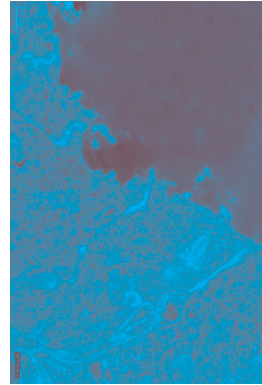


► Les organoïdes rénaux dérivés de cellules souches pluripotentes sont devenus une réelle alternative à l'utilisation de modèles *in vitro* limités ou de modèles animaux contraignants et d'utilisation sensible. La compréhension des mécanismes clés de développement du rein a permis d'établir des protocoles permettant, à partir de cellules souches pluripotentes, d'obtenir de tels organoïdes, qui sont constitués de structures hautement complexes et organisées, contenant plusieurs types cellulaires. Ces organes miniatures permettent des applications majeures : la possibilité de contrôler le génome des iPSC (*induced pluripotent stem cell*), par sélection de patients atteints de pathologies spécifiques ou par édition de génome, permet d'obtenir *in vitro* des organoïdes rénaux qui intègrent des mécanismes physiopathologiques, comme le développement de kystes observé dans la polykystose rénale. Ces organoïdes peuvent également être utilisés pour des applications « haut-débit » afin d'accélérer la mise au point de tests de molécules néphrotoxiques ou de composés thérapeutiques. Enfin, les organoïdes rénaux présentent un intérêt majeur dans un contexte de réparation tissulaire, une application qui reste limitée actuellement et pour laquelle de nombreuses barrières restent à franchir. ◀

En néphrologie, les modèles couramment utilisés en recherche fondamentale et translationnelle ont leurs limites : les modèles *in vitro* sont restreints à l'observation d'un seul type cellulaire, sans prise en compte des interactions intercellulaires et environnementales caractéristiques d'un tissu ; les modèles animaux, de l'organe isolé à l'animal entier, sont intégratifs, physio-

Organoïdes (1) Les organoïdes rénaux

Clara Steichen^{1,2}, Sébastien Giraud^{1,3},
Thierry Hauet¹⁻³



¹Inserm U1082 – IRTOMIT (Ischémie reperfusion en transplantation d'organes mécanismes et innovations thérapeutiques), Poitiers, F-86000, France.

²Université de Poitiers, Faculté de médecine et de pharmacie, Poitiers, F-86000, France.

³CHU de Poitiers, service de biochimie, Poitiers, F-86000, France. clara.steichen@univ-poitiers.fr

logiques et plus prédictifs, mais chaque être vivant d'un groupe d'essai peut réagir différemment à un traitement, induisant des biais non négligeables. Ils sont également liés à des coûts et des temps de manipulation élevés, d'autant plus que les lois éthiques limitent l'utilisation des êtres vivants à des fins scientifiques [1] (→).

S'orienter vers un modèle intermédiaire est donc une nécessité et les organoïdes rénaux dérivés de cellules souches pluripotentes représentent une alternative judicieuse à cette problématique.

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

Origine du rein et des cellules progénitrices rénales

Le rein est issu du feuillet intermédiaire de l'embryon, le mésoderme. Spécifiquement, c'est du mésoderme intermédiaire que dérivent les deux tissus précurseurs du rein, le bourgeon urétéral (BU, une structure épithéliale) et le mésenchyme métanéphrique (MM, un tissu mésenchymateux). Entre ces deux structures, existent des interactions inductives réciproques aboutissant à la formation du *metanephros*, la structure mature du rein chez les mammifères [2]. En effet, des signaux provenant des cellules du MM, dont le facteur de survie neuronale *glial-derived neurotrophic factor*, induisent la formation du BU à partir du canal de Wolff¹. Le BU envahit le MM, notamment en sécrétant WNT (*wingless-type MMTV integration site family*)9b, un membre de la famille des protéines WNT impliquées dans la modulation de la différenciation et de la maturation cellulaires, attirant les cellules du MM qui s'y condensent et forment la coiffe mésenchymateuse (CM). Cette dernière est la niche dans laquelle se situent les cellules progénitrices rénales (*nephron progenitor*

Vignette (Cellules épithéliales bordant une lumière au sein d'un organoïde rénal dérivé d'iPSC [microscopie électronique], photo © Clara Steichen).

¹Le canal de Wolff est présent chez l'embryon avant sa différenciation sexuelle. Il raccorde le rein primitif au sinus urogénital, une cavité de l'embryon qui formera la vessie et une partie des organes sexuels.

cells, ou NPC). Ces cellules expriment spécifiquement *Osr1* (*odd-skipped related transcription factor 1*), *Pax2* (*paired box protein pax-2*) et *Six1* (*sine oculis homeobox homolog 1*), nécessaires à leur auto-renouvellement, ainsi que la vimentine, un marqueur mésenchymateux. En réponse aux signaux du BU, ces cellules sécrètent WNT (*wingless-type MMTV integration site family*)⁴, un membre de la famille des protéines WNT impliquées dans la modulation de la différenciation et de la maturation cellulaires qui agit de façon autocrine et induit l'épithélialisation. Cette transition mésenchymo-épithéliale s'accompagne de l'expression de la E-cadhéline. Dans ce même temps, s'éteignent les gènes spécifiques des cellules indifférenciées. Ces cellules épithéliales s'agrègent en vésicules qui forment les néphrons, du glomérule jusqu'au tube distal. Ce sont les cellules dérivées du BU qui formeront le tube collecteur et l'uretère qui connecte le rein à la vessie.

