

# Le rein autoconstruit

## Engineered autologous kidney

J-M Dubernard

*Service d'urologie et chirurgie de la transplantation, Hôpital Edouard Herriot, Lyon*

### Mots clés

- ◆ Décellularisation
- ◆ Matrice extracellulaire
- ◆ Recellularisation
- ◆ Source de cellules.

### Résumé

Le rein est un des organes les plus difficiles à reconstruire à cause de la complexité de sa structure et de l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des cellules qui le constituent. Comme pour les autres organes les recherches se sont focalisées sur, d'une part, les matrices servant de support à la recellularisation : synthétiques, biodégradables ou biologiques. Les matrices extracellulaires sont les plus prometteuses. Des reins de souris, rats, porcs ou encore de primates ont pu être décellularisés permettant d'obtenir une structure extracellulaire vascularisée servant de support à la recellularisation. D'autres part, les recherches se sont focalisées sur la source de cellules à utiliser pour reconstituer le parenchyme : cellules souches embryonnaires, cellules souche progénitrices, cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou du parenchyme rénal lui-même. Le néphron se développe à partir des effets d'induction réciproques du bourgeon urétéral et du blastème métanéphrogène qu'il est possible de reproduire in vitro.

Ces travaux laissent espérer la possibilité de « fabriquer » un rein à partir de cellules autologues en vue de la transplantation tout en répondant à la pénurie d'organes et à la toxicité des agents immunosuppresseurs. En attendant, d'autres recherches sur le rein « bio-artificiel » associent, au système conventionnel de filtration du rein artificiel, un bioréacteur contenant des cellules rénales épithéliales dérivées de tubules rénaux humains. Elles conservent leur fonction de réabsorption, métabolique et endocrinologique. Elles font l'objet d'essais cliniques.

### Keywords

- ◆ Decellularisation
- ◆ Extracellular matrix
- ◆ Recellularisation
- ◆ Source of cells

### Abstract

Whole-organ engineering of the kidney is particularly difficult because of its structural complexity and the morphological and functional heterogeneity of renal cell types. As for other organs, research is focused on matrix to support recellularization : synthetic, biodegradable or biological. Extracellular matrix as a biological scaffold is the most promising. Rodent, porcine and rhesus monkey kidneys have been decellularized to obtain scaffolds with preserved extracellular matrix and vasculature. Research is also focused on source of cells for recellularization : embryonic stem cells, fetal cells, adult-derived stem cells, progenitor cells, adult-derived inducible, pluripotent stem cells were used. Nephron development is the result of mutual inductive interactions between the urethral bud and the metanephric mesenchyme. This biological development can be reproduced in vitro.

Based on these principles, the concept of ex-vivo "fabrication" of the kidney that could be implanted with no risk of rejection as a therapy for chronic renal failure appears ultimately feasible.

At present, another research concerns the use of a renal assisted device - the bioartificial kidney - using a bioreactor unit containing renal epithelial cells derived from the tubules that maintain their reabsorption, metabolic and endocrinologic functions. Phase II clinical trials were completed with encouraging results.

Développer in vitro ou construire ex vivo un organe à partir de cellules provenant du même individu fait partie de l'imaginaire de tous les transplantologistes. Une réponse serait apportée au nombre insuffisant de donneurs et aux complications de l'immunosuppression. La médecine régénérative offre déjà des résultats prometteurs dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (peau, cornée, artères, valves cardiaques, vagin, urètre, vessie...) (1-3). Représente-t-elle l'avenir de la transplantation d'organes ? (4, 5) Peut-être, car médecine régénérative et transplantation poursuivent le même objectif : rem-

placer un organe défaillant par son identique neuf et fonctionnel. Les progrès significatifs de la recherche rendent cette perspective de moins en moins utopique pour des organes comme le cœur, le foie, le poumon et, peut être, le pancréas ou le rein. Le rein est l'un des organes les plus difficiles à reconstruire de par la complexité de sa structure et l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des cellules qui le constituent. Ceci explique le petit nombre de publications concernant la reconstruction rénale dans le cadre de travaux encore à leurs débuts avec deux pistes principales :

### Correspondance :

*Professeur Jean-Michel Dubernard*

*Service d'Urologie, Hôpital Edouard Herriot, 5, place d'Arsonval, 69437 Lyon*

*E-mail : jean-michel.dubernard@chu-lyon.fr*

- reproduire, in vitro, étape par étape, le développement embryologique du parenchyme rénal ;
- construire un rein, ex vivo, à partir d'une matrice extracellulaire en la recellularisant avec des cellules provenant du futur receveur. Cette piste semble prometteuse après les travaux de Doris Taylor qui a publié pour la première fois en 2008 « la reconstruction » d'un organe fonctionnel, le cœur, chez le rat (6), puis chez le porc.

