

► Les maladies génétiques associées à des troubles neurodéveloppementaux (TND) regroupent plusieurs maladies pour lesquelles peu de traitements sont proposés. L'impossibilité d'accéder à des échantillons de cerveaux humains pour des études *ex vivo*, et les divergences entre l'homme et les modèles animaux rendent nécessaires de nouvelles approches de recherche. L'organoïde cérébral, une structure en trois dimensions, auto-organisée, et générée à partir de cellules souches pluripotentes induites, permet de reproduire les étapes de développement du cerveau humain, de la prolifération des cellules souches neurales à leur différenciation en neurones, en oligodendrocytes, ou en astrocytes. L'intérêt de ce modèle est désormais prouvé pour la compréhension du développement cérébral et pour la recherche de traitements. Après une présentation des cellules souches pluripotentes induites et des organoïdes, nous exposerons comment cette technique est actuellement déployée, en particulier pour étudier les mécanismes physiopathologiques résultant de variations génétiques pathogènes de gènes candidats de TND. ◀

Souvent d'origine génétique et affectant plus de 3 % des enfants dans le monde, les troubles neurodéveloppementaux (TND) forment un groupe hétérogène de maladies comprenant les troubles du spectre autistique (TSA), les troubles du développement intellectuel (TDI), les troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), les troubles spécifiques du langage et des apprentissages (TSLA), l'épilepsie, etc. On estime aujourd'hui à plus de 1700 le nombre de gènes dont des variations sont responsables de TND. Beaucoup de gènes, mais aussi de nouveaux mécanismes moléculaires à l'origine d'anomalies chromosomiques et génétiques restent à découvrir, de nombreux patients n'ayant pas reçu, à ce jour, de diagnostic moléculaire de leur maladie [1].

Vignette (© Laurence Duplomb).

Organoïdes (16)

Une série animée par Thierry Jouault

Des organoïdes cérébraux pour la compréhension et la thérapie des maladies génétiques rares avec troubles neuro-développementaux

Fatima El It^{1,2}, Laurence Faivre^{1,2,3},
Christel Thauvin-Robinet^{1,2,3}, Antonio Vitobello^{1,2,4},
Laurence Duplomb^{1,2}



¹UMR1231 Inserm, Génétique des anomalies du développement (GAD), université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

²FHU TRANSLAD, CHU Dijon, Dijon, France.

³Centre de référence des anomalies du développement et syndromes malformatifs, CHU Dijon, Dijon, France.

⁴Unité fonctionnelle innovation en diagnostic génomique des maladies rares, CHU Dijon, Dijon, France.

laurence.duplomb@chu-dijon.fr

Au cours du développement du cerveau, de l'embryon au jeune enfant, des variations génétiques peuvent entraîner divers défauts cellulaires : altérations de l'axe de division des progéniteurs neuronaux, de la migration cellulaire, des connexions synaptiques, de la régulation transcriptionnelle/épigénétique de l'ADN, de la synthèse, de la localisation et de la fonction des protéines ou des voies de signalisation, entraînant des dysfonctionnements cérébraux associés ou non à des anomalies de la structure cérébrale.

Le déploiement des techniques de séquençage à haut débit du génome et des explorations du type -omique associées représente une réelle révolution dans la médecine des maladies rares. De plus en plus de variations génétiques pathogènes sont identifiées, apportant des réponses à des patients restés longtemps en errance diagnostique. Ces découvertes sont à l'origine de projets de recherche fondamentale qui ont permis de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les maladies, et qui ont contribué aux connaissances en biologie des cellules et des tissus. Cependant, dans le cas des TND, ces projets sont

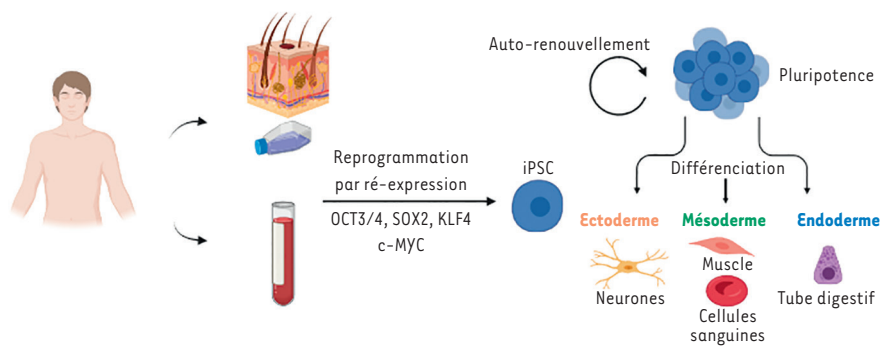


Figure 1. La reprogrammation des iPSC est réalisée à partir de cellules somatiques du donneur, soit de fibroblastes issus d'une biopsie de peau, soit de cellules mononucléées sanguines. Ces cellules, reprogrammées par expression des facteurs de Yamanaka (OCT3/4, SOX2, KLF4 et c-MYC), ont un pouvoir d'auto-renouvellement et de pluripotence, et peuvent se différencier en cellules constitutives des trois feuillets

embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, pour donner ensuite naissance à toutes les cellules qui composeront l'organisme humain adulte (Figure créée avec BioRender.com).

confrontés à plusieurs difficultés liées au nombre réduit de patients et à la complexité des mécanismes qui contrôlent le neurodéveloppement. L'accès à des échantillons de cerveau humain vivant n'étant pas envisageable, les études cellulaires et moléculaires sur le tissu altéré restent limitées. Pour pallier ce manque, des modèles animaux sont souvent utilisés, tels que la souris (*Mus musculus*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), ou la drosophile (*Drosophila melanogaster*), mais des différences existent entre les phénotypes de ces animaux et de l'être humain. La production d'organoïdes cérébraux à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) constitue une approche complémentaire de ces modèles animaux, en reproduisant *in vitro* les étapes fondamentales du développement cérébral. Cette approche innovante est porteuse d'espoir pour accélérer la recherche et le développement de traitements des TND.

Les cellules souches pluripotentes induites

La reprogrammation de cellules somatiques (fibroblastes ou cellules mononucléées du sang) en cellules souches pluripotentes induites (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) repose sur l'expression de quatre facteurs de transcription de pluripotence, OCT3/4, SOX2, KLF4, et c-MYC (ou OSKM), appelés facteurs de Yamanaka en hommage au découvreur de l'effet de cette combinaison de facteurs [2]. Différentes méthodes de vectorisation, virales ou non virales, sont utilisées pour introduire les gènes codant ces facteurs dans les cellules [3], et ainsi générer des iPSC définies par une morphologie typique, la capacité d'auto-renouvellement et la pluripotence [4] (→).