Il est évident que l'accès aux cellules progénitrices résidant dans la CM serait d'une grande valeur en médecine régénératrice. Or les NPC persistent difficilement en dehors de leurs niches développementales. Quelques jours après la naissance chez la souris, et à 34 semaines de grossesse chez la femme, les NPC sont tous différenciées de façon terminale [3]. La formation de nouveaux néphrons dans le rein adulte n'existe donc pas, ce qui explique, au moins partiellement, pourquoi le rein, même s'il peut présenter une capacité de régénération post-lésions [4], n'est pas capable de réagir de manière adaptée aux nombreuses situations physiopathologiques qui peuvent l'affecter.

L'isolement et la culture de NPC de rongeurs [5] à partir de tissu rénal fœtal a été rapporté. Mais ces cellules ne peuvent subir que quelques passages en culture [5]. La mise au point de milieux de culture spécifiques, mimant leur niche *in situ*, a néanmoins permis de cultiver des NPC murines jusqu'à dix passages [6]. Mais c'est grâce à la prise en compte de l'environnement physique des cellules dans le rein fœtal, et notamment des interactions cellule-cellule par l'utilisation de techniques de culture en trois dimensions, que Li *et al.* ont montré qu'il était possible d'augmenter l'expansion à long terme des NPC murines et humaines, jusqu'à respectivement 110 et 50 passages [7].

Vers l'organoïde rénal

Les premiers organoïdes rénaux ont été obtenus en s'appuyant sur une propriété inhérente aux NPC : placées dans des conditions de culture où elles n'adhèrent pas, et en trois dimensions, ces cellules s'agrègent, s'organisent entre elles de façon spontanée, en formant un amas de néphrons et de tubes collecteurs [8]. Bien que les structures obtenues ne soient pas organisées comme dans un rein, on peut parler d'organoïde puisqu'une définition possible en est : « une structure en trois dimensions, *organ-like*, auto-assemblée *in vitro* à partir de progéniteurs spécifiques » [9]. Des travaux plus récents ont pu générer des structures présentant un niveau d'organisation supérieur, avec des néphrons dans un cortex distinct, connectés à des tubes collecteurs irradiant de la médullaire, et des anses de Henlé plongeant du cortex dans la médullaire [10, 11]. Dans de telles structures, les néphrons peuvent présenter une activité physiologique [12] même si l'absence d'uretère empêche, bien entendu, l'évaluation de l'ensemble des fonctions rénales. Afin de mimer des gra-

dients spatiaux existant dans le développement du rein *in situ*, la mise en contact d'un seul côté de l'organoïde avec des billes libérant du BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) permet la différenciation géo-spécifique des cellules qui en sont proches vers des cellules *ureter-like* du tube collecteur, ce qui permet de casser la symétrie de l'organoïde en élevant son réalisme anatomique [13].

Organoïdes rénaux dérivés de cellules souches pluripotentes

Longtemps restreinte aux modèles animaux, l'étude du développement embryonnaire a été rendu possible chez l'homme avec l'isolement puis la culture de cellules souches embryonnaires. Ces cellules pluripotentes ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires d'un organisme adulte [14]. Moins de 10 ans après les travaux pionniers, la possibilité d'induire des cellules somatiques à la pluripotence par reprogrammation cellulaire a étendu le champ des possibilités : la technologie des iPSC (*induced pluripotent stem cells*), en plus de ne pas nécessiter l'utilisation d'embryons, permet de choisir le fond génétique des cellules puisqu'elles peuvent être dérivées de cellules isolées d'un individu présentant une pathologie génétique particulière [15].

Injectées à des souris immunodéficientes, les cellules souches pluripotentes (CSP) forment des tératomes, des tumeurs composées de tissus issus des 3 feuillettes embryonnaires. Ces tératomes peuvent contenir des tubules rénaux et des glomérules, montrant la capacité des CSP à se différencier en tissus rénal *in vivo* [14]. Mais la différenciation *in vivo* dans ces conditions n'a rien de spécifique. *In vitro*, générer des cellules rénales à partir de CSP est possible, mais la complexité réside dans le fait de diriger leur différenciation en contrôlant les conditions de culture afin de les orienter vers un type cellulaire spécifique, et cela pour tendre vers un protocole efficace et reproductible.

