+</sup> ou CD47<sup>high</sup>/CD26<sup>low</sup> – avant d'être mis en culture en 3D dans du Matrigel. D'autres équipes préfèrent induire la culture en 3D juste après le stade d'endoderme définitif, passant par un stade de précurseurs organisés en sphéroïdes avant d'induire la structure organoïde [33-35]. L'une des grandes difficultés rencontrées par les équipes travaillant sur la différenciation des CSP en tissu bronchique réside dans le degré de maturité de l'épithélium obtenu : l'aspect morphologique et les données transcriptomiques montrent ainsi souvent des caractéristiques équivalentes à celles de poumons fœtaux [36]. Cet écueil peut-être contourné par la transplantation des cellules dans une souris immunodéficiente afin d'achever la maturation de ces organoïdes *in vivo*, à condition d'y associer, avant la greffe, une niche bioartificielle synthétique en PLG (poly(lactide-co-glycolide)) [34]. L'implémentation du milieu commercial *Pneumacult*<sup>TM</sup>, initialement destiné à la culture de cellules primaires bronchiques en ALI, permet également d'obtenir *in vitro* des organoïdes présentant de nombreuses cellules multi-ciliées suffisamment matures pour permettre des études portant sur les battements ciliaires [30].

D'autres protocoles se concentrent sur la différenciation du compartiment alvéolaire au sein des organoïdes [29, 32]. Ces alvéolo-sphères produisent du surfactant (SFPC), et les cellules qui les constituent présentent des profils d'expression génique proches de celui des pneumocytes de type 2 et possèdent des corps lamellaires. Certaines problématiques restent néanmoins à résoudre, comme l'absence de modélisation de l'interface entre



**Figure 3. Sources cellulaires, types et applications des organoïdes pulmonaires.** CSE : cellules souches embryonnaires ; iPS : cellules souches pluri-potentes induites.

l'épithélium et le tissu sous-jacent (cellules endothéliales et fibroblastiques/mésenchymateuses) au sein des organoïdes. Même si un compartiment de nature mésenchymateuse est parfois présent dans ces modèles, il n'atteint jamais le stade de cellule endothéliale, y compris après greffe *in vivo* [33, 36]. Il sera donc très utile de complexifier le modèle en y intégrant un véritable compartiment mésenchymateux.

### Les organoïdes pulmonaires au service de la médecine

#### D'aujourd'hui

Les organoïdes pulmonaires dérivés de CSP sont des outils puissants. Ils sont capables de modéliser de manière pertinente des maladies génétiques rares touchant le poumon, telles que la mucoviscidose [38] ou le syndrome de Hermansky-Pudlak [39]. L'avènement de la technologie CRISPR/Cas9 démultiplie les possibilités de modélisation de ces pathologies et permet d'imaginer de possibles thérapies géniques [40]. Par ailleurs, les virus à tropisme respiratoire sont à l'origine de lésions majeures, à plus ou moins long terme, au niveau de l'épithélium bronchique. Ces lésions peuvent être reproduites et étudiées sur ces organoïdes, comme par exemple celles induites par un virus parainfluenza, le virus respiratoire syncytial et le virus de la rougeole [41]. Enfin, la modélisation en 2D ou en 3D ouvre une voie majeure pour l'innovation dans le traitement des pathologies respiratoires, en particulier chroniques, telles que la BPCO ou la fibrose pulmonaire. La génération à grande échelle d'organoïdes dérivés d'iPS modélisant

ces pathologies devrait en effet permettre le criblage pharmacologique massif de petites molécules en tenant compte du terrain génétique par la sélection de cellules de patients susceptibles à ces maladies [7].

#### Et de demain

Les travaux réalisés sur les matrices pulmonaires décellularisées et l'ingénierie pulmonaire *ex vivo* pourraient être une alternative au don d'organe issu de patients en état de mort encéphalique [42], seule option thérapeutique actuelle pour les patients atteints d'insuffisance respiratoire chronique. Mais les protocoles de décellularisation des matrices et d'amplification/fonctionnalisation des cellules en bioréacteurs pour produire un organe complet n'en sont qu'à leur balbutiement.

