

Production d'organoïdes tumoraux 3D par la technologie des capsules cellulaires TCC

Gaëlle Recher, Amaël Mombereau, Adeline Boyreau, Pierre Nassoy, Laëtitia Andrique

▶ **To cite this version:**

Gaëlle Recher, Amaël Mombereau, Adeline Boyreau, Pierre Nassoy, Laëtitia Andrique. Production d'organoïdes tumoraux 3D par la technologie des capsules cellulaires TCC. Bulletin du Cancer, 2022, 109 (1), pp.38-48. 10.1016/j.bulcan.2021.12.001 . hal-03853870

HAL Id: hal-03853870
https://hal.science/hal-03853870

Submitted on 29 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Bulletin du Cancer

Technique d'encapsulation cellulaire et modèles cellulaires 3D d'organoïdes tumoraux

--Projet de manuscrit--

Numéro du manuscrit:	BULCAN-D-21-00638
Type d'article:	Synthèse / Review Article
Section/Catégorie:	Actualités 2021 à paraître en 2022
Mots-clés:	organoïdes, sphéroïdes, culture 3D, alginate, capsule
Auteur correspondant:	Laetitia Andrique, PhD CNRS Bordeaux, Aquitaine FRANCE
Premier auteur:	Gaëlle Recher
Ordre des auteurs:	Gaëlle Recher
	Amaël Mombereau
	Adeline Boyreau
	Pierre Nassoy
	Laetitia Andrique, PhD
Résumé:	Les cultures cellulaires en monocouche de lignées tumorales ou de cellules primaires de patients ont longtemps été un modèle in vitro de choix en oncologie. Ces modèles ont notamment permis de décrypter des mécanismes déterminants de la prolifération tumorale et l'invasion. Il est aujourd'hui admis que ces modèles 2D sont insuffisants car ils ne prennent pas en compte l'organisation spatiale des cellules et leurs interactions entre elles ou avec la matrice extracellulaire. Dans le cadre du cancer, il y a un besoin indéniable de développer de nouveaux modèles 3D (tumoroïdes) en vue d'obtenir une meilleure compréhension du développement de ces pathologies mais également pour tester la pénétration de drogues à travers un tissu et la réponse cellulaire associée. Nous présentons ici, la technologie des capsules cellulaires (TCC), qui permet de produire différents modèles de tumoroïdes : des modèles de cultures 3D simples ou plus complexes par co-culture de cellules tumorales avec des composants du microenvironnement (fibroblastes, matrice etc). Le développement de ces nouveaux systèmes de cultures en volume permet aujourd'hui de proposer des modèles physiopathologiques plus pertinents qui faciliteront la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.
Évaluateurs suggérés:	christophe lamaze Institut Curie christophe.lamaze@curie.fr utilisateur des modèles d'encapsulation cellulaire pour faire des tumoroides complexes
	charlotte rivière Institut Lumière Matière: Institut Lumiere Matiere charlotte.riviere@univ-lyon1.fr Charlotte Rivière fait partie du réseau organoide et utilise des technologies différentes des notres pour faire ses organoides. elle aura un oeil critique sur cette technologie qu'elle n'utilise pas

Activé par Editorial Manager® et ProduXion Manager® depuis Aries Systems Corporation

Titre français

Technique d'encapsulation cellulaire et modèles cellulaires 3D d'organoïdes tumoraux

Title anglais

The cellular capsule technology and 3D tumor organoid cell models

Auteurs

Gaëlle RECHER[1-2], Amaël MOMBEREAU[1-2], Adeline BOYREAU[1-2], Pierre NASSOY[1-2] et Laëtitia ANDRIQUE[3]

Affiliations

[1] Université de Bordeaux, Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, UMR 5298, 33400 Talence, France.

[2] Institut d'Optique & Centre National de la Recherche Scientifique, LP2N, UMR 5298, 33400 Talence, France

[3] Plateforme VoxCell, UMS TBMcore 3427, 146 rue Léo Saignat, Bâtiment 1A 2e étage, 33076 Bordeaux, France.

Auteurs pour correspondance

Laetitia Andrique : Tel : 05 57 57 48 78 Mail: laetitia.andrique@u-bordeaux.fr

Manuscrit (sans details des auteurs) / Manuscript (no author details)

Click here to view linked References

Résumé

Les cultures cellulaires en monocouche de lignées tumorales ou de cellules primaires de patients ont longtemps été un modèle in vitro de choix en oncologie. Ces modèles ont notamment permis de décrypter des mécanismes déterminants de la prolifération tumorale et l'invasion. Il est aujourd'hui admis que ces modèles 2D sont insuffisants car ils ne prennent pas en compte l'organisation spatiale des cellules et leurs interactions entre elles ou avec la matrice extracellulaire. Dans le cadre du cancer, il y a un besoin indéniable de développer de nouveaux modèles 3D (tumoroïdes) en vue d'obtenir une meilleure compréhension du développement de ces pathologies mais également pour tester la pénétration de drogues à travers un tissu et la réponse cellulaire associée. Nous présentons ici, la technologie des capsules cellulaires (TCC), qui permet de produire différents modèles de tumoroïdes : des modèles de cultures 3D simples ou plus complexes par co-culture de cellules tumorales avec des composants du microenvironnement (fibroblastes, matrice etc). Le développement de ces nouveaux systèmes de cultures en volume permet aujourd'hui de proposer des modèles physiopathologiques plus pertinents qui faciliteront la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

Abstract

Monolayer cultures of cell lines and derived-patient cells have long been the in vitro model of choice in oncology. In particular, these models have made it possible to decipher the mechanisms that determine tumor proliferation and invasion. However these 2D models are insufficient because they do not take into account the spatial organization of cells and their interactions with each other or with the extracellular matrix. In the context of cancer, there is a need to develop new 3D (tumoroid) models in order to gain a better understanding of the development of these pathologies but also to assess the penetration of drugs through a tissue and the associated cellular response. We present here the cell capsule technology (CCT), which allows the production of different tumoroid models: simple or more complex 3D culture models including co-culture of tumor cells with components of the microenvironment (fibroblasts, matrix etc). The development of these new 3D culture systems now makes it possible to propose refined physiopathological models that will allow the implementation of improved targeted therapeutic strategies.

Mots clé: organoïdes, sphéroïdes, culture 3D, alginate, capsule

Key words: organoids, spheroids, 3D culture, alginate, capsule

INTRODUCTION

Les modèles de cultures cellulaires en 3 dimensions (3D) ont émergé dans les 15 dernières années et sont devenus une référence dans le domaine de la culture cellulaire afin de reproduire les fonctions et l'architecture d'un tissu au plus proche de la physiologie. Ils sont utilisés à la fois en recherche fondamentale, par exemple pour la compréhension de l'organogenèse, mais également en pharmacologie pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, il est maintenant bien accepté que des cultures en 2 dimensions (2D) sur fond en plastique conduisent à des comportements cellulaires artéfactuels [1]. Elles récapitulent de manière incomplète les interactions entre cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire et ne permettent donc pas de caractériser la capacité d'une substance active à diffuser au sein d'un tissu ou d'un organe.

Il existe aujourd'hui de nombreuses techniques d'assemblage de cellules en 3D qui génèrent des structures nommés **organoïdes** qui sont, par définition, des agrégats cellulaires ayant des propriétés mimant celles d'un mini-organe (reins, cerveau, intestins etc) [2–4]. La formation d'un organoïde pertinent dépendra donc de plusieurs paramètres, parmi lesquels l'origine des cellules choisies (cellules souches embryonnaires ou induites à la pluripotence, cellules primaires) et la technologie permettant de les produire avec de plus en plus de modèles qui reposent sur les capacités remarquables d'auto-assemblage des cellules. Dans la plupart des cas, les cellules proviennent de biopsies de patients, généralement des épithéliums, obtenus après dissociation mécanique et/ou enzymatique du tissu et purification des cellules afin d'éliminer la matrice extracellulaire (collagène, laminine etc) ainsi que les cellules du stroma (cellules du système immunitaire, fibroblastes etc) [5].