Les iPSC sont des cellules très compactes, avec un ratio noyau/cytoplasme élevé, qui forment des colonies aux bords réguliers. Les termes « capacité d'auto-renouvellement » et « pluripotence » signifient respectivement que ces cellules sont capables de se multiplier à l'infini et qu'elles peuvent se différencier dans tous les types de cellules qui composent un organisme. Pour valider leur reprogrammation, un test de différenciation des iPSC dans des cellules composant les trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme) est requis. C'est en effet de ces trois feuillets que proviennent les différents types cellulaires de l'organisme : par exemple, les neurones dérivent de l'ecto-

derme, les cellules musculaires et les vaisseaux sanguins du mésoderme, et le tube digestif de l'endoderme (Figure 1).

L'un des intérêts majeurs des iPSC réside dans le fait qu'elles conservent les mêmes informations génétiques que celles de la personne dont les cellules utilisées pour les produire (fibroblastes ou cellules sanguines) sont issues. Les cellules d'un patient atteint d'une maladie génétique, et qui a accepté¹ une biopsie de peau ou une prise de sang, pourront donc être reprogrammées en iPSC qui seront porteuses de la variation génétique responsable de sa maladie. S'il s'agit d'une variation létale pour le fœtus², des iPSC porteuses de l'anomalie peuvent, dans certains cas, être obtenues à partir de cellules saines, qui ne sont pas porteuses de la variation génétique, celle-ci étant alors introduite en utilisant la technique d'édition de gène CRISPR/Cas9 (Figure 2A)³. La technique CRISPR/Cas9 peut également être utilisée afin de corriger ou d'empêcher l'expression de l'allèle porteur de la mutation dans les cellules du patient (Figure 2B). Dans ce cas, le fonds génétique étant le même, seuls les effets pathogènes de l'anomalie seront révélés.

Indépendamment de la technique utilisée pour les produire, reprogrammation avec ou sans édition de gène par CRISPR/Cas9, les iPSC porteuses de la variation génétique pourront ensuite être différenciées dans le type cellulaire affecté par la maladie, ce qui permettra l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Un défi persiste néanmoins car certaines variations pathogènes, comme les anomalies complexes (remaniement chromosomique par exemple), sont difficilement modélisables.

¹ Après signature d'un consentement éclairé.

² Ou en l'absence de consentement du patient.

³ Notons que l'hétérogénéité des cellules peut être à l'origine de différences entre individus plus marquées que celles produites par la variation pathogène. Pour pallier ce problème et déterminer l'effet réel de la variation, l'analyse devrait porter sur un nombre important d'individus atteints, mais cette solution n'est pas toujours possible, le nombre d'individus porteurs de la variation étant souvent réduit.

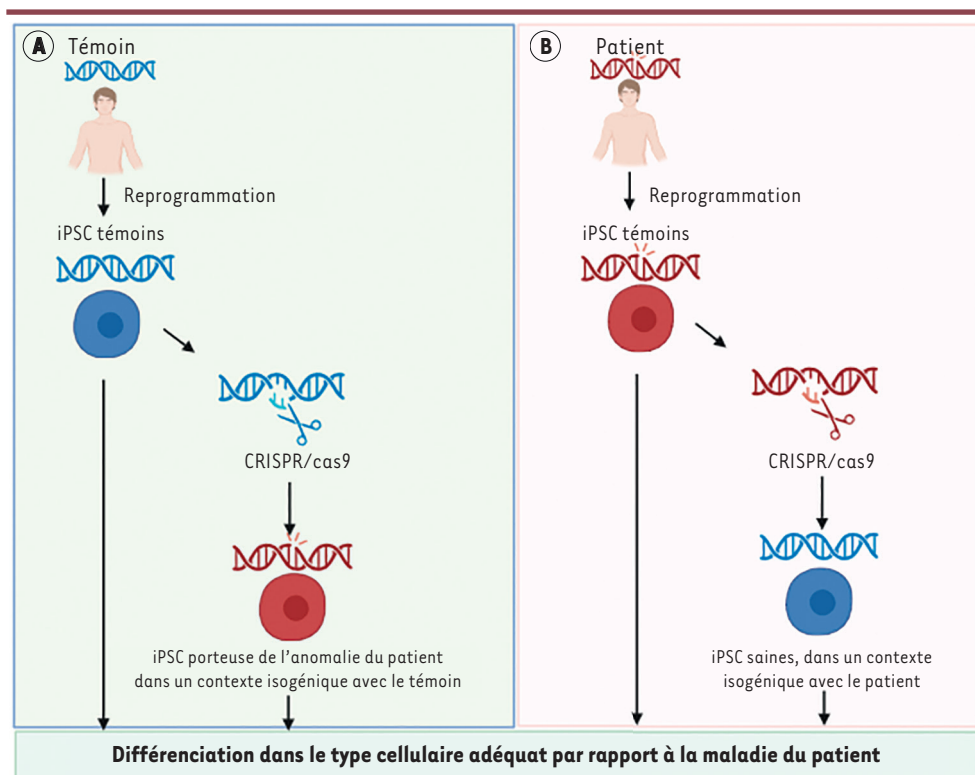


Figure 2. A. L'obtention des iPSC de patients nécessite un consentement. En cas de refus ou d'impossibilité d'obtenir des cellules somatiques, la mutation pathogène peut être éditée par la technique CRISPR/Cas9 dans des iPSC issues de cellules saines. **B.** La correction de la mutation pathogène peut également être obtenue par la technique CRISPR/Cas9. Dans les conditions A et B, les cellules mutées et les cellules saines sont en contexte isogénique. Le choix de la différenciation des iPSC dans un ou plusieurs types cellulaires est réalisé en fonction des atteintes cliniques du patient (Figure créée avec BioRender.com).

Les organoïdes cérébraux

Des organoïdes aux assemblages

Au début des années 2000, Itskovitz-Eldor *et al.* ont montré la capacité des cellules souches embryonnaires humaines (hESC, *human embryonic stem cells*), cultivées en suspension, à s'agréger en corps embryoides, puis à acquérir des marqueurs spécifiques des trois couches germinales embryonnaires [5]. Ces observations ouvraient ainsi la voie à de nombreuses études sur le développement embryonnaire humain, puis au développement d'un système de culture cellulaire en trois dimensions, les organoïdes, possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'organe en développement qu'ils représentent. Les iPSC furent ensuite utilisées afin de produire des organoïdes représentatifs de différents organes : la peau, le poumon, le foie, ou le cerveau [6] (→).

(→ Voir la Synthèse de H. Chneiweiss *et al.*, m/s n° 11, novembre 2023 et voir la série *Organoïdes*

Le premier modèle d'organoïde cérébral doté d'une formation auto-organisée, avec une polarité apico-basale, et représentant les aspects spatio-temporels de la corticogenèse précoce, a été obtenu par Eiraku *et al.*, en 2008, à partir de hESC [7]. Peu après, en 2013, Lancaster *et al.* décrivent un protocole permettant la génération d'organoïdes cérébraux à partir d'iPSC [8]. Ces organoïdes reproduisaient le développement cérébral humain fœtal, avec une auto-organisation qui débute par une prolifération des progéniteurs neuronaux, suivie de leur différenciation en différents types de neurones fonctionnels, en oligodendrocytes et en astrocytes [9].

