

Séminaire comité de direction/collège d'experts de FRANCOPA

20 juin 2017, BIOPARK

COMPTE-RENDU

Présents : cf. feuille de présence ci-jointe

Ordre du jour

- 09h00-09h30 Accueil - café
09h30-10h00 Introduction par le directeur et la présidente

Modérateur : Jean-Pierre CLOT (OPAL)

- 10h00-10h30 Jean-Paul BEAUFAYS (Université de Namur)
« Expérimentation animale et méthodes alternatives : état des lieux en Wallonie »
- 10h30-11h00 Yves-Edouard HERPE (Biobanque Picardie, CHU Amiens)
« Cellules souches pluripotentes et organoïdes : l'apport des biobanques. L'exemple des hepatocyte-likecells obtenus à la Biobanque de Picardie et des organoïdes hépatiques »
- 11h00-11h30 Samuel CONSTANT (Epithelix)
« Modèles tissulaires 3D humains du système respiratoire pour l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité de produits inhalés »
- 11h30-12h00 Cédric GERBEIX (CiToxLAB)
« Alternative testing platform at CiToxLAB »

-
-
- 12h00-13h30 Déjeuner

Modérateur : Brigitte RAULT (INSERM)

- 13h30-14h00 Xavier GIDROL (CEA)
« Potentiel des organoïdes humains en génomique fonctionnelle et phénomique »
- 14h00-14h30 Nathalie VERGNOLLE (INSERM)
« Organoïdes sains et pathologiques : du modèle d'étude au test de médicaments »
- 14h30-15h00 Odette PRAT (CEA, collaboration avec Kallistem)
« Fongicides et toxicité testiculaire : recherche des mécanismes et de biomarqueurs potentiels sur une culture cellulaire organotypique de rat »
- 15h00-16h00 Table ronde avec tous les intervenants : « Perspectives ouvertes par les organoïdes en toxicologie, recherche en physiologie et recherche médicale »
Animateur : Thierry GALLI (INSERM)
Synthèse de la table ronde : Rémi MAXIMILIEN (CEA)
- 16h00-17h00 Synthèse de la journée et esquisse d'un « position paper »
Philippe HUBERT (Directeur de FRANCOPA)

Introduction par le Directeur et la Présidente

Francelyne MARANO retrace l'historique de la plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale et informe des actions menées par FRANCOPA depuis un an dont principalement la publication de trois lettres d'information, la diffusion de la nouvelle version du rapport « Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France » dont les principales recommandations sont d'éviter les expérimentations superflues, d'intégrer les méthodes alternatives dans l'enseignement des sciences de la vie, d'orienter la recherche vers des outils novateurs, de construire, faire connaître les nouvelles approches et leurs opérateurs, de passer de la recherche à des outils opérationnels appuyés sur un réseau de ressources, de se doter des moyens de faire connaître la qualité des méthodes innovantes (normalisation, certification volontaire, autres processus de validation). La participation à la plate-forme européenne ainsi que l'élection de Philippe HUBERT à la présidence d'ECOPA est également soulignée.

Philippe HUBERT annonce l'organisation par FRANCOPA du colloque ECOPA 2018 dont l'objet serait les nouveaux outils d'investigation du vivant et le principe des 3Rs, sans restriction d'objets ou d'outils. Ce colloque, d'une durée de 2 jours maximum, se déroulera à Paris à l'automne et sera dimensionné afin d'accueillir plus de 200 participants. Afin d'accroître l'attractivité de l'évènement, une co-organisation serait envisagée à l'occasion des 50 ans de l'OPAL. Après avoir évoqué les atouts et les difficultés rencontrées par FRANCOPA, l'objet du séminaire est présenté en évoquant une définition des organoïdes, leurs caractéristiques principales, et l'intérêt croissant suscité par ces techniques comme en témoigne l'augmentation du nombre de publications concernant les organoïdes ainsi que les cultures 3D.

Jean-Pierre CLOT, président de l'OPAL, est le modérateur de la session de la matinée.