Il est à noter cependant que l'acceptation de la définition d'un organoïde n'est pas unanime. Pour exemple, **Hans Clevers**, un pionnier dans la culture d'épithélium en 3D, définit un organoïde comme une structure 3D provenant de cellules souches qui se sont transformées en cellules spécifiques d'un organe par auto-organisation et différenciation [6]. **Mina Bissel**, largement connue pour ses travaux sur le cancer du sein et ses modèles 3D associés, est moins restrictive et définit un organoïde comme une culture 3D dérivée de cellules primaires de patient, de cellules embryonnaires ou d'IPS (cellules souches pluripotentes induites) qui sont capables d'auto-renouvellement et auto-organisation en un tissu fonctionnellement proche du tissu d'origine [7].

Dans le cadre du cancer, les cellules peuvent provenir de cellules souches sauvages qui seront ensuite modifiées in vitro par surexpression d'oncogènes (tels que RAS, MYC) ou inhibition de suppresseurs de tumeurs (par exemple p53-/-). Les structures 3D obtenues sont alors appelées **tumoroïdes**. Pourtant, la complexité des modifications génétiques observées dans les cancers par

séquençage haut débit et qui sont dues à des évènements multiples, en fait des modèles difficiles à reproduire. Il est alors possible de produire des tumoroïdes à partir de lignées cellulaires déjà existantes ou de biopsies tumorales de patients. Dans le cas d'une modélisation en 3D de la tumeur du patient lui-même, il est facile de comprendre l'engouement de ce genre de modèles par la communauté scientifique, avec des tests pharmacologiques ciblés et une médecine personnalisée à la clé [8]. Dans le cas de l'utilisation de lignées, il convient alors de parler de **sphéroïdes multicellulaires**, introduits dès les années 1980 [9], mais peu répandus à cause des difficultés liées à leur observation [10] et plus encore à leur formation.

Historiquement, la recherche en oncologie sur des systèmes 3D a commencé par l'utilisation de sphéroïdes tumoraux multicellulaires. Ces agrégats étaient classiquement préparés par la technique de « gouttes pendantes » (*Hanging drop*) [11] ou par culture dans des boites à fond en U non-adhérentes (*Floated-forced methods*) [12]. Les sphéroïdes obtenus présentent pourtant quelques inconvénients : 1/ le processus de formation, manuel, est généralement long (10 à 15 jours) ; 2/ leur structure sphérique ne représente pas forcément la complexité du tissu d'origine (invagination, épithélium stratifié, cyste etc), 3/ et ils sont généralement de grande taille (plusieurs centaines de microns de diamètre) ce qui induit un différentiel de diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein du sphéroïde et ainsi l'apparition d'une structuration avec un cœur nécrotique, une couche de cellules quiescentes et une périphérie prolifératives [13–15]. En effet, en absence de vascularisation, l'oxygène ne pénètre pas au-delà d'une centaine de microns à l'intérieur des tissus 3D produits in vitro, limitant fortement leur utilisation, notamment pour des tests pharmacologiques où l'efficacité des substances actives sera difficile à quantifier puisque couplée à une mort cellulaire par insuffisance de nutriments.

Avec l'avènement des techniques de microfabrication et microfluidique appliquées à la biologie, les stratégies de production de sphéroïdes ou tumoroïdes 3D ont évolué et permettent de complexifier la composition des « mini-tumeurs » modèles dans le but d'en améliorer la pertinence physiopathologique. Dans ce contexte, l'équipe « BioImagerie et Optofluidique » (BiOf) du laboratoire LP2N de l'Institut d'Optique à Bordeaux, s'est inspirée des perles de saveurs en cuisine moléculaire [16], et a développé une technologie de co-extrusion microfluidique permettant la production de microcapsules d'alginate creuses contenant des cellules [17,18]. Brièvement, une solution d'alginate liquide ainsi qu'une suspension de cellules sont co-extrudées par l'extrémité d'une puce de microfluidique, sous la forme d'un jet qui se fragmente en un train de gouttes composites au dessus d'un bain de calcium. Le calcium, agent réticulant de l'alginate, permet la gélification de l'alginate sous forme d'une sphère creuse (structure cœur aqueux-coque en hydrogel) encapsulant les cellules.

Cette technologie, décrite ici plus en détails, présente plusieurs avantages sur les techniques classiques mentionnées précédemment. Tout d'abord, la taille des capsules fixe la taille des tumoroïdes encapsulés après prolifération. En utilisant des puces dont le diamètre de l'embout est de l'ordre de 200 µm, nous obtenons des capsules dont le rayon sera du même ordre. On évite ainsi l'apparition d'un cœur nécrotique causé par l'insuffisance d'oxygène au centre. Par ailleurs, l'alginate est un hydrogel biocompatible et poreux qui laisse passer l'oxygène et les nutriments afin de maintenir une culture à long terme des cellules encapsulées. L'alginate est aussi un hydrogel visco-élastique dont nous pouvons moduler à façon l'épaisseur de la coque et la concentration afin de modifier la rigidité perçue par les cellules, et donc conduire des expériences de mécanotransduction en 3D. Enfin, grâce à cette technologie, nous pouvons produire des capsules 3D à très haut débit (~ 350 000 capsules en 2 minutes) et il est possible de complexifier les modèles tumoraux en réalisant des co-cultures de cellules tumorales et des cellules du microenvironnement (fibroblastes, cellules immunitaires) en présence ou non de matrice extracellulaire (Matrigel®, collagène).

1 LA TECHNOLOGIE DES CAPSULES CELLULAIRES (TCC)

La technologie d'encapsulation cellulaire TCC (*Cellular Capsule Technology CCT*), dans son principe général, a été développée simultanément mais indépendamment par trois groupes en 2013 [17,19,20]. Plus précisément, nous présentons ici la forme développée dans l'équipe BiOf de Bordeaux et que la plateforme VoxCell propose aux laboratoires. Le principe repose sur une co-extrusion de 3 solutions, en même temps mais à des débits variables, à travers une puce de microfluidique fabriquée par impression 3D stéréolithographique (**Fig 1A**). Une pompe de précision dirige l'injection de ces solutions dont la suspension cellulaire au centre de la puce (SC), et la solution d'alginate autour (AL). Une solution intermédiaire (SI) neutre est constituée de Sorbitol, avec une osmolarité proche de celle de la suspension de cellules (300 mM) mais sans calcium, et elle permet d'éviter la diffusion des ions calcium relargués par les cellules vers l'alginate, ce qui provoquerait un bouchage de la puce et l'interruption de la formation des gouttes. Le compartiment de la suspension cellulaire est refroidi (+4°C), ce qui permet de rajouter de la matrice extracellulaire à l'état liquide en cas de besoin (Matrigel®, collagène). La solution d'alginate est chargée négativement par un générateur de tension. Les 3 solutions sortent par la pointe de la puce de microfluidique (d'une taille de l'ordre de 200 µm de diamètre). La fragmentation rapide du jet en gouttelettes conduit à la formation d'un train de gouttes qui passent au milieu d'un anneau de cuivre. Le champ électrique provoque la dispersion des gouttes chargées de même signe et réduit ainsi le risque de coalescence de gouttes, donc de polydispersité (i.e. formation de petites et grosses capsules). Lorsque les gouttes atterrissent dans le bain de calcium ($CaCl_2$ 100 mM), elles subissent une gélification quasi-

instantanée, car le calcium est chélaté par les chaines d'alginate. On forme ainsi des capsules d'environ 200 µm de diamètre. Comme représenté sur la figure 1B, il est à noter que les capsules ne sont pas parfaitement sphériques mais présentent une « queue » ou « pointe », qui provient de l'impact des gouttes avec la surface du bain de calcium.