Deux types d'organoïdes cérébraux peuvent être produits. Il est en effet possible de produire des organoïdes cérébraux dits « entiers », composés de plusieurs régions du cerveau (régions corticales, ventricules, hippocampe, plexus choroïde), ou des organoïdes guidés vers une région spécifique (région cérébrale postérieure ou antérieure, cervelet, hypothalamus, cortex) [10]. Techniquement, l'approche guidée est la plus robuste et elle permet une meilleure reproductibilité, mais elle est restreinte à la partie cérébrale ciblée, qui se trouve ainsi dépourvue de connexions avec les autres régions du cerveau.

Grâce à des systèmes de co-culture, apportant une contrainte de forte proximité, il est désormais possible de produire des assemblages, qui résultent de la fusion d'au moins deux organoïdes guidés, chacun étant représentatif d'une région spécifique d'un tissu, ou de tissus différents. Les premiers assemblages cérébraux ont été produits en 2017, par l'équipe de Sergiu P Pașca (Stanford University School of Medicine, Stanford, États-Unis) [11] puis par celle de Juergen A Knoblich (Institute of Molecular Biotechnology, Vienne, Autriche) [12], en produisant des organoïdes correspondant aux zones ventrale et dorsale du cerveau antérieur, puis en les co-cultivant pour qu'ils fusionnent. Cette approche a permis d'étudier les dynamiques inter-régions, reflétant les migrations se produisant au cours du dévelop-

pement cérébral embryonnaire, comme la migration des interneurons (principalement GABAergiques) nés dans la zone ventrale et devant migrer dans la zone dorsale. Grâce à cette approche, l'équipe de Sergiu Paşca a pu montrer l'utilité des assemloïdes en pathologie cérébrale pour comprendre les mécanismes cellulaires impliqués. Utilisant des assemloïdes produits à partir d'iPSC de patients, ils ont en effet modélisé le syndrome de Timothy, causé par des variations gain-de-fonction dans le gène *CACNA1C* (*calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C*) qui code les canaux calciques de type L, responsables, entre autres, d'épilepsie, de TSA, de retard de développement, et ont mis en évidence une altération de la migration des interneurons, celle-ci pouvant être restaurée en bloquant l'activité des canaux calciques de type L par des molécules pharmacologiques spécifiques. Toujours dans l'équipe de Sergiu Paşca, Andersen *et al.*, ont produit des assemloïdes constitués d'organoïdes de cortex cérébral, de cerveau postérieur avec moelle spinale, et de muscle squelettique, et recréé ainsi *in vitro* un axe fonctionnel dans lequel l'activation des neurones corticaux contrôle la contraction musculaire *via* les motoneurons, un modèle qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude et le traitement des maladies associées à des troubles moteurs [13].

Les applications des organoïdes cérébraux

L'utilisation d'organoïdes cérébraux a permis de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement normal du cerveau, et de les confronter à ceux observés en conditions pathologiques, dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et d'élaborer des traitements personnalisés. Différentes maladies, d'origine génétique ou pas, sont étudiées grâce aux organoïdes cérébraux, notamment :

- des défauts cérébraux résultant d'une infection virale, due au virus Zika [14], au SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) [15], au virus Herpès simplex [14], etc. Dans le cas du virus Zika, les organoïdes ont permis de comprendre comment le virus pénètre dans les progéniteurs neuronaux et entraîne leur apoptose, avec pour conséquence une microcéphalie. Ces études ont également montré l'existence de mécanismes pathogènes communs aux microcéphalies induites par plusieurs virus et de tester des stratégies antivirales.
- des maladies génétiques neurodéveloppementales, comme la trisomie 21 [16], le syndrome de l'X-fragile [17], le syndrome de DiGeorge [18], le syndrome de Pitt-Hopkins [19], mais également des troubles du spectre autistique pour lesquels les causes génétiques ont été identifiées, comme des mutations des gènes *KMT5B* (*lysine methyltransferase 5B*), *CHD8* (*chromodomain helicase DNA binding protein 8*) et *CNTNAP2* (*contactin-associated protein 2*) [20]. Ces études ont permis de consolider les connaissances acquises à partir des modèles animaux ou des cultures cellulaires en deux dimensions. Elles ont aussi permis de caractériser de nouveaux mécanismes clés impliqués dans la pathogénèse de ces maladies, et de tester des stratégies pour corriger les phénotypes pathologiques.
- Même si les organoïdes cérébraux sont surtout reconnus comme des outils de choix pour les études du neurodéveloppement, ils sont aussi d'un intérêt majeur pour les maladies neurodégénératives, avec des

études réalisées sur des organoïdes issus de cellules de patients présentant une maladie de Parkinson, avec ou sans cause génétique connue (par exemple, impliquant les gènes *LRRK2* [*leucine-rich repeat kinase 2*] [21] et *SNCA* [*synuclein alpha*] [22]), ou une maladie d'Alzheimer (impliquant *PSEN1* [*presenilin 1*] [23]). Pour la maladie d'Alzheimer, le modèle d'organoïde cérébral reproduit les défauts caractéristiques de la maladie, comme l'agrégation de la protéine amyloïde et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Le succès de l'utilisation de molécules pharmacologiques dont les effets sur la réduction des agrégats amyloïdes sont connus (telles que les inhibiteurs des sécrétases γ et β) suggère que les organoïdes cérébraux représentent un bon modèle pour l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques dans cette maladie. Des tests de criblage de molécules à haut débit ont déjà été réalisés, et sont en cours d'optimisation pour proposer une médecine personnalisée de précision [24].

- les tumeurs cérébrales, comme le glioblastome ou le médulloblastome [25, 26].
- les maladies mentales, comme la schizophrénie (avec les mutations du gène *DISC1* [*disrupted-in-schizophrenia 1*] [27])
- les maladies résultant d'expositions à des toxines [9, 28], ou l'impact, sur le développement cérébral fœtal, d'une exposition *in utero* à des antidépresseurs [29], à l'alcool, à la cocaïne, à la méthamphétamine, pris par la mère au cours de la grossesse [30]. Plus spécifiques que les tests classiques d'embryotoxicité réalisés *in vitro*, les organoïdes cérébraux permettent de tester la neurotoxicité embryonnaire de médicaments, de substances chimiques ou illicites, avec des temps d'exposition prolongés, ou à des temps précis du développement de l'organoïde, et de compléter cette étude par des analyses morphologiques, transcriptionnelles et fonctionnelles.