Expérimentation animale et méthodes alternatives : état des lieux en Wallonie (Jean-Paul BEAUFAYS, Université de Namur)

Jean-Paul BEAUFAYS présente l'état des lieux des méthodes alternatives à l'expérimentation animale en Wallonie réalisé en quatre étapes différentes. La première opération concerne la tenue du colloque WALCOPA à l'université de Namur durant lequel trois sessions ont permis de recenser les méthodes alternatives et innovantes développer en recherche, d'aborder les aspects éthiques de ces méthodes et d'ouvrir le dialogue en permettant aux citoyens, aux associations de la protection animale de s'exprimer au même titre que les scientifiques. Le second point concerne l'analyse statistique d'indicateurs afin de comparer les informations disponibles quant à l'utilisation du modèle animal et non animal. Force est de constater que les données concernant le dernier point sont très peu disponibles. Le troisième point concerne l'identification des structures impliquées dans le développement et l'utilisation de méthodes alternatives. Deux types de structure de promotion des méthodes alternatives ont été identifiés, les laboratoires NAM (non animal model) et les centres de recherche en sciences humaines. La dernière étape consiste en une enquête menée auprès des chercheurs qui a permis d'identifier les domaines, la recherche fondamentale et appliquée, dans lesquels les méthodes alternatives étaient employées. Parmi les 3Rs, le remplacement relatif et la réduction sont les plus fréquemment mis en œuvre, et les méthodes *In vitro* sont les méthodes alternatives les plus étudiées devant *l'Ex vivo*, et *l'In silico* en Wallonie. Jean-Paul BEAUFAYS conclut en évoquant l'avenir possible des méthodes alternatives en Wallonie avec la création de deux infocentres (scientifiques et citoyens), de commissions d'éthique, l'amélioration de la définition, la classification et la valorisation des méthodes alternatives.

Cellules souches pluripotentes et organoïdes : l'apport des biobanques. L'exemple des hepatocyte-like cells obtenus à la Biobanque de Picardie et des organoïdes hépatiques (Yves-Edouard HERPE, Biobanque Picardie - CHU Amiens)

Les biobanques ne sont pas de simples congélateurs permettant la conservation d'échantillons biologiques. Elles ont pour rôle de maîtriser les paramètres pré-analytiques essentiels à la reproductibilité des résultats issus de la recherche, en traçant l'ensemble des événements de vie d'un échantillon, contrôlant leur qualité, traçant les annotations clinico-biologiques dans des bases de données sécurisées et déclarées, en sécurisant et optimisant leur stockage grâce à une infrastructure dédiée. Elles sont par ailleurs garantes du respect des exigences réglementaires par la déclaration des collections après du ministère de la santé, de la base de données auprès de la CNIL, et le suivi des consentements. Fondée en 1991, la biobanque de Picardie est l'une des plus anciennes de France. Elle bancarise des collections de recherche en hépato gastroentérologie, urologie et néphrologie, de maladies infectieuses et génétiques, héberge la collection d'une vingtaine de projets de recherche clinique et mène une activité de recherche sur les hépatocytes primaires humains ainsi que sur les cellules souches pluripotentes induites. Les lignées d'iPS obtenues à la Biobanque de Picardie présentent les caractéristiques morphologiques typiques des cellules souches pluripotentes et expriment les marqueurs de primitivité ce qui a permis de les valider. L'exposition séquentielle à des molécules permet de mimer les grandes étapes du développement embryonnaire du foie conduisant à la différenciation hépatique vers 21 jours avec l'apparition de cellules dont la morphologie, le profil d'expression génique et la fonction sont caractéristiques. Yves-Edouard HERPE indique ensuite que les biobanques ont un rôle majeur à jouer dans le développement des organoïdes en tant qu'infrastructure dédiée au stockage d'un grand nombre d'échantillons dont l'accès à différentes ressources biologiques est facilité de par leur structure hospitalière. Cependant, quelques questions sont en suspens comme le statut éthique et légal des organoïdes ainsi que la possible adaptation du consentement.

Modèles tissulaires 3D humains du système respiratoire pour l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité de produits inhalés (Samuel CONSTANT, Epithelix)

Samuel Constant a présenté trois modèles tissulaires 3D commercialisés par la société Epithelix. MucilAir™ est un modèle tissulaire 3D d'épithélium des voies aériennes humaines. Ce modèle présente une similarité de morphologie (interface air/liquide, mouvements des cils, différents types cellulaires), de fonctionnalité (production de mucus, transport actif d'ions, activité métabolique) et présente les avantages d'être facile à maintenir (un an) et à manipuler. Les épithéliums liés à différentes pathologies sont également disponibles (asthme, rhinite allergique, ...). Le second modèle SmallAir™ mime les cellules des petites voies aériennes primaire (Fig. 1).