Cette technologie est tout d'abord caractérisée par ses capacités de production à très haut débit massive et rapide d'organoïdes 3D (environ 350 000 capsules par encapsulation de quelques minutes). De plus, la technique offre une versatilité qui permet de varier la composition cellulaire, la taille des capsules, leur rigidité et d'introduire des composantes de la matrice extracellulaire pour s'adapter au mieux à la question biologique posée.

Composition de la capsule : l'alginate

L'alginate est un polysaccharide extrait d'algues brunes qui est constitué de chaines polymériques dont les unités monomériques sont l'acide mannuronique (M) et l'acide guluronique (G). La proportion de chacun de ces deux monomères M et G ainsi que leur arrangement tout au long de la chaine du polymère déterminent les propriétés intrinsèques de l'hydrogel formé après réticulation. Ainsi, une fois dissout dans l'eau, l'alginate de sodium donne une solution dont la viscosité augmente avec la concentration. Il faut trouver un compromis car des concentrations faibles (typiquement <1%) donnent des capsules faciles à former, très souples mais fragiles, tandis que des concentrations élevées (typiquement >3%) exigent des pressions de co-extrusion élevées, rendant l'opération plus délicate et donnent des capsules rigides et résistantes. De manière générale, la réticulation de l'alginate en hydrogel est ionique et se fait en présence de cations bivalents (tels que Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}). Comme il ne s'agit pas d'une réaction covalente, il est possible de dissoudre le gel en ajoutant un chélateur des cations divalents. Pour des applications biologiques, le choix des ions calcium est le plus courant, car il est le plus représenté dans l'environnement cellulaire et déjà présent dans les milieux de culture. En présence de calcium, l'hydrogel forme un réseau polymérique poreux compatible avec une culture cellulaire à long terme car sa taille de maille (dépendante de la concentration, mais de l'ordre de 20 nm) laisse passer l'oxygène et les nutriments.

Taille/rigidité des capsules

La taille des capsules est déterminée par la taille de la pointe de la puce de co-extrusion, par laquelle les gouttes vont se former. Elle est donc modulable d'une encapsulation à une autre en changeant de puce. Puisque la distance critique de diffusion de l'oxygène au sein d'un tissu est de l'ordre de 300 µm, nous produisons le plus souvent des capsules un peu plus petites (entre 150 à 250 µm de diamètre) pour éviter la formation de cœur nécrotique. Les cellules encapsulées

prolifèrent jusqu'à remplir la capsule. Cet état est désigné par le terme de confluence 3D, similaire à la confluence en boîte de Pétri. Si la capsule est trop fine, l'accroissement de volume par prolifération cellulaire génère une dilatation de la capsule et peut même conduire à son explosion [17]. Pour éviter cela, il suffit d'augmenter l'épaisseur de la coque de la capsule en modulant les débits des différentes solutions d'extrusion. Cette augmentation d'épaisseur de coque se traduit par l'obtention de capsules plus rigides, mimant ainsi un environnement cellulaire plus rigide, et ouvrant la voie à des études de mécanotransduction en 3D. En plus de l'épaisseur de la coque, on peut aussi utiliser des alginates à plus forte proportion de l'unité G ou augmenter la concentration d'alginate pour rendre la capsule plus rigide. La pression ressentie par les cellules au moment de la confluence dans la capsule dépend de la rigidité de celle-ci, ce qui est susceptible de générer des réponses cellulaires différentes. Cet aspect est particulièrement pertinent en oncologie car des modifications de rigidité de la matrice extracellulaire ont été observées dans les niches pré-métastatiques des tumeurs solides [21–23]. Ce serait un des mécanismes l'origine du départ des cellules cancéreuses en vue d'invasion de tissus éloignés. Ce modèle de production de tumoroïdes 3D est donc tout à fait adapté pour étudier le rôle du microenvironnement cellulaire dans le déclenchement de métastases et en fait un modèle plus pertinent que de simples sphéroïdes nus [15].

La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est généralement composée d'un réseau complexe de macromolécules assemblées en 3D qui ont des propriétés biochimiques (libération de cytokines) et biomécaniques (cellules et molécules de soutien) et qui régulent la survie cellulaire, la croissance, la motilité et la différenciation. Elle est sécrétée par les cellules tumorales elles-mêmes et par les cellules du microenvironnement (en particulier des fibroblastes qu'on appelle CAFs ou « *cancer-associated fibroblasts* »). La matrice régule le développement et l'homéostasie du tissu qu'elle entoure, et des changements drastiques de celle-ci peuvent apparaitre au cours du développement ou de la tumorigenèse. En effet, la fibronectine, le collagène ou encore des proteoglycanes sont souvent retrouvés surexprimés dans les tissus environnants de tumeurs [21–23] et sont responsables de l'activation de la transition epithélio-mésenchymateuse (TEM) et de l'invasion cellulaire.

Il est possible avec le modèle des capsules cellulaires, de rajouter des composants de la matrice (Matrigel®, collagène, laminine) directement dans la suspension cellulaire (SC) au moment de l'encapsulation. Pour des raisons d'affinité chimique, la matrice s'agrège en une fine couche le long de la paroi interne de la capsule d'alginate. Alors que l'alginate natif est non-adhérent pour les cellules, la couche de matrice sert de support pour l'adhésion et la croissance des cellules. Dans le

cadre du cancer, les modifications de matrice sont intéressantes 1/ pour étudier leur rôle dans la prolifération et l'invasion tumorale en 3D, mais également 2/ pour faire des modèles d'épithélium creux avec une lumière au centre (cystes mammaires, épithélium intestinaux etc).

La composition cellulaire/microenvironnement

Dans son principe même, la TCC permet de varier les paramètres des principales solutions co-extrudées, à savoir la solution d'alginate comme on vient de le voir. Mais il est aussi envisageable de varier la composition de la suspension cellulaire pour essayer de récapituler des micro-tumeurs in vitro mimant une grande variété de sous-types tumoraux. Les mono-cultures simples de tumeurs solides (carcinomes, sarcomes) ont été beaucoup étudiées à l'aide des techniques classiques de formation de sphéroïdes (telles que la goutte pendante). A ce niveau, le seul avantage de la TCC est la production à haut débit. En revanche, pour des cellules non-adhérentes, l'effet de compartimentalisation procurée par la TCC permet de manière unique de former des cultures 3D modélisant les tumeurs « liquides » (lymphomes, leucémies). De plus, en ajoutant des cellules du microenvironnement (CAFs, cellules du système immunitaire) et des composants de la matrice extracellulaire, les modèles 3D deviennent des modèles de co-cultures plus complexes et éventuellement plus pertinents. Les différents modèles qu'il est possible d'obtenir par cette technologie (**Fig 1B**) sont présentés ci-après et illustrés par quelques réalisations.

2 LES MODELES DE TUMOROÏDES 3D

2-1 Mono-cultures 3D de cellules tumorales

Les mono-cultures 3D de cellules encapsulées (primaires de patients ou de lignées), permettent de créer des modèles très variés reproduisant des tissus 3D simples : avec la TCC, de nombreuses cellules de **tumeurs solides** ont été déjà été encapsulées avec succès (**Fig 1B modèle #1 et Fig 2A/2B**): carcinome rénal (293T, Renca), Hépatoblastomes (cellules primaires, HuH-6, HuH-7, HepG2, Hep3B), carcinome colo-rectal (HT-29), glioblastomes (cellules primaires, GBM U87). De plus, de nombreuses tumeurs malignes dont l'origine des cellules vient du **système lymphatique B et T** ont également été encapsulées (cellules primaires, HLY-1, DOHH2, SUDHL4, **Fig 2F**). Concernant ces cellules non-adhérentes, leur culture se fait généralement en 2D, et les quelques modèles 3D qui existent sont des agrégats multicellulaires difficiles à manipuler et à imager [24–26]. L'encapsulation permet de les faire pousser dans un environnement clos, équivalent à un mini-bioréacteur, qui facilite leur manipulation mais également permet de les imager en petits groupes, ce qui n'est généralement pas évident pour ce type de cellules.