Dans le cas du rein, la première étape du protocole consiste à différencier les CSP en cellules de la ligne primitive. Ceci est réalisé par l'activation des voies de signalisation WNT, activine/nodal et BMP4. Le rapport entre Activine et BMP4 permet en effet d'induire soit la ligne primitive antérieure, soit la ligne primitive postérieure. Une concentration forte de BMP4 et faible d'Activine permet ainsi de diriger les cellules préférentiellement vers la ligne primitive postérieure, qui inclut le mésoderme paraxial et intermédiaire, ce dernier étant celui d'intérêt dans le cas du rein [16]. Une alternative pour l'activation de la voie WNT consiste à inhiber la GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) en utilisant le CHIR99021 [16-19]. La structuration du mésoderme postérieur en

mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral, peut être contrôlée par des combinaisons de BMP4, d'activine/nodal, et de FGF9 (*fibroblast growth factor-9*) [16], ou encore de BMP7 associé au CHIR99021 [20], ou de FGF2 avec l'acide rétinoïque (RA) [21]. Différentes approches peuvent être utilisées pour spécifier le mésoderme intermédiaire en cellules GATA3⁺ (spécifiques du MI antérieur et des cellules du BU) incluant le FGF9 et le RA. Ainsi, différents types cellulaires rénaux ont pu être générés à partir de CSP humaines, tels que des progéniteurs rénaux [22], des cellules du MI capables de former des cellules des tubules proximaux [21], et des cellules *BU-like* capables de s'intégrer dans des embryons de reins de souris en contribuant à leur développement [23].

Ces protocoles développés pour mimer la complexité du rein ont cependant montré leurs limites. Les efforts déployés ont porté sur la génération d'organoïdes, en appliquant notamment les technologies qui fonctionnaient déjà à partir de NPC, c'est-à-dire des cultures en 3 dimensions. Les premiers organoïdes rénaux réalisés à partir de cellules souches pluripotentes ont été rapportés dès 2014. Taguchi *et al.* ont en effet décrit la différenciation de CSP en MM capables de s'organiser en structures rénales comprenant des glomérules avec podocytes et des tubules rénaux [24]. Par la suite, Morizane *et al.* ont obtenu des organoïdes contenant des tubules avec segmentation qui s'auto-organisaient en structures pseudo-glomérulaires avec la présence de tubules proximaux, d'anses de Henlé et de tubules distaux [18]. Enfin, Freedman *et al.* ont obtenu des organoïdes contenant des tubules rénaux, des podocytes et des cellules endothéliales [17].

Pour reproduire au plus près la structure d'un rein et l'ensemble de ses composants, il a été nécessaire de générer à la fois des cellules dérivées du MM et des cellules dérivées du BU. Ce sont ces dernières qui formeront, notamment, les cellules stromales et vasculaires. Ces conditions ont été réunies dans les expériences réalisées par le groupe de Little, qui a développé un protocole permettant d'induire les 2 types de populations cellulaires à partir de cellules souches embryonnaires humaines et ce, par une séquence utilisant le CHIR99021 et le FGF9 pour générer à la fois les cellules du MM et du BU *via* la ligne primitive, et le MI, en 7 jours de différenciation. À ce stade, les cellules sont détachées puis cultivées sur un filtre de type *Transwell* afin de placer la suspension cellulaire à une interface établie entre milieu de culture et air, favorable pour l'auto-organisation des cellules [16]. Les structures obtenues contiennent notamment des cellules de type tube collecteur, dérivées du BU, mais aussi des cellules *proximal-tubule-like* dérivés du MM, montrant qu'une interaction entre les types cellulaires, similaire à ce qu'il advient lors du développement du rein *in utero*, s'est effectivement réalisée (Figure 1). Depuis, le protocole a été affiné afin de produire des proportions équivalentes de cellules du BU et du MM, conduisant à des organoïdes remarquablement organisés. On observe ainsi dans ces organoïdes la présence de structures *nephron-like*, de glomérules, de tubules proximaux, d'anses de Henlé et de tubes collecteurs, ressemblant fortement à l'organisation du rein humain, en présence de cellules stromales et d'un réseau vasculaire constitué de capillaires. L'analyse transcriptomique de ces structures montre un profil d'expression génique similaire à celui de reins embryonnaires humains [19]. En terme de fonctionnalité, les organoïdes rénaux ont la capacité d'endocytose

sélective de *dextran cargoes*² et ils répondent à des agents néphrotoxiques [17-19].

Les organoïdes rénaux : nouvel outil de modélisation et de compréhension de maladies

Tout comme celle des iPSC en 2006, une autre découverte majeure a littéralement révolutionné le monde de la biologie cellulaire et moléculaire en 2012 : la mise en œuvre de techniques d'édition de génome, un système modulable permettant de cliver une séquence d'ADN à un endroit ciblé grâce à une endonucléase bactérienne « programmable » par un ARN spécifiquement choisi (ARN guide). Cette technologie de précision, nommée CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), a depuis montré son efficacité dans des cellules humaines [25] et a rapidement été appliquée aux iPSC, permettant notamment la modélisation de maladies génétiques en modifiant *in vitro* les gènes responsables sans qu'il soit nécessaire de recourir à l'utilisation d'iPSC dérivées de cellules de patients.