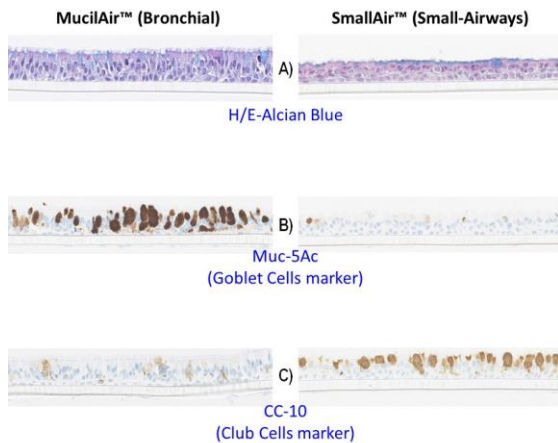


Figure 1 : Histologie et Immunohistochimie des modèles MucilAir™ et SmallAir™

Le modèle MucilAir™ est utilisé pour différents tests fonctionnels *in vitro* tels que des tests de toxicité, d'infections bactériennes ou virales, d'agents anti-inflammatoires, d'activité mucolytique. Différents résultats sont présentés dont une étude de toxicité du formaldéhyde après une exposition répétée de 90 jours, première transposition *in vitro* de la ligne directrice OCDE n° 413, sont présentés.

OncoCilAir™ est un modèle 3D utilisé pour la recherche sur le cancer du poumon qui peut être utilisé pour les études d'efficacité de médicaments, de toxicité aiguë et chronique ou encore sur des nanoparticules.

Alternative testing platform at CiToxLAB (Cédric GERBEIX, CiToxLAB)

CiToxLAB est un CRO spécialisé dans l'évaluation pré-clinique, ayant développé une plateforme de modèles *in vitro* dédiée aux tests réglementaires lui permettant de proposer différents tests tels que l'absorption cutanée *In Vitro* (ligne directrice OCDE n° 428), la tolérance cutanée (lignes directrices OCDE n° 431, 439), tolérance oculaire (lignes directrices OCDE n° 437, 438, 492), sensibilisation cutanée (lignes directrices OCDE n° 442 C, D et E), phototoxicité (lignes directrices OCDE n° 101, 432, PhotoEpiSkin) et métabolisme (Phase I/Phase II notamment; via une collaboration avec la société française KaLyCell). Cédric Gerbeix précise que CiToxLAB est engagé depuis 10 ans dans la validation de nouvelles méthodes *in vitro*, membre du réseau EU-NETVAL mis en place par l'ECVAM depuis 2014, et participe à la définition d'une stratégie de tests *in vitro* pour l'irritation oculaire (projet CON4EI). Ce dernier projet a pour objectif de tester 80 produits chimiques avec 8 méthodes différentes et par 8 partenaires.

Différentes perspectives sont finalement évoquées concernant le développement d'AOP par l'OCDE et l'US-EPA, l'augmentation constante de la demande de tests *in vitro* pour les produits cosmétiques, pour les produits chimiques entrant dans le champ d'application de REACH jusqu'au prochain délai d'enregistrement de 2018, pour les produits pharmaceutiques et phytosanitaires.

Les modèles 3D de tissus humains (organoïdes, organes sur puces) en oncologie (Xavier GIDROL, CEA)

Les substituts d'organes doivent permettre une meilleure compréhension du vivant en termes d'organogénèse, pathogénèse, physiologie, d'optimiser la médecine régénérative, l'ingénierie tissulaire, le développement de la médecine personnalisée, d'optimiser la découverte de nouveaux agents thérapeutiques et mieux évaluer les dispositifs médicaux, de remplacer et réduire les tests sur les animaux.

Les applications diffèrent en fonction des domaines d'utilisation et des techniques de production des organoïdes :

	Recherche Fondamentale	Industrie pharmaceutique	Ingénierie tissulaire Médecine Régénérative
Cultures d'organoïdes ou de spheroides Culture en 3D d'amas cellulaires (monoculture ou co-culture) dans un hydrogel	<ul style="list-style-type: none"> • Organogénèse • Physiologie de l'organe • Pathologies de l'organe • Génomique fonctionnelle 	Tests d'efficacité et de toxicité des médicaments.	Thérapie cellulaire. Greffe d'organoïdes pour restaurer au moins partiellement une fonction organique. Médecine de précision avec organoïdes du patient
Organes-sur-puces Microsystèmes biomimétiques ou bioinspirés, liant canaux microfluidiques à des tapis cellulaires en 2D ou en 3D. Ajout possible de capteurs de toutes sortes.	Etudes des propriétés chimiques et physiques de l'organe, de la fonction physiologique (e.g. Etude du secrétome)	Métabolisme des médicaments, Pharmacocinétique et pharmacodynamique. Vers « human-on-chip ». Recherche de Biomarqueurs	Plutôt un dispositif médical qui viendrait suppléer les fonctions de l'organe
Bioimpression 3D Impression en 3D de bioencres contenant des cellules vivantes.	Impression contrôlée, structurée de différents types cellulaires, réseaux de vascularisation,	Tests d'efficacité et de toxicité des médicaments	Réparation tissulaire, impression in-situ. A plus long terme, Impression d'organes pour transplantations, y compris avec cellules du patient.