Ces modèles de mono-cultures tumorales en 3D sont utiles pour étudier de nombreux phénomènes en lien avec le cancer, comme la prolifération, l'invasion ou encore les tests de diffusion de drogues. Concernant la prolifération, il a d'ailleurs été montré que la mise sous confinement et pression de tumeurs solides augmente la production de matrice et rend les cellules en périphérie très motiles, leur conférant même un phénotype invasif [15,27].

Dans ces modèles de sphéroïdes, la croissance se fait par agrégation cellulaire au centre de la capsule, comme ce serait le cas sur des plaques « *ultra-low attachment* ». En ajoutant de la matrice extra-cellulaire (Matrigel®, collagène) cela force l'ancrage des cellules aux parois internes de la coque. Avec des cellules épithéliales (MDCK, MCF7, etc) on forme des épithéliums creux tumoraux avec une lumière au centre [28] (**Fig 1B modèle #2 et Fig 2C et 2D**). Ces modèles épithéliaux encapsulés, se forment très rapidement (1 à 3 jours) ce qui représente un avantage considérable par rapport aux techniques classiques de formation d'épithélium en 3D enfouis dans du Matrigel® qui nécessitent des semaines de culture [29]. De plus, ils s'auto-organisent avec une orientation apico-basale des cellules et des jonctions cellulaires serrées, et permettent de modéliser des tumeurs provenant d'épithéliums intestinaux, pulmonaires, ou de l'estomac, ou encore des cystes mammaires (ou acini).

2-2 Co-cultures 3D de cellules tumorales et du microenvironnement

Dans le cadre des tumeurs solides, les cellules tumorales sont entourées de fibroblastes et de cellules du système immunitaire. Les CAFs sont des composants importants de l'environnement cellulaire, qui évoluent en même temps que les cellules tumorales et bien que les mécanismes ne soient pas tous identifiés aujourd'hui, il est admis qu'ils jouent un rôle majeur dans l'évolution de la maladie. Ces fibroblastes sécrètent de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance et des chimiokines, et ils servent également de support physique à la tumeur solide [30,31]. Les interactions physiques entre les cellules tumorales et les fibroblastes sont donc primordiales et évoluent au cours de la progression tumorale.

Afin de comprendre le rôle des CAFs dans les niches pré-métastatiques de tumeurs solides, des cellules de carcinome de colon (HT29) et des fibroblastes humains ont été co-encapsulés. L'interaction entre les cellules a pu être étudiée et imagée en 3D par microscopie confocale (modèle #3 et **Fig 2E)**. Alors que les affinités adhésives des deux types de cellules favorisent la ségrégation en deux sphéroïdes côte-à-côte tant que le confinement de la capsule ne se fait pas sentir, une fois la confluence 3D atteinte, la compression qui en résulte déclenche l'étalement des fibroblastes autour des cellules cancéreuses (Bertillot et al. Soumis) [32]. De manière remarquable, cette organisation spécifique est similaire à celle observée sur des tranches de carcinome de colon.

Cela suggère que l'organisation cellulaire des carcinomes de colon résulte en partie de l'action de forces mécaniques.

Tout comme pour les tumeurs solides, les cellules stromales jouent un rôle majeur dans le développement des tumeurs dites « liquides » avec des niches tumorales spécifiques à chaque sous-type de lymphome ou leucémie[33]. Les tumeurs liquides sont des cancers touchant les cellules du sang, de la moelle osseuse ou du système lymphatique. Ce sont des cancers « circulants » dont les cellules tumorales prolifèrent au niveau de glandes et ganglions lymphatiques, dans les niches tumorales où ils sont en contact avec les cellules du microenvironnement. C'est pourquoi, la compréhension de leur mécanisme de prolifération ainsi que leur réponse aux traitements doit intégrer des composants de cet environnement: cellules stromales, cellules du système immunitaire (macrophages …), matrice extracellulaire, cellules endothéliales etc.

Grâce à la technique de TCC, nous avons mis au point un modèle de lymphome B non-Hodgkinien minimal (Lamaison C et al, Blood Advances 2021, sous presse**, et Fig 2F**) [34]. Les cellules tumorales de patients (cellules primaires) ou de lignées (SUDHL4, DOHH2, HLY1), ont été co-encapsulées avec des cellules stromales de patients (RESTO, fibroblastes d'amygdales). Ce nouveau modèle 3D a permis : 1/ l'étude de la prolifération des cellules B en présence des fibroblastes, 2/ l'étude des interactions physiques entre les deux populations par imagerie « live » 3D, 3/ la démonstration d'une réponse différentielle des cellules tumorales à un traitement chimio-thérapeutique entre la co-culture 2D et 3D. De plus, pour la première fois, grâce à ce modèle de co-culture 3D, des cellules primaires de lymphome folliculaire B ont pu être maintenues en culture in vitro.

Cette étude vient mettre en évidence un rôle majeur des cellules stromales dans la prolifération des cellules de lymphomes en 3D, et l'importance du développement de ces nouveaux modèles de culture en organoïdes et tumoroïdes.

3 MODELE ALTERNATIF DES TUBES D'ALGINATE

En ingénierie tissulaire, le but ultime est la production de mini-organes, mini-tumeurs ou plus généralement de tissus plus épais dont la taille dépassera le millimètre. Les modèles de microtumeurs présentés précédemment ont une taille de l'ordre de 200 µm, choisie à dessein pour éviter toute nécrose. Pour fabriquer des tissus plus étendus et plus épais à base d'organoïdes, il faudra réussir à intégrer au sein de ces tissus une vascularisation sanguine, permettant un apport de nutriments et d'oxygène au centre du tissu qui ne serait pas possible par simple diffusion.

Les vaisseaux sanguins, sont des structures tubulaires, constituées de plusieurs couches de cellules musculaires lisses entourant une couche de cellules endothéliales, elles même bordant une lumière. Chaque type cellulaire, ancré sur une lame basale de matrice extracellulaire, a une fonction spécifique : les cellules musculaires lisses sont responsables de la contraction et du maintien du tonus vasculaire, tandis que les cellules endothéliales régulent la perméabilité des vaisseaux.

Vue la structure complexe du tissu vasculaire, que ce soit du point de vue structurel comme fonctionnel, reproduire des vaisseaux artificiels in vitro est un défi important. L'ingénierie tissulaire vasculaire, a ainsi longtemps été peu convaincante, avec, au mieux, des modèles de cultures 3D de cellules endothéliales uniquement [35].

Une variante de la TCC consiste à plonger l'extrémité de la pointe de co-extrusion microfluidique directement dans le bain de calcium, ce qui supprime l'instabilité (dans l'air) conduisant à la fragmentation du jet de liquide en gouttelettes. Au lieu d'obtenir des centaines de milliers de capsules sphériques creuses, nous obtenons alors une capsule cylindrique creuse qui peut atteindre un mètre de long et dont le rayon est de l'ordre de 450 µm. Ce tube d'alginate se gélifie au fur et à mesure qu'il est produit dans le calcium avec les cellules encapsulées dans la lumière. Nous avons montré qu'en encapsulant un mélange de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de la matrice extracellulaire, les cellules s'auto-organisent rapidement (en moins d'une journée) pour former une lumière où l'endothélium est couvert de cellules musculaires lisses (Figure 3). On forme ainsi un vaisseau sanguin artificiel en 3D [36] qui est étanche et se contracte en réponse à des agents vaso-constricteurs. Ce modèle alternatif de tubes d'alginate complète les modèles de tumoroïdes en capsules d'alginate et montre la diversité d'objets qui peuvent être produits par la même technologie.