Le premier modèle génétique d'organoïdes rénaux généré par CRISPR a modélisé la polykystose rénale (PKR). Il s'agit de la plus fréquente des maladies génétiques rénales. Elle est caractérisée par le développement de kystes et de lésions fibrotiques qui détériorent la fonction rénale. Dans sa forme dominante, la PKR est induite par des mutations des gènes *PKD* (*polykystic kidney disease*) 1 et/ou 2, qui codent respectivement les fibrocystines 1 et 2. À partir d'iPSC humaines, des pertes de fonction ont pu être induites par la méthode CRISPR, soit sur le gène *PKD1*, soit sur le gène *PKD2*. Ces mutations n'ont pas affecté la capacité des iPSC à se différencier en organoïdes rénaux. Néanmoins, quelques jours après la fin de la différenciation des cellules, une proportion faible, mais détectable, d'organoïdes ont développé des kystes, un phénomène qui n'a pas été observé avec des lignées isogéniques indemnes de mutation. Cette étude a ainsi montré que la formation de kystes était un phénomène inhérent aux cellules mutées et qu'elle peut être reproduite *in vitro* [17].

Par vidéo-microscopie, il a été observé, en parallèle, que les kystes se formaient à partir de structures tubulaires entières qui se détachent partiellement du support de culture. En utilisant des plaques de culture à faible adhérence, un taux de formation de kystes très élevé a ainsi pu être observé avec les organoïdes mutés dans les gènes *PKD*, significativement supérieur à ceux obtenus dans les conditions de culture précédentes, ce taux restant faible pour les lignées

²Structures chargées de dextran fluorescent permettant de suivre l'endocytose.