Les limites des organoïdes cérébraux

La modélisation d'un tissu reposant sur des organoïdes présente plusieurs avantages : les organoïdes permettent d'obtenir une complexité et une maturité cellulaire plus importante que celles obtenues dans un modèle en 2D ; ils permettent de pallier les limites des modèles animaux, qui ne reproduisent pas toujours fidèlement certaines caractéristiques des cerveaux humains, en raison de différences de régulation du cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux, des voies de signalisation ou de migration cellulaire [31]. L'approche par organoïdes cérébraux possède néanmoins ses limites. Le cerveau humain se caractérise par une taille et une architecture spécifiques. Il contient un

nombre important de neurones, de différents types, qui établissent des connexions pour former un réseau complexe et mature capable d'intégrer les modifications de l'environnement. L'organoïde cérébral est un outil qui reste limité à l'échelle du millimètre, correspondant au cerveau d'un insecte, et qui est constitué d'un nombre réduit de neurones. Loin de recréer les six couches du néocortex humain, il possède une architecture globale bien différente, mais qui, à l'échelle microscopique, reproduit le développement cérébral, avec plusieurs couches de neurones de différentes identités. Des cellules microgliales, capables de réponses immunitaires, peuvent ainsi être observées dans des organoïdes cérébraux [32]. Mais bien que ses neurones soient actifs, l'organoïde reste très immature, et son réseau neuronal est loin d'avoir la complexité de celui du cerveau humain.

L'absence de vascularisation est l'un des défis importants qu'il est nécessaire de relever : sans vascularisation, l'oxygène et les nutriments sont apportés aux cellules directement par diffusion. Au cours de la croissance de l'organoïde, l'efficacité de cette diffusion vers son centre diminue, le mettant en hypoxie et lui apportant moins de nutriments. Inévitablement, un stress, puis une mort cellulaire par nécrose sont donc observés au centre de l'organoïde, rendant toute exploitation impossible. Durant ces cinq dernières années, plusieurs équipes ont cherché à produire des organoïdes vascularisés : en les transplantant dans des cerveaux de souris pour « capter » leur vascularisation ; en réalisant des co-cultures en présence de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines, puis en les transplantant dans des cerveaux de souris ; ou en les cultivant avec des organoïdes de vaisseaux sanguins [33]. Une approche différente, récemment décrite par Qian *et al.* [34], consiste à réaliser des coupes d'organoïdes corticaux épaisses de 500 µm, qui peuvent être répétées toutes les 4 semaines, afin de faciliter le contact du centre de l'organoïde avec le milieu de culture et ses nutriments, prévenant ainsi la mort des cellules et maintenant la neurogénèse et le développement du cortex à un stade du développement équivalent à celui du troisième trimestre de grossesse dans l'espèce humaine. La culture de coupes d'organoïdes dans un système d'interface air-liquide permet également de prolonger la vie de l'organoïde, avec une amélioration de la survie des neurones et une croissance des axones efficace et fonctionnelle [35]. Très récemment, Dao *et al.* ont produit des assemblages en associant des organoïdes cérébraux et des organoïdes de vaisseaux sanguins, créant ainsi des organoïdes vascularisés qui acquièrent des fonctions biologiques spécifiques de la barrière hémato-encéphalique [36].

Des questions éthiques présentes et à venir

Outre les limites et les défis expérimentaux, l'utilisation des organoïdes cérébraux pose des questions éthiques [37-40]. Les premiers questionnements éthiques sont classiques en recherche sur l'homme : ils concernent l'utilisation de matériel humain, le consentement des patients pour la production d'iPSC à partir d'une biopsie de peau ou d'une prise de sang, le consentement sur le devenir de leurs iPSC en organoïdes cérébraux pour la recherche fondamentale, la médecine personnalisée, etc. Plus spécifiquement, les organoïdes cérébraux issus de ces prélèvements peuvent être transférés dans des modèles animaux chimériques, ou

assemblés avec d'autres organoïdes en complexes de statut moral ou juridique mal défini. Bien que non envisageable aujourd'hui, la possibilité que, grâce aux évolutions techniques, les organoïdes cérébraux puissent, un jour, être dotés d'une conscience est une question qui est néanmoins débattue⁴ [47] (→)

(→) Voir l'Éditorial de H. Chneiweiss, *m/s* n° 2, février 2020, page 99

En effet, la présence, par exemple, de l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans la mémoire, et celle de connexions neuronales actives, détectées par des enregistrements d'activités électriques et ressemblant à celles d'un cerveau fœtal en développement, ont conduit les scientifiques, les philosophes, mais aussi le grand public, à débattre de cette question de la « conscience des organoïdes cérébraux ». Quel statut moral doit-on donc leur accorder ? Quelles seront les capacités cognitives dont seront dotées les prochaines générations d'organoïdes cérébraux, alors probablement couplés à l'intelligence artificielle ?

Les organoïdes cérébraux comme modèle cellulaire

Déjà utilisés dans plusieurs laboratoires, les organoïdes cérébraux ont montré leur intérêt pour la recherche sur les troubles neurodéveloppementaux. Certaines études ont en effet ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques, comme la découverte de la protéine HSF2 (*heat shock transcription factor 2*) une cible potentielle dans le syndrome de Rubinstein-Taybi, une maladie génétique associant des anomalies morphologiques et une déficience intellectuelle [41]. D'autres études sont à des stades plus avancés, avec le développement de tests de molécules à potentiel thérapeutique. Trujillo *et al.* ont, par exemple, testé 14 molécules pharmacologiques dans le syndrome de Rett⁵, parmi lesquelles deux se sont révélées capables d'améliorer de façon partielle certaines fonctions neuronales d'un organoïde, ouvrant un espoir pour les patientes, mais suggérant également la nécessité de combiner plusieurs molécules pour cibler toutes les anomalies [42].

Les organoïdes cérébraux comme modèle cellulaire de TDN

L'utilisation des organoïdes cérébraux représente un atout important pour décrypter les mécanismes cel-

⁴ Voir également le commentaire de Nita A. Farahany *et al.*, « The ethics of experimenting with human brain tissue », *Nature*, 2018.

⁵ Désordre neurologique grave, causé par une mutation dans le gène *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*) situé sur le chromosome X.