CONCLUSION

Au cours du processus tumoral, les cellules tumorales prolifèrent de manière anarchique, puis s'organisent au sein de niche pré-métastatique, où des modifications dans la composition et la rigidité du microenvironnement viennent déclencher une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) de ces cellules. Les fibroblastes associés aux cancers sont en partie responsables de ces modifications de la matrice.

Il est admis aujourd'hui que des modèles 3D tumoraux sont plus représentatifs du tissu tumoral d'origine. Les sphéroïdes nus, largement utilisés jusqu'à aujourd'hui et obtenus grâce à des technologies de « gouttes pendantes » ou de culture sur support non-adhérents, sont des modèles

qui ont permis à la communauté scientifique de mettre un pied dans la représentation en 3D d'une tumeur. Les interactions des cellules entre elles dans une architecture 3D sont ainsi mieux récapitulées. Toutefois, elles ne permettent pas (ou de façon peu reproductible) de tenir compte des interactions des cellules avec le microenvironnement, composant et acteur majeur de l'évolution tumorale. Les modèles d'encapsulation 3D présentés dans cette revue, tiennent compte de ce facteur indispensable. Il est possible grâce à la technologie des capsules cellulaires, de produire des tumoroïdes de taille maitrisée, en culture 3D simple ou en co-culture avec des cellules du microenvironnement et/ou de la matrice extracellulaire faisant ainsi varier la rigidité de l'environnement. Ces modèles 3D innovants nous semblent aujourd'hui des approches incontournables dans la recherche contre le cancer.

Remerciements

Nous remercions chaleureusement tous les supports financiers qui nous ont permis de réaliser ce travail. Merci au CNRS, au SIRIC Brio 2 pour son soutien, à l'Inca, au Cancéropôle du Grand-Sud-Ouest, à l'ARC, au département SBM, à la Fédération des plateformes de recherche de Bordeaux, à la Ligue contre le cancer Aquitaine & Charentes et à l'agence nationale pour la recherche ANR. Merci à nos collaborateurs : Andréas Bikfalvi, Laurence Bresson-Bepoldin, Christophe Lamaze, Danijela Vignjevic, Corinne Albiges-Rizo.

REFERENCES

[1] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science [Internet]. 2001 Nov 23 [cited 2017 Dec 6];294(5547):1708–12. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1064829

[2] Clevers H. Review Modeling Development and Disease with Organoids. Cell [Internet]. 2016;165(7):1586–97. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082

[3] Marton RM, Pașca SP. Organoid and Assembloid Technologies for Investigating Cellular Crosstalk in Human Brain Development and Disease. Trends Cell Biol. 2020 Feb 1;30(2):133–43.

[4] Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. Nat Methods [Internet]. 2007;4(4):359–65. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth1015

[5] Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Brink S van den, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. Curr Protoc Immunol [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Aug 11];130(1):e106. Available from: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpim.106

[6] Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. Cell [Internet]. 2016 Jun 16 [cited 2021 Aug 11];165(7):1586–97. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27315476/

[7] Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. J Cell Biol [Internet]. 2017 Jan 2 [cited 2021 Aug 11];216(1):31–40. Available from: https://doi.org/10.1083/jcb.201610056

[8] Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. J Control Release. 2012;164:192–204.

[9] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. Science (80-) [Internet]. 1988 [cited 2021 Sep 8];240(4849):177–84. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2451290/

[10] Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Sep 8];8(10):839–45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17684528/

[11] Timmins NE, Nielsen LK. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. Methods Mol Med [Internet]. 2007 [cited 2021 Aug 11];140:141–51. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18085207/

[12] He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, … Deng X. 3D modeling of cancer stem cell niche. Oncotarget [Internet]. 2017 Aug 3 [cited 2021 Aug 11];9(1):1326–45. Available from: https://www.oncotarget.com/article/19847/text/

[13] AG A, U C, RA B, RJ S. Quantifying the correlation between spatially defined oxygen gradients and cell fate in an engineered three-dimensional culture model. J R Soc Interface [Internet]. 2014 Sep 6 [cited 2021 Aug 11];11(98). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24966240/

[14] Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, … Tesei A. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained OPEN. Nat Publ Gr [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 11]; Available from: http://sourceforge.net/p/revisp/

[15] Liedekerke P Van, Neitsch J, Johann T, Alessandri K, Nassoy P, Drasdo D. Quantitative

cell-based model predicts mechanical stress response of growing tumor spheroids over various growth conditions and cell lines. PLOS Comput Biol [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Aug 4];15(3):e1006273. Available from: https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1006273

[16] Dans la Sphère de Thierry Marx …et autre invention culinaire.

[17] Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov V V., Sinha B, Kiessling TR, … Nassoy P. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2013;110(37):14843–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1309482110

[18] Alessandri K, Feyeux M, Gurchenkov B, Delgado C, Trushko A, … Roux A. A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). Lab Chip [Internet]. 2016 Apr 26 [cited 2017 Oct 2];16(9):1593–604. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025278

[19] Ma M, Chiu A, Sahay G, Doloff JC, Dholakia N, … Anderson DG. Core–Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. Adv Healthc Mater [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Sep 8];2(5):667–72. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.201200341

[20] Zhang W, Zhao S, Rao W, Snyder J, Choi JK, … He X. A novel core–shell microcapsule for encapsulation and 3D culture of embryonic stem cells. J Mater Chem B [Internet]. 2013 Jan 23 [cited 2021 Sep 8];1(7):1002–9. Available from: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/tb/c2tb00058j

[21] Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. Front Oncol [Internet]. 2018 May 4 [cited 2021 Aug 12];8(MAY):145. Available from: /pmc/articles/PMC5945811/

[22] Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. EMBO Rep [Internet]. 2014 Dec [cited 2021 Aug 12];15(12):1243. Available from: /pmc/articles/PMC4264927/

[23] Faurobert E, Bouin A, Albiges-Rizo C. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. Curr Opin Oncol [Internet]. 2015 Jan 12 [cited 2021 Aug 12];27(1):64–70. Available from: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/25415136/

[24] Gravelle P, Jean C, Familiades J, Decaup E, Blanc A, … Laurent G. Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. Am J Pathol [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Aug 13];184(1):282–95. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24231431/

[25] Gava F, Faria C, Gravelle P, Valero JG, Dobaño-López C, … Bezombes C. 3d model characterization by 2d and 3d imaging in t(14;18)-positive b-nhl: Perspectives for in vitro drug screens in follicular lymphoma. Cancers (Basel) [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Aug 13];13(7). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33804934/

[26] Tian YF, Ahn H, Schneider RS, Yang SN, Roman-Gonzalez L, … Singh A. Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. Biomaterials [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 Aug 13];73:110–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26406451/

[27] Lu YC, Chu T, Hall MS, Fu DJ, Shi Q, … Ma M. Physical confinement induces malignant transformation in mammary epithelial cells. Biomaterials. 2019 Oct 1;217.