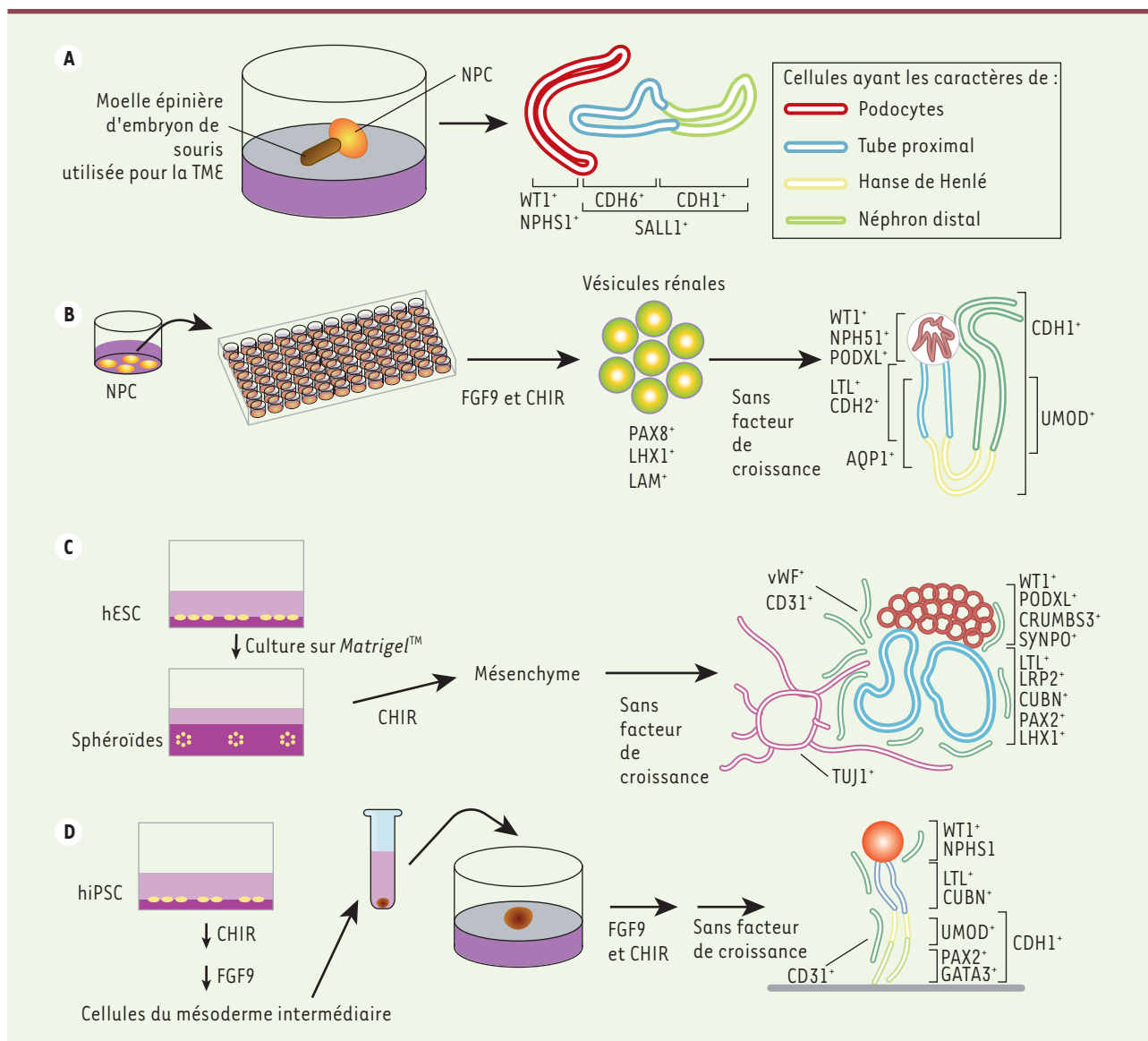


Figure 1. Les différentes méthodes de génération d'organoïdes de rein. En A, B, C et D sont montrées les différentes techniques permettant de générer des organoïdes de reins à partir de cellules IPS humaines. NPC : *nephron progenitor cells* ; WT1 : *Wilms tumor 1* ; NPHS1 : *nephrosis 1* ; CDH : *cadherin* ; SALL1 : *spalt-like transcription factor 1* ; PAX8 : *paired box 8* ; LHX1 : *LIM homeobox 1* ; LAM : *laminine* ; PODXL : *podocalyxin-like* ; LTL : *lotus tetragonolobus lectin* ; AQP1 : *aquaporin 1* ; UMOD : *uromodulin* ; vWF : *facteur de von Willebrand* ; TUJ1 : *neuron-specific class 3 beta-tubulin* ; SYNPO : *synaptopodin* ; LRP2 : *LDL receptor-related protein 2* ; CUBN : *cubiline* ; PAX2 : *paired box 2* ; GATA3 : *GATA binding protein 3*. FGF : *fibroblast growth factor* ; CHIR : CHIR99021 ; TME : *transition mésenchymo-épitthéliale* (figure inspirée de la figure 3 de [46]).

iPSC non mutées. Cette observation souligne la tendance forte des cellules épithéliales à former des kystes dans des conditions de non adhérence en trois dimensions, même en l'absence de mutation. Elle montre également que la mutation des gènes *PKD* a un rôle important dans la promotion de la kystogenèse dans les organoïdes rénaux. Les kystes ainsi générés présentent des marqueurs proximaux, distaux et de prolifération ; des caractéristiques retrouvées dans les kystes isolés de biopsies de patients atteints de polykystose rénale. Ce travail souligne le rôle critique de l'environnement des cellules et des forces d'adhérence dans la kystogenèse [26]. Cultiver

des cellules rénales à partir de biopsie de patients atteint de polykystose rénale autosomique dominante est possible [27], mais il existe une hétérogénéité selon les sources cellulaires et le fond épigénétique des patients. Le modèle des organoïdes rénaux dérivés d'iPSC offre donc un avantage non négligeable : celui de pouvoir comparer les cellules générées à des lignées iPSC contrôles isogéniques sans avoir à considérer d'éventuelles variations de profils épigénétiques ou d'efficacité de différenciation entre les patients.

Très récemment, Little *et al.* ont utilisé les organoïdes rénaux comme plate-forme de validation fonctionnelle de nouveaux variants génétiques potentiellement impliqués dans l'apparition de maladies rénales. Par séquençage haut-débit, ces auteurs ont mis en évidence chez un individu atteint de néphronoptose³ une mutation probablement causale sur le gène *IFT140* (*intraflagellar transport 140*). Ce gène code une sous-unité du complexe A de transport intraflagellaire. Les organoïdes porteurs de ce variant présentent des tubules raccourcis et des cils morphologiquement anormaux. Des iPSC ont été générées par CRISPR pour corriger cette mutation, ce qui a permis d'annuler le phénotype anormal. Des analyses transcriptomiques des cellules épithéliales isolées à partir des organoïdes ainsi générés montrent une sous-régulation de gènes associés à la polarité apico-basale et aux jonctions cellulaires. Ce défaut de polarisation a été confirmé dans des tests de formation de kystes en culture sur *Matrigel*TM [28].