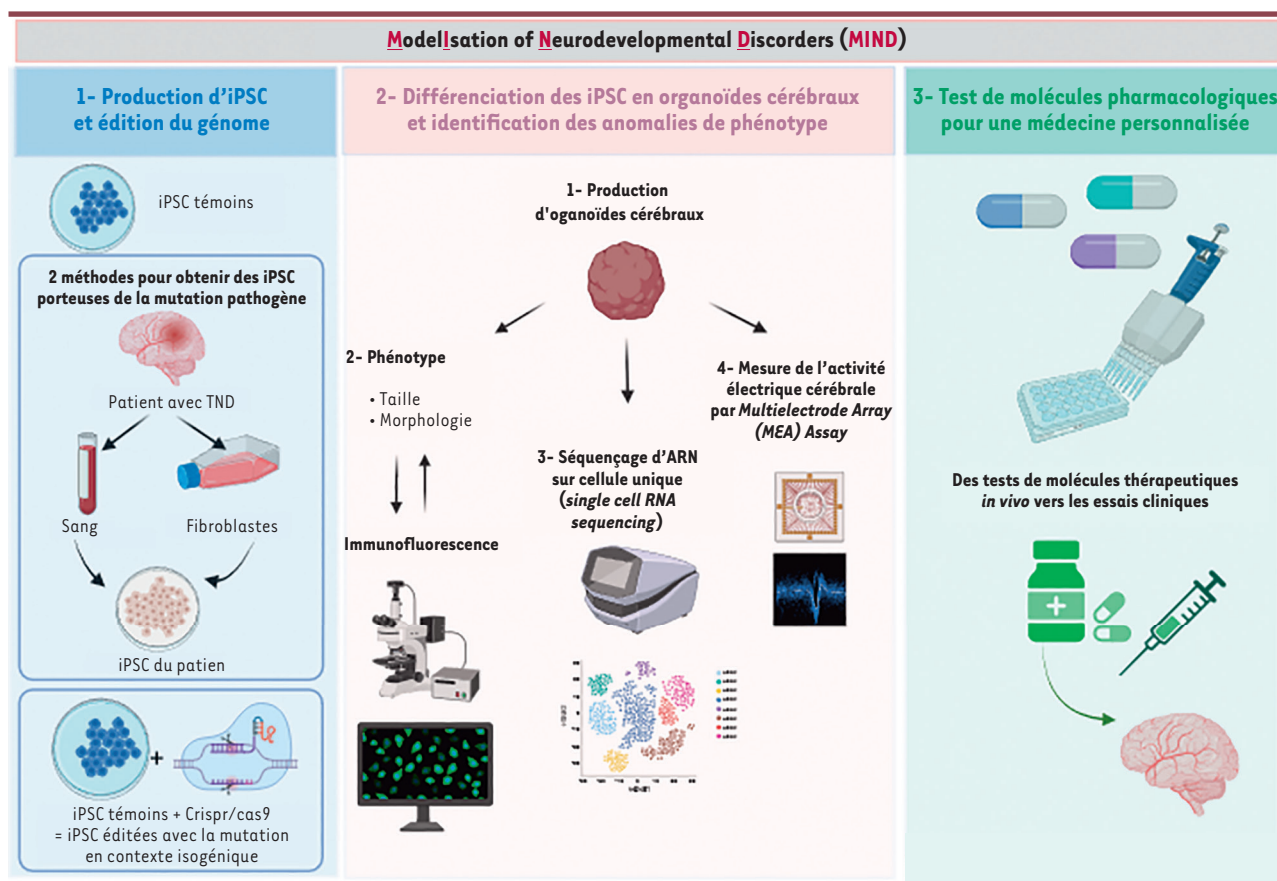


Figure 3. Le projet MIND (modélisation of neurodevelopmental disorders) et la modélisation des maladies neurodéveloppementales par production d'organoïdes cérébraux. Les iPSC porteuses de la variation pathogène sont utilisées pour produire des organoïdes cérébraux dont la morphologie, le génotype et la fonction sont étudiés et comparés à des organoïdes provenant d'iPSC saines (témoins). Le but de ce projet est de caractériser les mécanismes cellulaires responsables de la maladie dans l'espoir d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer des tests de molécules pharmaceutiques *in vitro* (Figure créée avec BioRender.com).

lulaires impliqués dans la pathogénèse des TDN et découvrir de potentielles cibles thérapeutiques en testant *in vitro* des molécules pharmacologiques, dans l'espoir de développer des essais précliniques pour une médecine personnalisée (projet MIND [modelisation of neurodevelopmental disorders], Figure 3). L'identification de nouveaux gènes candidats, dont les variations sont responsables de TND, ou de variations de signification incertaine, est la première étape du projet. Des iPSC obtenues à partir du sang ou d'une biopsie de peau de patient, ou les iPSC obtenues par la technique CRISPR/Cas9, sont utilisées pour produire des organoïdes cérébraux pour lesquels les étapes du développement, la morphologie, la structure, et la fonction sont étudiées et comparées à des organoïdes produits à partir d'iPSC issues de cellules de donneurs sains.

Étudier le développement de l'organoïde

La taille de l'organoïde au cours de son développement (Figure 4A) est un critère important qui peut permettre de confirmer l'implication d'un variant génétique dans le cas de l'étude d'anomalies de taille du cerveau, comme la microcéphalie [43] ou la mégalencéphalie

[44]. Des immunomarquages, réalisés sur des coupes d'organoïdes, peuvent ensuite révéler des pistes pour comprendre les mécanismes impliqués. Il est ainsi possible d'observer, avec les différents marqueurs, un nombre important de rosettes avec une zone ventriculaire (exprimant PAX6 [paired box 6]) et des zones corticales (Figure 4B). La prolifération des progéniteurs (révélée par le marqueur Ki67) et leur axe de division (visualisé par HTA28 [histone H3 phospho Ser28] et Tpx2 [targeting protein for Xklp2]), ainsi que la mise en place des différentes structures à identité neuronale spécifique (PAX6 pour les progéniteurs, TBR1 [T-brain transcription factor 1] / TUJ1 [class III beta-tubulin] / SATB2 [special AT-rich sequence-binding protein 2] / CTIP2 [coup-TFI interacting protein 2] pour les neurones à apparition précoce ou tardive, ou GFAP [glial fibrillary acidic protein] pour les astrocytes) peuvent également être visualisées (Figure 4C, D). Les résultats de ces immunomarquages permettent d'élaborer des hypo-