[28] Trushko A, Di Meglio I, Merzouki A, Blanch-Mercader C, Abuhattum S, … Roux A. Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement. Dev Cell. 2020 Sep 14;54(5):655-668.e6.
[29] Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, … Clevers H. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. Nat Protoc 2016 112 [Internet]. 2016 Jan 21 [cited 2021 Sep 16];11(2):347–58. Available from: https://www.nature.com/articles/nprot.2016.006
[30] Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer 2016 169 [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2021 Aug 13];16(9):582–98. Available from: https://www.nature.com/articles/nrc.2016.73
[31] Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. Eur J Cell Biol. 2016 Nov 1;95(11):493–502.
[32] Bertillo F, Urena Martin C, Alessandri K, De-Planter L, Gurchenkov B, … Vignjevic D. Pressure induces fibroblasts spreading through fibronectin reorganization. submitted.
[33] Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. Nat Rev Cancer [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 13];14(8):517–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25008267/
[34] Lamaison C, Latour S, Hélaine N, Morvan V Le, Monvoisin C, … Bresson-Bepoldin L. Stromal cells regulate malignant B-cell spatial organization, survival, and drug response in a new 3D model mimicking lymphoma tumor niche. 2020 Nov 18 [cited 2021 Sep 20]; Available from: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03010816
[35] Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2016 Mar 22 [cited 2017 Dec 6];113(12):3179–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951646
[36] Andrique L, Recher G, Alessandri K, Pujol N, Feyeux M, … Bikfalvi A. A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. Sci Adv [Internet]. 2019 Jun 12 [cited 2019 Sep 10];5(6):eaau6562. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31206014

Légendes

Figure 1

Représentation schématique **(A)** de la technologie d'encapsulation cellulaire (AL : solution d'alginate, SI : solution intermédiaire, SC : solution cellulaire) et **(B)** des modèles 3D d'organoïdes ou tumoroïdes obtenus.

Figure 2

Différents modèles de cultures et co-cultures 3D en capsule d'alginate. Modèle #1 de monocultures en sphéroïdes: **(A)** adénocarcinome rénal (marquage membranaire magenta) et **(B)** hépatoblastome (marquage nucléaire bleu et membranaire jaune). Modèle #2 de monocultures en épithélium creux: section optique avec une lumière au centre **(C)** et projection maximum **(D)** d'un épithélium mammaire. Modèle #3 de co-cultures 3D : (E) fibroblastes associés au cancer (vert) entourant une

tumeur solide de colon encapsulée (gris), (F) co-culture de cellules de lymphome B (jaune) et de cellules stromales associées (bleu). Barre d'échelle = 100 µm.

Figure 3

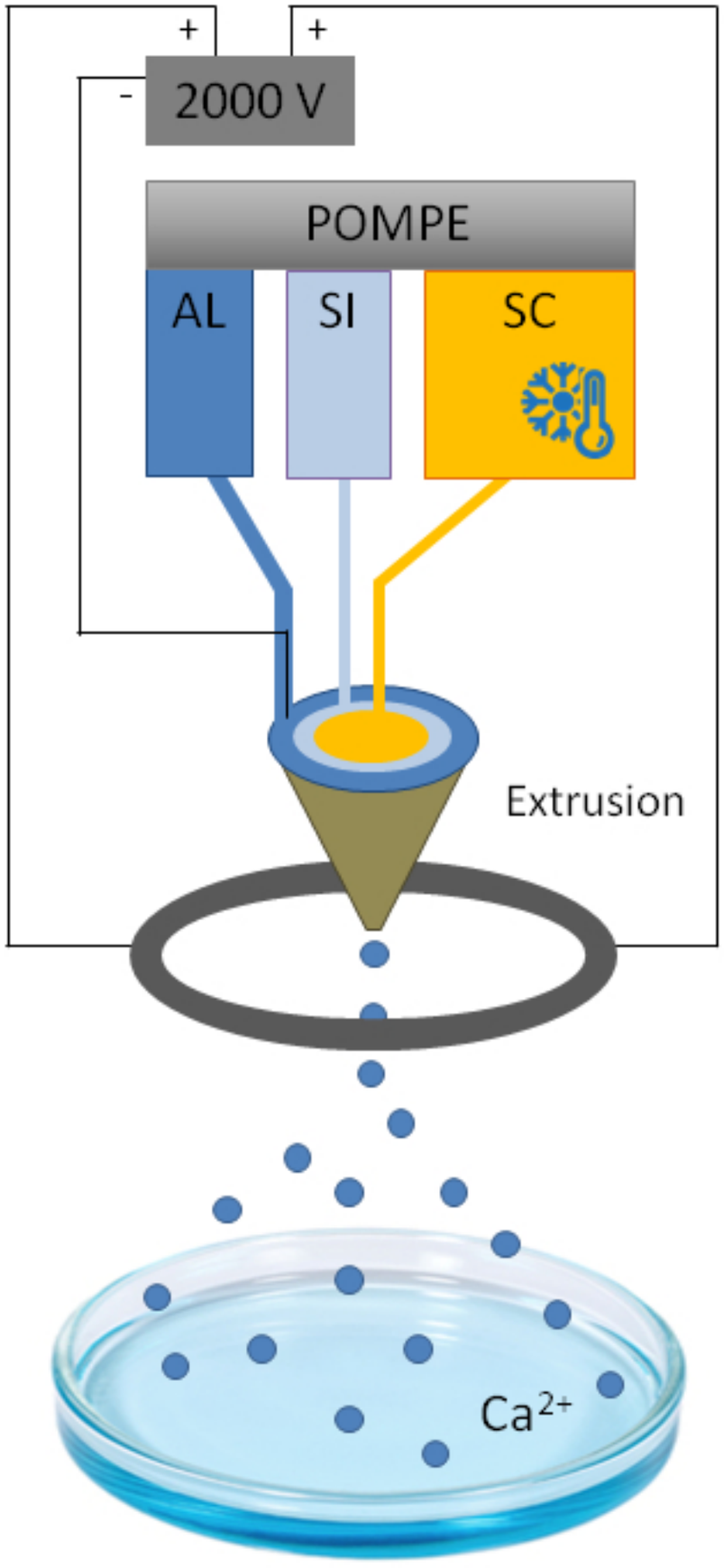
Immunomarquages Dapi (noyaux), Laminine (Matrigel®), CD31 (cellules endothéliales) et alpha Smooth Muscle Actin (aSMA, cellules musculaires lisses) sur un vaisseau sanguin artificiel 3D encapsulé en tube d'alginate. Barre d'échelle = 50 µm.