Au-delà de la modélisation de maladies, les organoïdes rénaux peuvent aussi être utilisés pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La podocalyxine (PODXL1) est fortement exprimée dans les podocytes. Le gène qui la code est un gène candidat dans le traitement de la glomérulosclérose segmentaire et focale (FSGS), une maladie complexe, rare, hétérogène et peu comprise, qui se caractérise par des lésions histologiques variées aboutissant à un défaut de la fonction de la barrière de filtration glomérulaire. En culture, les podocytes primaires des patients souffrant de FSGS ne prolifèrent pas et ils se différencient rapidement. Cette différenciation est associée à une perte des pieds des podocytes et à une extinction de l'expression de la néphrine (NPHS1), une protéine importante de la barrière de filtration glomérulaire. Il est possible de différencier spécifiquement des iPSC humaines en populations homogènes de podocytes qui, une fois transplantées chez la souris, mûrissent au niveau du glomérule et sont vascularisées [29]. Les organoïdes rénaux peuvent également contenir des podocytes, mais leur état de maturation n'était pas connu jusqu'à une étude récente qui a montré qu'ils étaient semblables aux podocytes présents dans les reins *in situ* en termes d'expression génique et d'ultrastructure, avec la formation progressive de membranes basales riches en jonctions et de membranes apicales riches en *microvilli*. En utilisant des iPSC délétées du gène *PODXL1* codant la podocalyxine, Kim *et al.* ont généré des organoïdes dont les podocytes présentaient un défaut dans l'assemblage des *microvilli* avec des espaces entre les cellules conduisant à des jonctions intercellulaires poreuses. Ces défauts avaient déjà été retrouvés dans les modèles murins de cette maladie, montrant que la podocalyxine est conservée dans les processus de maturation des podocytes et qu'elle est notamment impliquée dans la pathologie et le développement de la FSGS [30]. La technologie CRISPR a également été utilisée pour développer un système dans lequel la différenciation rénale, la maturation des glomérules et le phénotype des podocytes peuvent être évalués dans des organoïdes par microscopie de fluorescence grâce à l'intégration de gènes rapporteurs et à l'extinction de l'expression du gène codant la NPHS1 [31].

Les organoïdes rénaux représentent également un modèle intéressant pour comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de lésions rénales liées à des stress intenses. Nous avons en effet observé que de nombreuses voies de signalisation et de gènes activés lors du développement embryonnaire du rein, et donc dans la génération d'organoïdes rénaux, sont réactivés dans un rein mature ayant subi une lésion ischémique majeure [32]. Une séquence d'ischémie froide, dans un rein mature de porc, induit ainsi l'activation du gène codant la LEO1 (*RNA polymerase II-complex component*), un composant du PAF1C (*polymerase-associated factor 1 complex*) qui est requis pour la transcription des gènes *WNT*, *HOX* et *NOTCH*, et est impliqué dans le développement et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires [33]. Dans ce modèle porcin, les lésions d'ischémie induisent la sous-expression du gène *RHOA* (*ras-homolog family member U*) qui est régulé par un gène induit par *WNT*. *RHOA*, en lien avec *Wrch* (*Wnt-1 responsive CDC42 homolog*), est impliqué précocement dans le développement des organismes multicellulaires. Les reins porcins ayant subi une lésion ischémique présentent également une sous-expression de *CDC42 homolog* (*cell division control protein-42 homolog*) qui joue un rôle essentiel dans la survie, la croissance et le développement [32].

Applications « haut-débit » des organoïdes rénaux

Les reins sont une cible importante de la toxicité de médicaments ou d'autres métabolites produits par le foie. Les tubules proximaux possèdent une grande variété de transporteurs impliqués dans des interactions médicamenteuses. Les membres de la famille SLC (*solute carrier family*) ou les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), comme MRP2/4 (*multi-drug resistance protein 2 and 4*) et BRCP (*breast cancer resistance protein*), jouent un rôle important dans ce phénomène de toxicité. Le nombre de médicaments dont l'effet échoue à cause d'une mauvaise prédiction de leur rôle néphrotoxique est estimé à 7 % [34], ce qui révèle les limites des modèles existants utilisés pour évaluer leurs effets néfastes. De même, 30 à 50 % des insuffisances rénales sévères ont pour origine une néphrotoxicité induite par un médicament [35]. Il est donc primordial d'accélérer le développement de modèles alternatifs de prédiction permettant d'évaluer la toxicologie médicamenteuse rénale.

Dans des milieux de culture très spécifiques, les cellules tubulaires rénales primaires maintiennent temporairement une architecture, une fonction et une polarité

³Une néphropathie tubulo-interstitielle chronique évoluant vers l'insuffisance rénale terminale.

cellulaire [36]. Leur prolifération reste extrêmement limitée lorsqu'elles sont cultivées en deux dimensions : après quelques doublings de population, les cellules s'étirent horizontalement et changent rapidement de phénotype (dédifférenciation), ce qui les éloigne de la réalité physiologique. Des lignées obtenues par immortalisation de cellules tubulaires sont souvent utilisées, comme les cellules HK-2 et RPTEC/hTERT, notamment dans des études de néphrotoxicité [37]. Il existe également de nombreuses lignées issues de tumeurs primaires ou métastatiques (comme les lignées A-498 et Caki-1). Ces cellules sont un outil majeur pour la compréhension des mécanismes cancéreux ou pour l'identification de molécules anticancéreuses. Cependant, en dehors de ces applications, leur pouvoir prédictif en toxicologie rénale générale reste limité de par leur origine, éloignée de la réalité physiologique. Ces types cellulaires ont déjà été couplés à des outils haut-débit pour réaliser des criblages toxicologiques/pharmacologiques [38].