Xavier Gidrol développe un exemple concernant le développement de l'acinus et la carcinogénèse. Les organoïdes et les cultures 3D fournissent des informations essentielles sur la cancérogénèse. Les organes sur puce ont un fort potentiel d'application en tant qu'outils de diagnostic.

Organoïdes sains et pathologiques : du modèle d'étude au test de médicaments (Nathalie VERGNOLLE, INSERM)

Les organoïdes du colon sont des outils de recherche de composition cellulaire complexe, dont la distribution cellulaire est comparable à celles des tissus humains, fonctionnels (sécrétion, barrière). une application a été développée pour l'étude de pathologies telles que les affections intestinales inflammatoires. En absence de cellules immunitaires, l'épithélium conserve le phénotype inflammatoire. Entre le témoin sain et l'épithélium inflammatoire, la composition cellulaire est identique mais les activités biologiques sont différentes. Ces modèles sont aussi utilisés afin de prédire et comparer les effets de thérapies différentes.

Fongicides et toxicité testiculaire : recherche des mécanismes et de biomarqueurs potentiels sur une culture cellulaire organotypique de rat (Odette PRAT, CEA, Collaboration avec Kallistem)

Odette PRAT présente une étude dans laquelle un modèle ex vivo innovant a été développé afin de tester une toxicité envers les testicules de rat. L'étude présentée concerne la toxicité testiculaire de deux fongicides, le carbendazim et l'iprodione en utilisant un modèle Ex vivo, afin d'évaluer leur mécanisme de toxicité sur la spermatogénèse, d'identifier des biomarqueurs potentiels de toxicité testiculaire. En effet les usages massifs de produits phytosanitaires sont suspectés en tant que responsable pour partie de l'augmentation des désordres testiculaires. Il est donc urgent de disposer de méthodes in vitro permettant de tester la toxicité des produits chimiques sur la spermatogénèse. Le modèle utilisé (Bio-Alter®) est constitué d'un compartiment apical comportant les cellules germinales, de Sertoli et une membrane reposant sur le compartiment basal. Ce modèle mime la puberté du rat, période critique du cycle de vie en termes de perturbations endocrines. Les résultats démontrent que la méiose est clairement perturbée par ces deux fongicides. Grâce à cette méthode les effets cellulaires de deux fongicides et de leur mélange peuvent être quantifiés et comparés. Cette méthode peut donc être utilisée en tant qu'outil de screening dans le cadre de priorisation de perturbateurs endocriniens.

Table ronde avec tous les intervenants : « Perspectives ouvertes par les organoïdes en toxicologie, recherche en physiologie et recherche médicale »

Animateur : Thierry GALLI (INSERM)

Les intervenants ont échangé à l'occasion d'une table ronde animée par Thierry GALLI.

Quatre questions ont alors été traitées !

1. Quel sont les usages des organoïdes : des outils pour la recherche et la réglementation ?

Au niveau réglementaire, des modèles de peau, oculaire sont utilisés comme cela a été présenté. Les modèles 3D peuvent aussi être pertinents pour évaluer certaines thérapies.

Le modèle animal demeure nécessaire pour tenir compte de la réponse immunitaire qui n'est pas reproduite sur organoïde ou trop partiellement.

2. Comment se placent-ils dans les différentes approches en recherche fondamentale et appliquée ?

Thierry Galli indique que l'articulation avec le modèle animal est nécessaire car il est toujours nécessaire de vérifier sur l'animal. Le développement des organoïdes est limité par le poids de la réglementation principalement pour les médicaments et ce ne semble pas être le cas pour REACH, et les réglementations sectorielles telles que biocides et produits phytosanitaires.

L'immaturation des cellules posent cependant des questions qui demeurent quant aux formes fœtales.

Nathalie VERGNOLLE déclare que ces modèles se rapprochent de la physiologie mais qu'elle n'est pas prête à se passer de l'animal car ces modèles ne peuvent répondre aux questions de physiologie intégrée. Ces approches permettent de construire des hypothèses et l'animal permet de la valider. Il n'en demeure pas moins, souligne Nathalie Vergnolle, que ce sont des outils d'avenir puisque par exemple certaines équipes ont greffées des organoïdes dans des systèmes animaux pour permettre l'expression de certaines caractéristiques humaines.