#### Conclusion

Le poumon est un organe complexe et diversifié, tant sur le plan cellulaire que sur le plan structurel. Cette revue des différents modèles d'organoïdes pulmonaires en est le reflet : diversité des sources cellulaires, diversité des architectures, diversité des applications (Figure 3). Les modèles en 2D sont privilégiés pour leur facilité d'utilisation et de suivi. Les modèles en 3D sont eux préférés

pour leur pertinence histologique. Par rapport aux autres sources cellulaires, les CSP donnent accès à tous les stades développementaux et permettent une production quasi infinie d'organoïdes. Associées à la technologie CRISPR, ces cellules offrent ainsi une palette de modèles illimitée. Les pistes d'amélioration des organoïdes pulmonaires intégreront certainement la complexification du modèle avec, en particulier, l'implémentation de vaisseaux, de nerfs, de cellules immunitaires, etc. pour tendre à un système *in vitro* le plus complet possible. Le rôle architectural et paracrine joué par les vaisseaux au cours du développement [43] et de la réparation du poumon est en effet majeur. Outre les « *lung on a chip* » que nous avons évoqués, les co-cultures avec des cellules mésenchymateuses et endothéliales avant greffe chez l'animal immunodéprimé [44] pourraient être une solution. L'amélioration continue des matériaux biocompatibles, notamment des hydrogels modulables à souhait et photo-polymérisables, favorisera très probablement la production de vaisseaux dans ces organoïdes pulmonaires [45]. L'ensemble de ces avancées technologiques seront, sans conteste, à l'origine de grands progrès en pneumologie. ♦

## SUMMARY

### Lung organoids

As burden of chronic respiratory diseases is constantly increasing, improving *in vitro* lung models is essential in order to reproduce as closely as possible the complex pulmonary architecture, responsible for oxygen uptake and carbon dioxide clearance. The study of diseases that affect the respiratory system has benefited from *in vitro* reconstructions of the respiratory epithelium with inserts in air/liquid interface (2D) or in organoids able to mimic up to the arborescence of the respiratory tree (3D). Recent development in the fields of pluripotent stem cells-derived organoids and genome editing technologies has provided new insights to better understand pulmonary diseases and to find new therapeutic perspectives. ♦

## REMERCIEMENTS

Nous remercions la Fondation pour la recherche médicale pour son soutien (financement FDM20170638083).