conflits d'intérêts : aucun

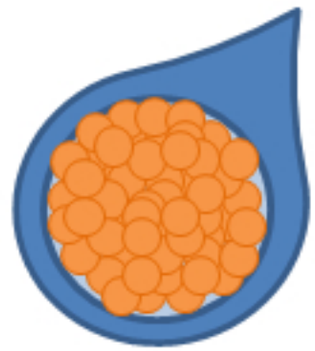
Figure

Click here to access/download;Figure;3_Figure_All.pdf

A



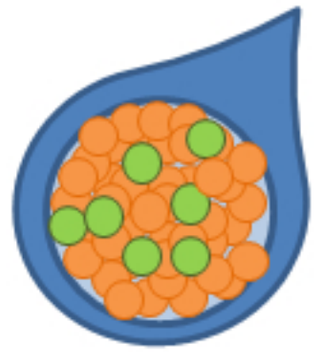
B



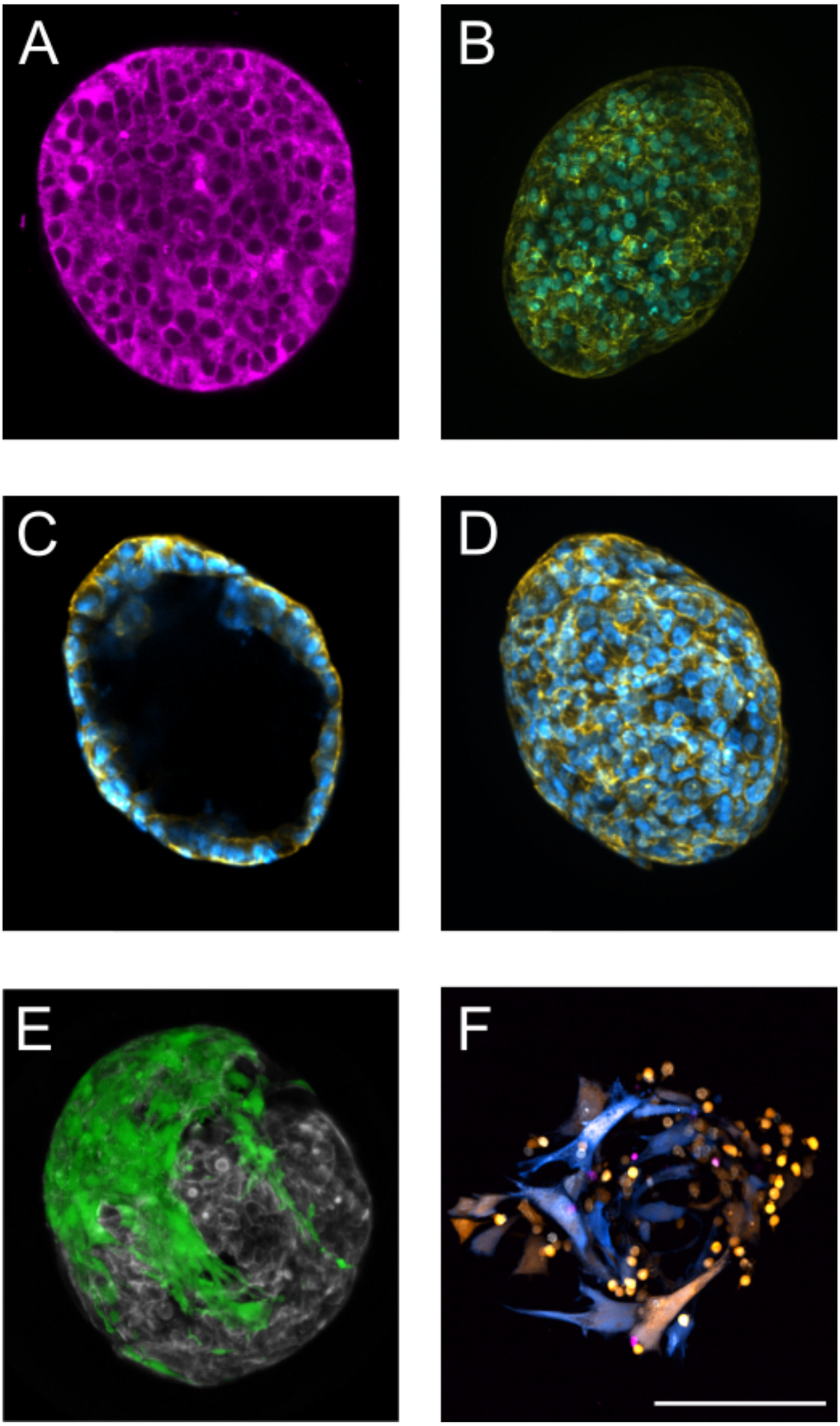
Modèle 3D #1
Mono-culture en sphéroide

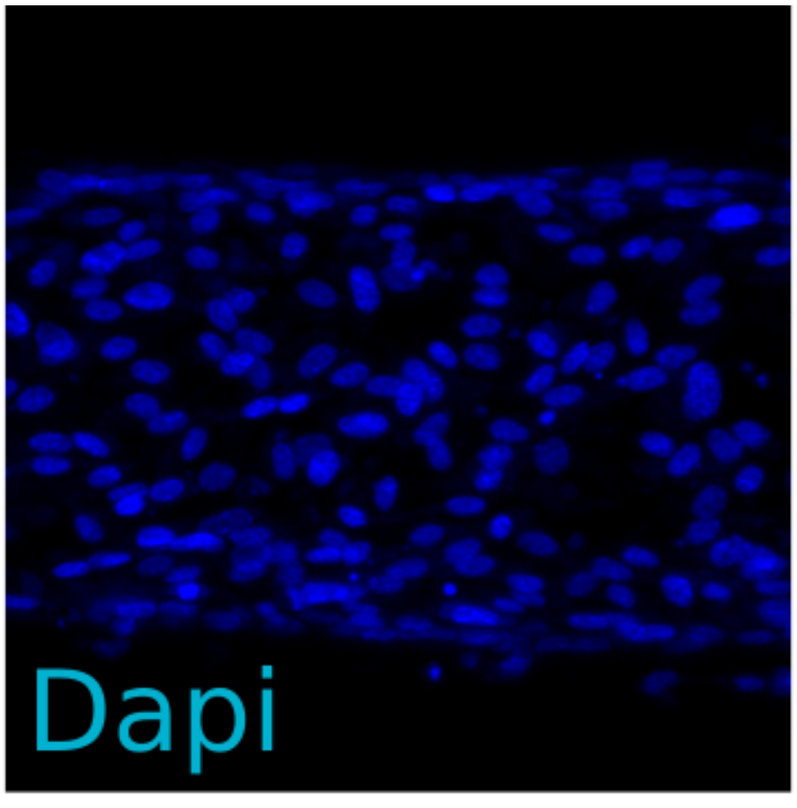


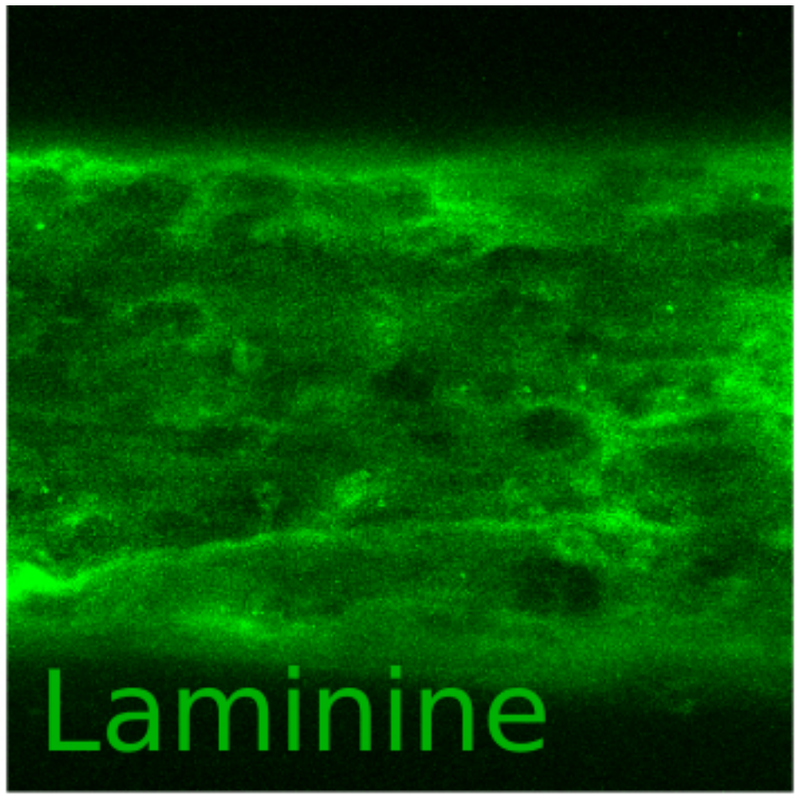