Très récemment, ces techniques de haut-débit ont été appliquées aux organoïdes rénaux issus de CSP. Czerniecki *et al.* ont en effet développé une plateforme automatisée de *high-throughput-screening* (HTS) pour améliorer la différenciation et le phénotypage d'organoïdes rénaux humains. Ils ont réalisé l'ensemble du protocole de différenciation des cellules (en 21 jours) de façon automatisée sur des robots de culture cellulaire. Les analyses réalisées dans ces conditions ont révélé une dose-dépendance et un effet seuil des composés utilisés lors de la différenciation. Des compartiments différenciés qui n'avaient pas été identifiés auparavant, avec la présence de cellules interstitielles et pariétales, ont également été mis en évidence. Un criblage chimique, pour évaluer la néphrotoxicité sur ces organoïdes rénaux, a été réalisé. Il a notamment permis de révéler un rôle inattendu de la myosine dans la polykystose rénale, en utilisant des organoïdes rénaux différenciés à partir d'iPSC modifiés par édition de génome [39]. Une des barrières à l'utilisation de ces modèles reste la génération d'organoïdes rénaux en nombre suffisant pour ces applications. En ce sens, Przepiorski *et al.* ont développé un protocole efficace permettant de générer des organoïdes rénaux en masse à coût limité, grâce à un bioréacteur [40].

Une « puce glomérulaire » contenant seulement des podocytes matures dérivés d'iPSC a été développée. Elle combine des techniques de microfluidique de type *organ-on-chip* à un protocole efficace de différenciation de 35 jours. Cette puce *in vitro* imite structurellement et fonctionnellement la membrane glomérulaire [41].

Transplantation

Les niveaux de différenciation cellulaire et d'architecture tissulaire observés au sein des organoïdes rénaux sont remarquables. Utiliser de telles structures pour les transplanter et ainsi suppléer la fonction d'un rein défaillant apparaît ainsi être une option plus qu'intéressante. Malgré des similarités non discutables entre ces structures organoïdes et un rein, les niveaux de fonctionnalité de ces deux entités ne sont pas similaires. La fonction des reins repose sur la filtration du sang et l'élimination de ses déchets dans l'urine, il est donc impératif que les organoïdes rénaux soient connectés au système vasculaire et à la vessie

du receveur. Pour ce qui est de la vascularisation, Dekel *et al.* ont rapporté, en 2003, la transplantation d'un rein fœtal humain chez des souris immunodéficientes. Ce rein, qui présentait des glomérules et tubules matures, a été vascularisé après transplantation par recrutement de cellules endothéliales. Ce phénomène a également été observé en transplantant des reins fœtaux précoces, mais pas lorsque des reins fœtaux plus matures ont été utilisés. La production d'urine, qui s'est accumulée dans le pelvis faute de connexion du rein à la vessie murine, a aussi été observée [42].

L'analyse transcriptomique des organoïdes rénaux générés par l'équipe de Little a montré que ces derniers présentaient un profil d'expression similaire à un rein fœtal [19]. C'est également le cas pour des transplantations d'organoïdes rénaux dérivés de CSP humaines. Ces organoïdes ont été obtenus dans des conditions définies et en l'absence de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) exogène. Quelques jours, voire quelques semaines, après transplantation sous la capsule rénale de souris immunodéficientes, la formation d'un réseau vascularisé dérivant du receveur, envahissant les structures glomérulaires de l'organoïde, la maturation progressive de la barrière de filtration glomérulaire, avec la déposition d'une membrane basale glomérulaire, le développement d'un endothélium glomérulaire fenêtré, avec une migration apico-basale des jonction serrées des podocytes, et une maturation de l'épithélium tubulaire, avec l'apparition d'une bordure en brosse, ont été observés [43]. Cette maturation progressive ne se produit pas dans des organoïdes rénaux générés, même s'ils sont maintenus en culture *in vitro*, montrant que la transplantation et la mise en contact de l'organoïde avec un environnement physique, chimique et biologique adéquat restent nécessaires et permettent la progressive maturation/morphogénèse des organoïdes rénaux humains.

Reste à considérer la faisabilité d'établir des connexions entre organoïde et système urinaire. L'utilisation d'iPSC en clinique reste également limitée par l'existence de barrières non négligeables. Il sera en effet nécessaire de s'assurer de l'absence de cellules souches pluripotentes résiduelles et de l'incapacité de ces organoïdes à se dédifférencier en cellules potentiellement tumorigènes. Les iPSC, par définition, et de par leur mode d'obtention et de culture, sont des cellules prônes à l'accumulation sélective ou non de mutations génétiques : mutations ponctuelles, délétions, duplications, anomalies chromosomiques. Les protocoles de reprogrammation tendent vers des stratégies de plus en plus protégées, notamment par l'utilisation de stratégies non intégratives qui semblent avoir un impact moindre sur l'intégrité génomique des cellules obtenues [44, 45]. Des contrôles

qualités drastiques seront néanmoins nécessaires afin de disposer de cellules iPSC prêtes à être différenciées et transplantées chez l'homme [46]. La variabilité de l'efficacité des protocoles de différenciation entre patients et clones d'iPSC sera aussi à considérer, notamment lorsqu'un processus de production « à grande échelle » sera envisagé.