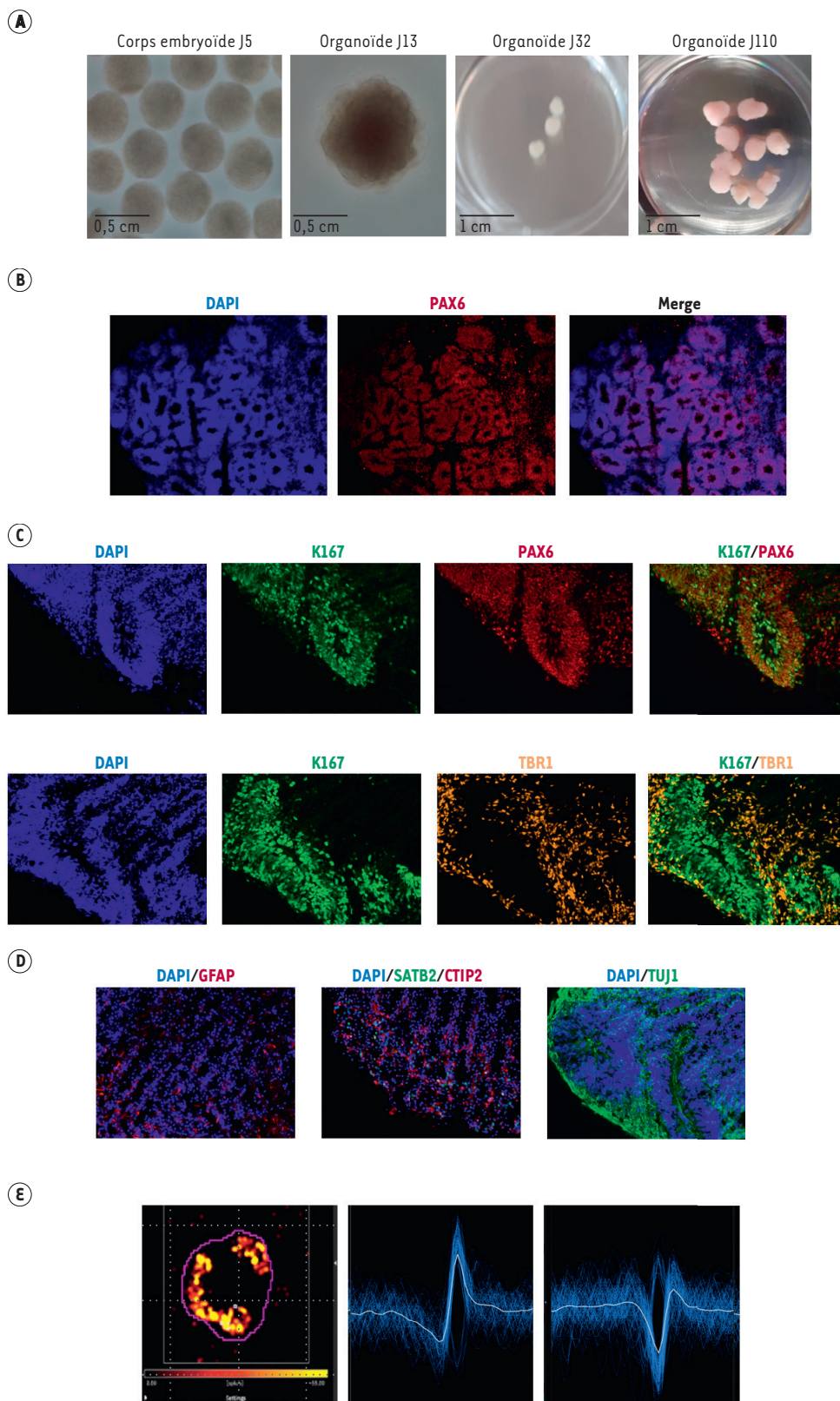


Figure 4. Analyses morphologiques et fonctionnelles des organoïdes cérébraux.

A. Évolution des organoïdes cérébraux en culture, du stade « corps embryonaire », à 5 jours de culture, jusqu'à 110 jours de culture. Les deux images de gauche montrent des observations d'organoïdes à la loupe ($\times 4,5$), les deux autres à l'œil nu. Les organoïdes cérébraux ont été produits en utilisant le kit *STEMdiff™ Cerebral Organoid* de *STEMCELL™ Technology*. **B.** Visualisation des rosettes d'un organoïde cérébral après 25 jours de culture (J25) avec un marquage par un anticorps anti-PAX6 spécifiques des progéniteurs neuronaux. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (grossissement $\times 10$). **C.** marquage d'un organoïde à J25 montrant la colocalisation du marqueur de prolifération Ki67 (en vert) avec les progéniteurs neuronaux exprimant PAX6 (PAX6+) (en rouge), mais pas avec le marqueur neuronal TBR1 (en orange) (grossissement $\times 20$). **D.** Immunomarquages d'un organoïde à J115 montrant la présence de cellules GFAP+ (en rouge), SATB2+ (en vert), CTIP2+ (en rouge) et TUJ1+ (en vert) (grossissement $\times 20$). **E.** Capture d'écran de la « heat map », réalisée à l'aide du logiciel *3Brain*, montrant l'enregistrement avec une puce de 4 096 microélectrodes, de l'activité électrique d'un organoïde cérébral (délimité par le contour violet). À droite, exemples de signaux d'activité neuronale enregistrés sur deux microélectrodes de la puce. PAX6 : *paired box 6* ; TBR1 : *T-box brain transcription factor 1* ; GFAP : *glial fibrillary acidic protein* ; SATB2 : *special AT-rich sequence-binding protein 2* ; CTIP2 : *coup-TFI interacting protein 2* ; TUJ1 : *class III beta-tubulin*.

thèses quant aux mécanismes impliqués dans ces maladies. Ainsi, une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux, associée à leur différenciation accélérée en neurones, peut être le reflet *in vitro* d'une microcéphalie. À l'inverse, une prolifération exagérée des progéniteurs associée à un retard de la différenciation neuronale orientera vers une mégalencéphalie.

Étudier l'activité électrique de l'organoïde

Après 12 semaines de culture, l'organoïde cérébral est doté d'activité électrique spontanée. Cette activité peut être mesurée par la technique de puces à microélectrodes (MEA) : l'organoïde est déposé sur une micropuce (*3Brain*)⁶ permettant l'enregistrement des pics d'activité électrique produite par les neurones qui le constituent (*Figure 4E*). La fréquence et l'intensité de ces pics survenant spontanément ou après stimulation électrique ou chimique sont enregistrées. Ce système permet ainsi de tester l'effet de molécules à potentiel pharmacologique sur l'activité des cellules.

Étudier le transcriptome

Des analyses transcriptomiques, réalisées par séquençage de l'ARN sur cellule unique (scRNA-seq), permettent d'évaluer l'expression des gènes dans chaque type cellulaire composant l'organoïde. Il est ainsi possible de définir l'identité de chacune des cellules, les voies de différenciation qui sont activées, et le devenir des cellules, et ainsi d'appréhender l'impact possible d'une variation génétique sur le développement du cerveau. Les résultats de ces analyses permettent de définir des groupes de cellules composant l'organoïde, selon leur profil transcriptomique, et ainsi d'identifier les divergences à l'échelle de la cellule et à l'échelle de l'organoïde.

Le projet MIND

Dans le cadre du projet MIND, différents gènes candidats, dont des variants seraient à l'origine de TND, sont explorés. Nous présentons les études portant sur deux de ces gènes.

Le gène *PTBP1*

La protéine PTBP1 (*polypyrimidine tract-binding protein 1*) est une protéine de liaison à l'ARN qui participe à la régulation de l'épissage alternatif. Ce facteur d'épissage navigue entre le noyau et le cytoplasme grâce à la présence, à son extrémité N-terminale, d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) et d'une séquence d'exportation nucléaire (NES). Des variations pathogènes, apparues *de novo* ou héritées, et affectant la localisation de cette protéine, ont été trouvées chez 23 individus présentant un nouveau syndrome caractérisé par différents troubles du neurodéveloppement. Les études *in vivo*, réalisées chez le poisson zèbre, et *in vitro* sur des fibroblastes de patients ou de souris (cellules NIH-3T3) dans lesquels les variations pathogènes ont été introduites, ont mis en évidence plusieurs défauts cellulaires. Les études actuelles consistent à produire des organoïdes

cérébraux à partir d'iPSC de patients afin d'en définir la morphologie, et de les caractériser histologiquement et fonctionnellement. La technique de séquençage de l'ARN sur cellule unique, réalisée au cours du développement de l'organoïde, apporte des informations quant aux trajectoires développementales qui sont affectées par la mutation. Un modèle murin dans lequel la mutation humaine la plus fréquente est introduite (*knock-in*) complète cette analyse avec l'étude du développement embryonnaire du cerveau. Ce modèle permet en outre de comparer les effets des variations génétiques d'intérêt entre espèces (homme/souris). Ce type d'étude, associant plusieurs méthodes et modèles complémentaires, est essentiel pour accroître les connaissances sur la fonction de la protéine étudiée et sur le développement sain et pathologique du cerveau, et ainsi comprendre la cause des symptômes des patients, avec à long terme, la perspective de thérapies ciblées.