3. Qu'en est-il du développement de ces modèles ?

A terme les organes sur puce pourront mimer l'organisme humain entier. La progression de ces modèles est très rapide actuellement.

Jean-Paul BEAUFAYS rappelle que l'objectif de l'UE est la suppression de l'essai animal.

Les classifications sont souvent simplistes mais ce qui est important est la complémentarité. Par exemple en ce qui concerne le cancer de la peau pour lequel une vingtaine d'années peuvent séparer l'exposition et la survenue du cancer un algorithme utilisant le modèle animal et les organes sur puce représenterait plutôt l'avenir

Francelyne MARANO souligne qu'il est important de tenir compte de multiples voies d'exposition notamment dans le domaine environnemental et pour cela il est nécessaire d'avoir des données *in vivo* au moins au départ. Il est donc nécessaire d'avoir un *continuum* entre les différentes échelles.

Philippe HUBERT rappelle que dans le contexte des approches *continuum*, les intervenants ont démontré que dans certains cas des effets étaient visibles sur les organoïdes alors qu'ils ne l'étaient pas sur l'homme.

En recherche appliquée il est possible d'utiliser des modèles permettant de se soustraire de l'animal car l'objectif est la prédictivité. Dans la médecine personnalisée, les organoïdes peuvent être produits à partir des cellules du patient comme pour la mucoviscidose, le cancer colorectal par exemple. Dans ce cas, le modèle animal est totalement évité et l'arrivée des organoïdes permet de tester le traitement afin d'éviter l'utilisation de traitements inefficaces pendant plusieurs mois.

4. Quels sont les leviers et les freins à leur développement ?

Les freins cités par l'ensemble des participants sont les suivants :

- Le côté parfois très empirique du développement des méthodes rend les résultats peu reproductibles,
- Il est nécessaire de restaurer de la fonction et le microenvironnement. L'obtention d'une vascularisation est aujourd'hui nécessaire et constitue une limite de ces modèles (cerveau), l'innervation est également nécessaire.
- Pour les modèles 3D, certaines contraintes techniques comme l'hypoxie éloigne encore le modèle des conditions *in vivo*.

Tous s'accordent sur le fait qu'un des freins auxquels il est nécessaire de remédier en priorité est la réglementation qui complique et limite l'accès aux cellules humaines. L'interopérationalité des biobanques est nécessaire.

Le coût actuel de ces technologies 3D est également un verrou important au développement de ces techniques.

La standardisation est un élément important du développement de ces modèles et il est nécessaire d'encourager les essais circulaires ou interlaboratoires afin de valider les modèles et de veiller à la reproductibilité des résultats.

Philippe HUBERT ajoute que le cloisonnement entre clinicien et toxicologue constitue un frein. L'accès au clinicien n'est pas toujours facile mais certains sont très motivés et accessibles. Changer de paradigme et aller vers la transdisciplinarité est nécessaire. Dans le cas du développement des QSAR, il est nécessaire d'associer des chimistes, des cliniciens, des toxicologues etc. afin de l'enrichir.

Rémi MAXIMILIEN conclut la table ronde en soulignant les applications de ces modèles, à l'évaluation de l'efficacité de certains médicaments, de la compréhension des effets, de la médecine personnalisée et du screening haut débit. Des besoins ont été évoqués comme la nécessité d'une nomenclature ainsi que de travaux exploratoires afin de déterminer ce qui va remplacer les essais sur animaux. Dans le domaine de la toxicologie réglementaire, de nombreuses méthodes seront disponibles dans les 10 prochaines années. Ces méthodes doivent être remises dans un contexte et il est nécessaire de remettre le jugement d'expert au centre du système.

Synthèse de la journée et esquisse d'un « position paper » (Philippe HUBERT, Directeur de FRANCOIPA)

Philippe HUBERT esquisse les grandes lignes d'une synthèse et de prise de position dans laquelle sont évoqués le lien entre le développement des organoïdes et celui du savoir-faire et de leur capacité à répondre à des questions de recherche. Les organoïdes peuvent cependant répondre à des logiques de création différentes : cellules pluripotentes, embryonnaires, impression 3D.

Cette technique entraîne l'émergence de nombreuses start-up, de marque, de différentes sociétés démontrant une industrialisation croissante de ces technologies.

Sous l'angle de FRANCOIPA, force est de constater que le développement des organoïdes n'a pas comme objectif premier la suppression du test animal mais constitue un bénéfice et une technique complémentaire dans certains cas. De la toxicologie au médical (thérapie/pharmacie) la palette d'usage s'étend de la prédiction toxicologique à l'organe de remplacement.