Conclusion

Reproduire un rein *in vitro* devient une éventualité réaliste : ces versions miniatures d'organes, cultivées en laboratoire, peuvent être utilisées pour comprendre des mécanismes biologiques, pour accompagner le développement de médicaments, la recherche de nouvelles thérapies ou encore dans le cadre de la médecine personnalisée. Cette innovation révolutionne la recherche en proposant une alternative rapide (différenciation d'iPSC en moins d'un mois, représentant un gain de temps par rapport à l'embryogenèse puis à la maturation des organes chez les animaux) et moins coûteuse, compatible avec des applications haut-débit. Le développement de cette technologie prend également tout son sens là où il convient de réduire à son minimum l'utilisation des modèles animaux à des fins expérimentales. Reste encore à prendre en compte les interactions inter-organes. Dans ce domaine, les progrès sont fulgurants et des technologies fondées sur la microfluidique de type *body-on-chip* (« organe sur puce ») sont émergentes, laissant entrevoir la possibilité de connecter, grâce à des fluides physiologiques, les organoïdes rénaux à d'autres structures organoïdes (foie, vessie) et de reproduire, *in vitro*, la complexité du vivant à l'échelle cellulaire, inter-cellulaire, inter-tissulaire et inter-organes. ♦

SUMMARY

Kidney organoids

This review focus on kidney organoids derived from pluripotent stem cells, which become a real alternative to the use of *in vitro* cellular models or *in vivo* animals models. The comprehension of the key steps involved during kidney embryonic development led to the establishment of protocols enabling the differentiation of pluripotent stem cells into kidney organoids that are highly complex and organized structures, composed of various renal cell types. These mini-organs are endowed with major applications: the possibility to control iPSC genome (by selecting patients with specific disease or by genome editing) allows the generation of kidney organoids which recapitulate important physiopathological mechanisms such as cyste formation in renal polycystic disease. Kidney organoids can also be used in high-throughput screening to fasten the screening of nephrotoxic/therapeutic compounds. Finally, kidney organoids have a huge interest in the context of tissue repair, which remains for now a challenging goal linked with technological barriers that need still to be overcome. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Hardin-Pouzet H, Morosan S. Organismes-modèles et réglementation de la recherche animale. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 53-6.
2. Combes AN, Davies JA, Little MH. Cell-cell interactions driving kidney morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2015 ; 112 : 467-508.
3. Pleniceanu O, Harari-Steinberg O, Dekel B. Concise review: Kidney stem/progenitor cells: differentiate, sort out, or reprogram? *Stem Cells Dayt Ohio* 2010 ; 28 : 1649-60.
4. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2008 ; 2 : 284-91.
5. Brown AC, Blank U, Adams DC, et al. Isolation and culture of cells from the nephrogenic zone of the embryonic mouse kidney. *J Vis Exp* 2011 ; 22 : pii: 2555.
6. Brown AC, Muthukrishnan SD, Oxburgh L. A synthetic niche for nephron progenitor cells. *Dev Cell* 2015 ; 34 : 229-41.
7. Li Z, Araoka T, Wu J, et al. 3D Culture supports long-term expansion of mouse and human nephrogenic progenitors. *Cell Stem Cell* 2016 ; 19 : 516-29.
8. Unbekandt M, Davies JA. Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int* 2010 ; 77 : 407-16.
9. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014 ; 345 : 1247125.
10. Ganeva V, Unbekandt M, Davies JA. An improved kidney dissociation and reaggregation culture system results in nephrons arranged organotypically around a single collecting duct system. *Organogenesis* 2011 ; 7 : 83-7.
11. Chang C-H, Davies JA. An improved method of renal tissue engineering, by combining renal dissociation and reaggregation with a low-volume culture technique, results in development of engineered kidneys complete with loops of Henle. *Nephron Exp Nephrol* 2012 ; 121 : e79-85.
12. Lawrence ML, Chang CH, Davies JA. Transport of organic anions and cations in murine embryonic kidney development and in serially-reaggregated engineered kidneys. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 9092.
13. Mills CG, Lawrence ML, Munro DAD, et al. Asymmetric BMP4 signalling improves the realism of kidney organoids. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 14824.
14. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7.
15. 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.
16. Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 118-26.
17. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8715.
18. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 2015 ; 33 : 1193-200.
19. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015 ; 526 : 564-8.
20. Mae S-I, Shono A, Shiota F, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1367.
21. Lam AQ, Freedman BS, Morizane R, et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25 : 1211-25.
22. Toyohara T, Mae S-I, Sueta S-I, et al. Cell therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice. *Stem Cells Transl Med* 2015 ; 4 : 980-92.
23. Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15 : 1507-15.
24. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 ; 14 : 53-67.
25. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339 : 823-6.
26. Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, et al. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat Mater* 2017 ; 16 : 1112-9.