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- GBD 2017. Causes of death collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet Lond Engl* 2018 ; 392 : 1736–88.
- Ekelund L, Arvidson G, Emanuelsson H, et al. Effect of cortisol on human fetal lung in organ culture: a biochemical, electron-microscopic and autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 1975 ; 163 : 263–72.
- Zimmermann B. Lung organoid culture. *Differ Res Biol Divers* 1987 ; 36 : 86–109.
- Nadkarni RR, Abed S, Draper JS. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2016 ; 473 : 675–82.
- Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 2018 ; 560 : 377–81.
- Dye BR, Miller AJ, Spence JR. How to grow a lung: applying principles of developmental biology to generate lung lineages from human pluripotent stem cells. *Curr Pathobiol Rep* 2016 ; 4 : 47–57.
- Ahmed E, Sansac C, Assou S, et al. Lung development, regeneration and plasticity: from disease physiopathology to drug design using induced pluripotent stem cells. *Pharmacol Ther* 2018 ; 183 : 58–77.
- Morrisey EE, Hogan BLM. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell* 2010 ; 18 : 8–23.
- Hardin-Pouzet H, Morosan S. Organismes-modèles et réglementation de la recherche animale. *Med/Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 153–6.
- Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 1585–91.
- Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 2010 ; 3 : 545–56.
- Jobe AH. Animal models, learning lessons to prevent and treat neonatal chronic lung disease. *Front Med* 2015 ; 2 : 49.
- Gras D, Petit A, Charriot J, et al. Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. *BMC Pulm Med* 2017 ; 17 : 80.
- Kast JI, McFarlane AJ, Głobirńska A, et al. Respiratory syncytial virus infection influences tight junction integrity. *Clin Exp Immunol* 2017 ; 190 : 351–9.
- Rayner RE, Makena P, Prasad GL, et al. Optimization of normal human bronchial epithelial (NHBE) cell 3D cultures for in vitro lung model studies. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 500.
- Gras D, Martinez-Anton A, Bourdin A, et al. Human bronchial epithelium orchestrates dendritic cell activation in severe asthma. *Eur Respir J* 2017 ; 49.
- Gao X, Bali AS, Randell SH, et al. GRHL2 coordinates regeneration of a polarized mucociliary epithelium from basal stem cells. *J Cell Biol* 2015 ; 211 : 669–82.
- Rock JR, Gao X, Xue Y, et al. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2011 ; 8 : 639–48.
- Barkauskas CE, Crouce MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 2013 ; 123 : 3025–36.
- Franzödtir SR, Axelsson IT, Arason AJ, et al. Airway branching morphogenesis in three dimensional culture. *Respir Res* 2010 ; 11 : 162.
- Danahay H, Pessotti AD, Coote J, et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep* 2015 ; 10 : 239–52.
- Rosen C, Shezen E, Aronovich A, et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice. *Nat Med* 2015 ; 21 : 869–79.
- Sucre JMS, Vijayaraj P, Aros CJ, et al. Posttranslational modification of  $\beta$ -catenin is associated with pathogenic fibroblastic changes in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017 ; 312 : L186–95.
- Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010 ; 328 : 1662–8.
- De Vos J, Bouckenheimer J, Sansac C, et al. Human induced pluripotent stem cells: a disruptive innovation. *Curr Res Transl Med* 2016 ; 64 : 91–6.
- Firth AL, Dargitz CT, Qualls SJ, et al. Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E1723–30.
- Huang SXL, Green MD, de Carvalho AT, et al. The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2015 ; 10 : 413–25.
- Wong AP, Bear CE, Chin S, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 876–82.
- Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, et al. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2014 ; 3 : 394–403.
- Konishi S, Gotoh S, Tateishi K, et al. Directed induction of functional multiciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2016 ; 6 : 18–25.
- McCauley KB, Hawkins F, Kotton DN. Derivation of epithelial-only airway organoids from human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2018 ; 45 : e51.
- Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods* 2017 ; 14 : 1097–106.
- Chen YW, Huang SX, de Carvalho ALRT, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 : 542–9.

## RÉFÉRENCES

34. Dye BR, Dedhia PH, Miller AJ, *et al.* A bioengineered niche promotes *in vivo* engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *eLife* 2016 ; 5.
  35. Miller AJ, Hill DR, Nagy MS, *et al.* *In vitro* induction and *in vivo* engraftment of lung bud tip progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2018 ; 10 : 101-19.
  36. Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, *et al.* *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife* 2015 ; 4.
  37. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, *et al.* Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 2018 ; 556 : 239-43.
  38. McCauley KB, Hawkins F, Serra M, *et al.* Efficient derivation of functional human airway epithelium from pluripotent stem cells via temporal regulation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell* 2017 ; 20 : 844-57.e6.
  39. Strikoudis A, Cieslak A, Loffredo L, *et al.* Modeling of Fibrotic Lung Disease Using 3D Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 2019 ; 27 : 3709-23.e5.
  40. Mianné J, Ahmed E, Bourguignon C, *et al.* Induced pluripotent stem cells for primary ciliary dyskinesia modeling and personalized medicine. *Am. J Respir Cell Mol Biol* 2018 ; 59 : 672-83.
  41. Porotto M, Ferren M, Chen YW, *et al.* Authentic modeling of human respiratory virus infection in human pluripotent stem cell-derived lung organoids. *mBio* 2019 ; 10.
  42. Gilpin SE, Wagner DE. Acellular human lung scaffolds to model lung disease and tissue regeneration. *Eur Respir Rev* 2018 ; 27.
  43. Peng T, Tian Y, Boogerd CJ, *et al.* Coordination of heart and lung co-development by a multipotent cardiopulmonary progenitor. *Nature* 2013 ; 500 : 589-92.
  44. Takebe T, Sekine K, Enomura M, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013 ; 499 : 481-4.
  45. Grigoryan B, Paulsen SJ, Corbett DC, *et al.* Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science* 2019 ; 364 : 458-64.
-