Le gène *PIK3CA*

Le gène *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) code la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), une protéine kinase impliquée dans les premières étapes de phosphorylation de la voie de signalisation PI3K/AKT (protéine kinase B)/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une voie très importante dans la prolifération et le métabolisme cellulaires. Cette voie est souvent ciblée par les thérapies utilisées dans de nombreux cancers. Elle est également l'objet d'essais cliniques réalisés dans le cadre de maladies rares, comme les syndromes avec hypercroissance découlant de variations dans *PIK3CA* (syndromes PROS, pour *PIK3CA-related overgrowth syndromes*) [45]. Parmi ces syndromes, le syndrome MCPA (*megalencephaly-capillary malformation-polymicrogyria*, MIM⁷ # 602501) est caractérisé par une mégalencéphalie⁸ et une polymicrogyrie⁹, associées ou non à des retards cognitifs et moteurs, des malformations vasculaires des parties molles, et des anomalies distales des membres. Les variations de *PIK3CA* sont principalement post-zygotiques, mais elles peuvent être constitutives dans de très rares cas. Grâce à l'engagement de notre équipe auprès des patients PROS (collaborations nationales et internationales pour le diagnostic, le suivi, les essais cliniques et les études fonctionnelles *in vitro*), des iPSC, issues d'une patiente de 3 ans souffrant du

⁶ Puce de 3 mm x 3 mm contenant 4 096 microélectrodes.

⁷ *Mendelian Inheritance in Man* est une base de données regroupant les gènes et les phénotypes associés.

⁸ Hypertrophie cérébrale totale ou partielle.

⁹ Malformation du cortex cérébral caractérisée par une surface corticale irrégulière et un nombre excessif de petites circonvolutions.

syndrome MCAP résultant d'une mutation constitutive de *PIK3CA*, ont été obtenues par reprogrammation des cellules sanguines mononucléées de la patiente. Une des hypothèses pour expliquer l'apparition de ce syndrome est l'existence d'une prolifération exagérée des progéniteurs neuraxiaux, due à l'activation constitutive de *PIK3CA* et, par conséquent, à celle permanente de la voie *PI3K/AKT/mTOR*. Cette prolifération exagérée associée à un retard de différenciation pourrait être l'explication de la mégalencéphalie. Cette étude constitue une preuve de concept pour l'utilisation des organoïdes cérébraux dans l'avancée de la recherche de thérapies pour les TND et comme modèles précliniques pertinents. Elle est liée à l'essai clinique SESAM (dont le promoteur est le CHU de Dijon). Il s'agit d'un essai multicentrique de phase II, en double aveugle, contrôlé par placebo, visant à évaluer la sécurité et l'efficacité de l'alpelisib (BYL719), inhibiteur de la phosphatidylinositol-3-kinase, chez les patients pédiatriques et adultes atteints du syndrome MCAP. Cette molécule, ou d'autres molécules non encore testées chez l'homme mais connues pour leur efficacité *in vitro*, comme le triptolide [46], seront testées sur les organoïdes cérébraux produits, dans l'espoir d'en corriger le phénotype.

Conclusion

Décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans les maladies associant des anomalies cérébrales est crucial pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. En plus d'être une nouvelle source de connaissances des bases moléculaires et cellulaires du développement cérébral humain, les organoïdes cérébraux représentent un puissant outil pour modéliser et comprendre l'impact de variants génétiques dans les TND ou toutes autres maladies affectant le développement ou les fonctions du cerveau. Ils offrent une opportunité sans précédent pour tester des molécules pharmacologiques dans l'espoir de découvrir de nouveaux traitements, voire d'envisager une médecine personnalisée. ♦

SUMMARY

The contribution of cerebral organoids to the understanding and treatment of rare genetic diseases with neurodevelopmental disorders

Rare genetic diseases with neurodevelopmental disorders (NDDs) encompass several heterogeneous conditions (autism spectrum disorder (ASD), intellectual disability (ID), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), specific learning disorder (SLD), among others). Currently, few treatments are available for these patients. The difficulty in accessing human brain samples and the discrepancies between human and animal models highlight the need for new research approaches. One promising approach is the use of the cerebral organoids. These 3D, self-organized structures, generated from induced pluripotent stem cells (iPSCs), enable the reproduction of the stages of human brain development, from the proliferation of neural stem cells to their differentiation into neurons, oligodendrocytes, and astrocytes. Cerebral organoids hold great promise in understanding brain development and in the search for treatments. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions les patients et leur famille pour leurs consentements pour les biopsies de peau ou les prises de sang. La production des iPSC, la production des organoïdes et les analyses qui en découlent sont financés par les projets PERSONALISE (ISITE-FEDER), MIND (amorçage CHU Région Bourgogne-Franche Comté), et MultiomixCare : cette étude a reçu le soutien financier du « Programme Prioritaire de Recherche Maladies Rares » du Programme français d'Investissements d'Avenir.