Modèle 3D #2
Mono-culture en épithélium

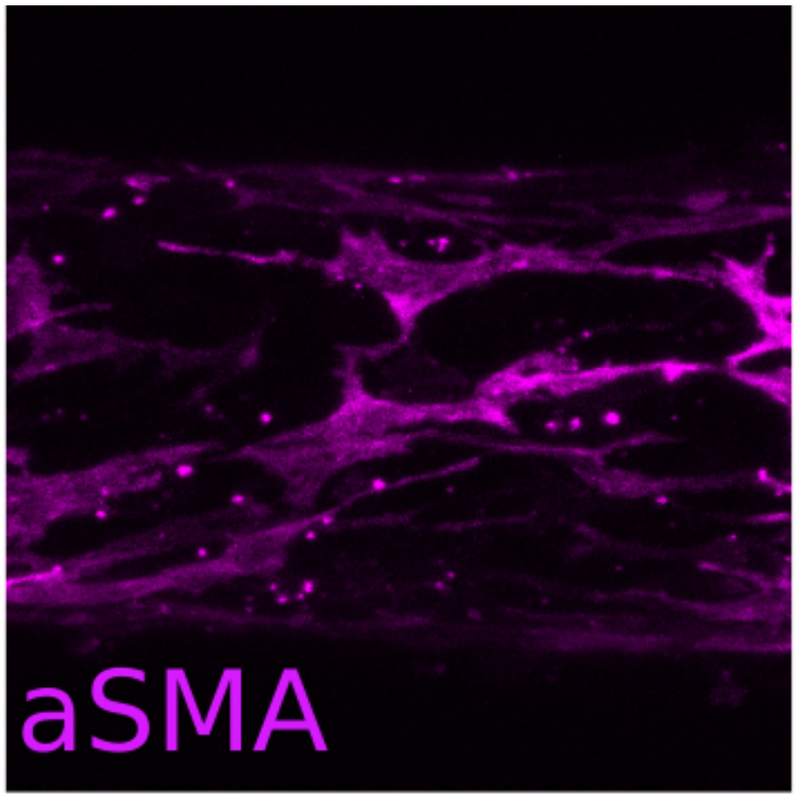


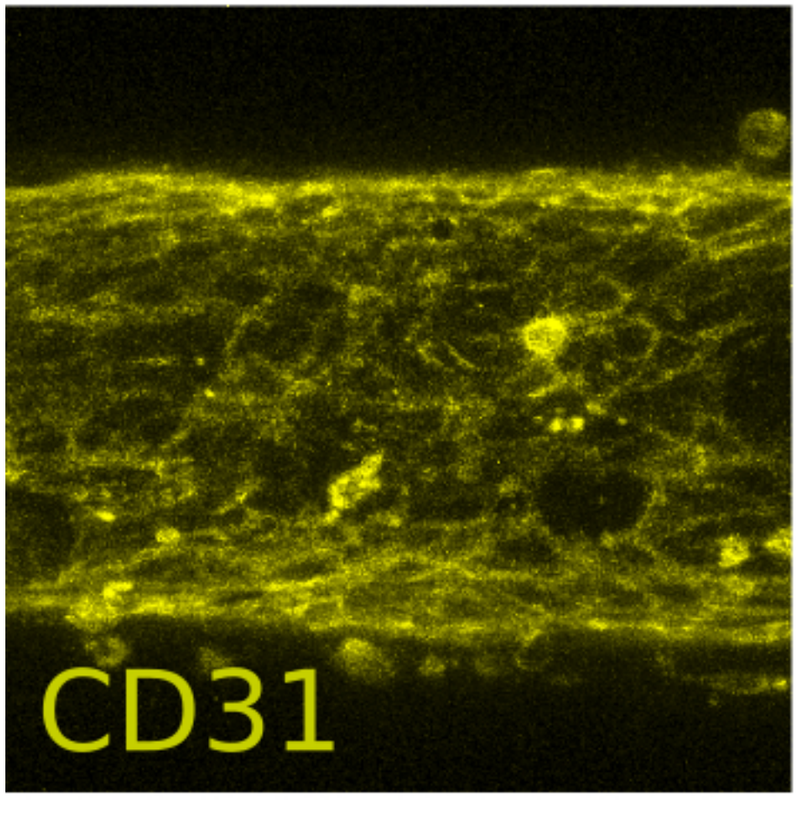
Modèle 3D #3
Co-culture

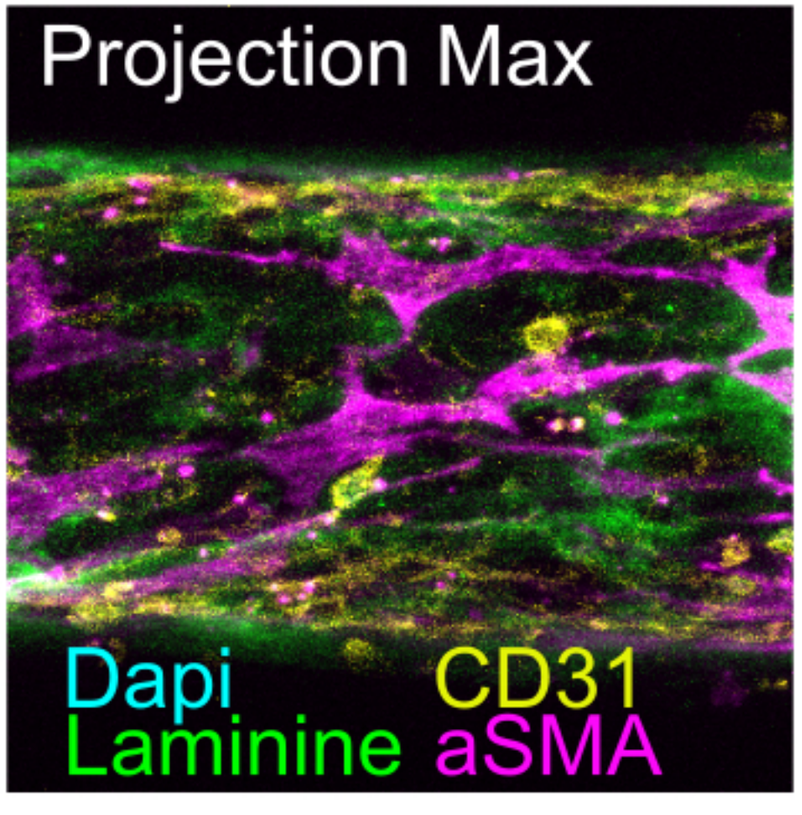

A
B
C
D
E
F

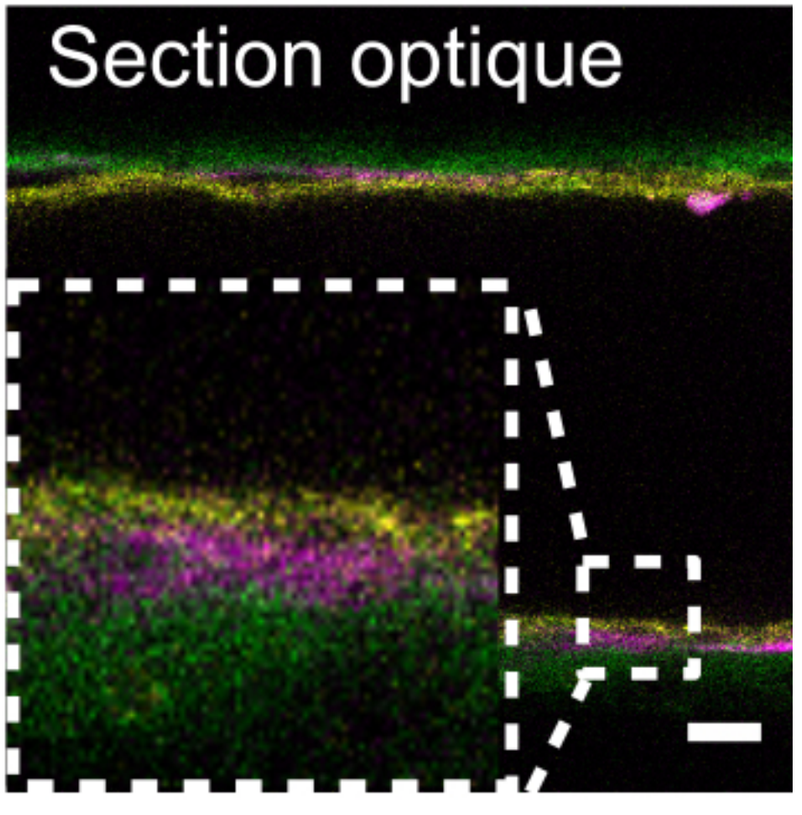

Dapi


Laminine


aSMA


CD31


Projection Max
Dapi
Laminine
CD31
aSMA


Section optique