LIENS D'INTÉRÊT

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

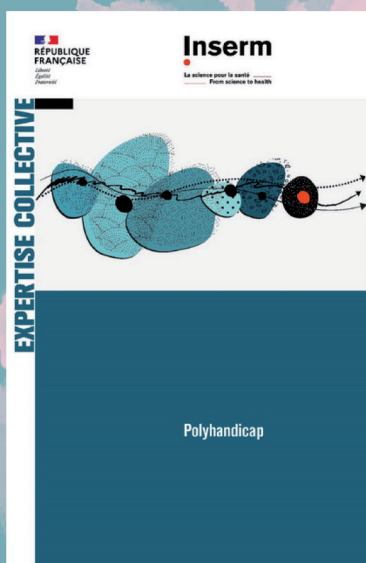
RÉFÉRENCES

- Schule R, Timmann D, Erasmus CE *et al.* Solving unsolved rare neurological diseases—a Solve-RD viewpoint. *Eur J Hum Genet* 2021 ; 29 : 1332–6.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861–72.
- Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol* 2013 ; 997 : 23–33.
- Kieffer E, Kuntz S, Viville S. Tour d'horizon des lignées de cellules souches pluripotentes *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 848–54.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000 ; 6 : 88–95.
- Chneiweiss H, Dubart-Kupperschmitt A, Duclos-Vallee JC, *et al.* Pour une bonne compréhension et un bon usage du terme « organoïdes ». *Med Sci (Paris)* 2023 ; 39 : 876–8.
- Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, *et al.* Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008 ; 3 : 519–32.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2014 ; 9 : 2329–40.
- Eichmüller OL, Knoblich JA. Human cerebral organoids—a new tool for clinical neurology research. *Nat Rev Neurol* 2022 ; 18 : 661–80.
- Acharya P, Choi NY, Shrestha S, *et al.* Brain organoids: A revolutionary tool for modeling neurological disorders and development of therapeutics. *Biotechnol Bioeng* 2024 ; 121 : 489–506.
- Birey F, Andersen J, Makinson CD, *et al.* Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature* 2017 ; 545 : 54–9.
- Bagley JA, Reumann D, Bian S, *et al.* Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat Methods* 2017 ; 14 : 743–51.
- Andersen J, Revah O, Miura Y, *et al.* Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. *Cell* 2020 ; 183 : 1913–29 e26.
- Krenn V, Bosone C, Burkard TR, *et al.* Organoid modeling of Zika and herpes simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. *Cell Stem Cell* 2021 ; 28 : 1362–79 e7.
- Ramani A, Müller L, Ostermann PN, *et al.* SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J* 2020 ; 39 : e106230.
- Xu R, Brawner AT, Li S, *et al.* OLIG2 Drives Abnormal Neurodevelopmental Phenotypes in Human iPSC-Based Organoid and Chimeric Mouse Models of Down Syndrome. *Cell Stem Cell* 2019 ; 24 : 908–26 e8.
- Kang Y, Zhou Y, Li Y, *et al.* A human forebrain organoid model of fragile X syndrome exhibits altered neurogenesis and highlights new treatment strategies. *Nat Neurosci* 2021 ; 24 : 1377–91.
- Khan TA, Revah O, Gordon A, *et al.* Neuronal defects in a human cellular model of 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Med* 2020 ; 26 : 1888–98.
- Papes F, Camargo AP, de Souza JS, *et al.* Transcription Factor 4 loss-of-function is associated with deficits in progenitor proliferation and cortical neuron content. *Nat Commun* 2022 ; 13 : 2387.
- Paulsen B, Velasco S, Kedaigle AJ, *et al.* Autism genes converge on asynchronous development of shared neuron classes. *Nature* 2022 ; 602 : 268–73.
- Kim H, Park HJ, Choi H, *et al.* Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Reports* 2019 ; 12 : 518–31.
- Jo J, Yang L, Tran HD, *et al.* Lewy Body-like Inclusions in Human Midbrain Organoids Carrying Glucocerebrosidase and alpha-Synuclein Mutations. *Ann Neurol* 2021 ; 90 : 490–505.
- Raja WK, Mungenast AE, Lin YT, *et al.* Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0161969.

24. Park JC, Jang SY, Lee D, et al. A logical network-based drug-screening platform for Alzheimer's disease representing pathological features of human brain organoids. *Nat Commun* 2021 ; 12 : 280.
25. Krieger TG, Tirier SM, Park J, et al. Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. *Neuro Oncol* 2020 ; 22 : 1138-49.
26. Ogawa J, Pao GM, Shokhirev MN, et al. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep* 2018 ; 23 : 1220-9.
27. Srikanth P, Lagomarsino VN, Muratore CR, et al. Shared effects of DISC1 disruption and elevated WNT signaling in human cerebral organoids. *Transl Psychiatry* 2018 ; 8 : 77.
28. Shou Y, Liang F, Xu S, et al. The Application of Brain Organoids: From Neuronal Development to Neurological Diseases. *Front Cell Dev Biol* 2020 ; 8 : 579659.
29. Marinho LSR, Chiarantin GMD, Ikebara JM, et al. The impact of antidepressants on human neurodevelopment: Brain organoids as experimental tools. *Semin Cell Dev Biol* 2023 ; 144 : 67-76.
30. Fan P, Wang Y, Xu M, et al. The Application of Brain Organoids in Assessing Neural Toxicity. *Front Mol Neurosci* 2022 ; 15 : 799397.
31. Zhou Y, Song H, Ming GL. Genetics of human brain development. *Nat Rev Genet* 2024 ; 25 : 26-45.
32. Ormel PR, Vieira de Sa R, van Bodegraven EJ, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 4167.
33. Ye B. Approaches to vascularizing human brain organoids. *PLoS Biol* 2023, 21 (5):e3002141.
34. Qian X, Su Y, Adam CD, et al. Sliced Human Cortical Organoids for Modeling Distinct Cortical Layer Formation. *Cell Stem Cell* 2020 ; 26 : 766-81 e9.
35. Giandomenico SL, Mierau SB, Gibbons GM, et al. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat Neurosci* 2019 ; 22 : 669-79.
36. Dao L, You Z, Lu L, et al. Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. *Cell Stem Cell* 2024 ; 31 : 818-33.
37. Lavazza A, Massimini M. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics* 2018; 44 : 606-10.
38. Koplin JJ, Savulescu J. Moral Limits of Brain Organoid Research. *J Law Med Ethics* 2019 ; 47 : 760-7.
39. Hyun I, Scharf-Deering JC, Lunshof JE. Ethical issues related to brain organoid research. *Brain Res* 2020 ; 1732 : 146653.
40. Boyd JL. Moral considerability of brain organoids from the perspective of computational architecture. *Oxf Open Neurosci* 2024 ; 3 : kvae004.
41. de Thonel A, Ahlskog JK, Daupin K, et al. CBP-HSF2 structural and functional interplay in Rubinstein-Taybi neurodevelopmental disorder. *Nat Commun* 2022 ; 13 : 7002.
42. Trujillo CA, Adams JW, Negraes PD, et al. Pharmacological reversal of synaptic and network pathology in human MECP2-KO neurons and cortical organoids. *EMBO Mol Med* 2021 ; 13 : e12523.
43. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013 ; 501 : 373-9.
44. Li Y, Muffat J, Omer A, et al. Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell Stem Cell* 2017 ; 20 : 385-96 e3.
45. Hillmann P, Fabbro D. PI3K/mTOR Pathway Inhibition: Opportunities in Oncology and Rare Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 2019 ; 20 : 5792.
46. Da Costa R, De Almeida S, Chevarin M, et al. Neutralization of HSF1 in cells from PIK3CA-related overgrowth spectrum patients blocks abnormal proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2020 ; 530 : 520-6.
47. Chneiweiss H. Organoides : nouvelles perspectives et nouvelles questions éthiques. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 99-100.

TIRÉS À PART
L. Duplomb

Polyhandicap : Comprendre, Accompagner et Soutenir



La notion de « polyhandicap » apparue en France dans les années 1960 a évolué de façon progressive. Le polyhandicap correspond aux conséquences définitives d'une lésion survenue sur un cerveau en développement. Au niveau fonctionnel, il associe une déficience motrice sévère et une déficience mentale sévère à profonde qui engendrent une restriction extrême de la communication, de l'autonomie et de la mobilité.

Ce livre propose de nombreuses recommandations visant à améliorer l'accompagnement et le bien-être des personnes en situation de polyhandicap, ainsi que le soutien des familles, des soignants et des aidants.

En vente sur laboutique.edpsciences.fr

ISBN : 978-2-7598-3601-7
904 pages illustrées
Prix : 80 €