## Reconstruction rénale : deux pistes

### Développement in vitro du parenchyme rénal

Cette méthode laisserait espérer la fabrication suivie de l'implantation d'un tissu rénal fonctionnel résultant de la recombinaison de cultures cellulaires issues du canal de Wolff, du bourgeon urétéral et du blastème métanéphrogène. Le développement embryologique du rein est déterminé par les interactions entre le bourgeon urétéral, structure épithéliale d'origine ectodermique et le blastème métanéphrogène, structure mésenchymateuse d'origine mésodermique. Le bourgeon urétéral issu du canal de Wolff pénètre le blastème métanéphrogène sous l'influence de facteurs de croissance provenant de ce dernier au cours de la métanéphrogenèse. Le blastème métanéphrogène induit la bifurcation du bourgeon urétéral qui induit à son tour l'agrégation des cellules du blastème en vésicules qui vont s'épithélialiser pour former les tubules rénaux et finalement l'ensemble du néphron depuis la capsule de Bowman jusqu'au tubule proximal contourné (loop de Henlé) et au tubule contourné distal incluant la portion reliée au réseau de collection de l'urine. La vascularisation qui relève de l'angiogenèse classique est encore un problème à résoudre. Des chercheurs se sont attachés à reproduire ces différentes étapes en utilisant des bourgeons urétéraux prélevés chez des embryons de rats ou des cellules progénitrices cultivées dans un gel tridimensionnel en présence de facteurs de croissance (7). Il en résulte une structure rénale primordiale, capable de survivre et de sécréter un filtrat urinaire. Ce tissu, implanté sous la capsule rénale de souris « nude », a pu être observé pour des périodes allant jusqu'à cinq semaines. Les examens histologiques ont mis en évidence la présence de structures ayant des apparences de glomérules partiellement vascularisés. Reste à démontrer leur capacité à produire de l'urine concentrée et à remplir les autres fonctions du rein (8). L'implantation de nouveaux néphrons pourrait ouvrir la voie de la réparation d'un rein malade. Mais l'incorporation de ces néphrons au sein d'un tissu fibreux et leur connection à la voie excrétrice, est très incertaine. Une autre question essentielle est celle des cellules à utiliser et de leur immunogénicité si elles sont allogéniques.

### Construction d'un rein ex vivo à partir d'une matrice extracellulaire

Le principe est de décellulariser un organe pour obtenir une matrice extracellulaire conservant ses caractéristiques en termes de contenu en protéines et facteurs de croissance, puis de la recellulariser en introduisant des cellules souches embryonnaires ou fœtales, voire des cellules souches adultes. L'avantage de cette méthode est de maintenir un système de vascularisation de l'organe qui permettra d'effectuer les sutures vasculaires nécessaires à sa réimplantation chez un receveur. Alors que de nombreuses publications traitent d'organes comme le cœur, le foie ou le poumon, la littérature concernant le rein est relativement pauvre même si des expériences ont été conduites chez le rat, le porc ou le macaque rhésus. La première démonstration de la faisabilité de la technique a été apportée par Ross (9) chez le rat. Son équipe a ensemencé

des matrices extracellulaires avec des cellules souches embryonnaires injectées par l'artère rénale ou l'uretère. Une perfusion pulsatile du milieu de culture, sans ajout de facteur de croissance, maintenait 270 à 300 battements par minute et une pression d'environ 120/180 mmHg. La température du milieu de culture était de 37 degrés C° et son pH ajusté à 7,4. Les cellules ensemencées se différencient en structures glomérulaires, tubulaires et vasculaires. Elles perdent progressivement leur phénotype embryonnaire comme le montre l'apparition de marqueurs immunohistochimiques (Pax-2 et Ksp-Cadherin) normalement exprimés par le bourgeon urétéral, le blastème métanéphrogène et le tubule distal lors des dernières étapes de leur développement. La formation de la lumière des tubules s'explique par l'apoptose des cellules qui ne sont pas en contact avec la membrane basale.

L'équipe du Wake Forest Institute (10) a travaillé sur des foies et des reins de rat et de porc. Leurs travaux se sont concentrés sur les techniques de décellularisation permettant d'aboutir à des matrices extracellulaires conservant l'architecture de leur réseau artériel, capillaire et veineux.

Nakayama a décellularisé des tranches de reins prélevés sur des macaques depuis le fœtus jusqu'à l'adulte en passant par les âges intermédiaires avec pour objectif l'optimisation des techniques de décellularisation et de recellularisation in vitro. Ils ont mis en évidence l'apparition de marqueurs type Pax-2 et Vimentin après implantation des cellules provenant de reins de fœtus (11).

## Prospectives

Encore à leur début, ces recherches sur la construction du rein soulèvent de nombreuses questions concernant la préparation de la matrice extracellulaire et les sources de cellules destinées à sa recellularisation (12).

### Préparation de la matrice extracellulaire

Les matrices biologiques ont fait la preuve de leur supériorité sur les matrices synthétiques parfois utilisées en ingénierie tissulaire. Pour le rein, les matrices les plus employées sont allogéniques même si des matrices xénogéniques pourraient l'être aussi avec les problèmes spécifiques qu'elles poseraient.

Les matrices extracellulaires offrent un espace tridimensionnel à la recellularisation. Elles sont constituées, sur le plan structural et fonctionnel, d'un mélange de molécules conservant les spécificités chimiques, métaboliques et mécaniques de l'organe dont elles dérivent. Elles fournissent ainsi des conditions favorables à la différenciation et à la prolifération des cellules ensemencées. Elles représentent un substrat d'adhésion cellulaire sans lequel la majorité des cellules ensemencées disparaîtraient tout en permettant l'apport complémentaire d'éléments bio-actifs comme les peptides d'adhésion cellulaires et les facteurs de croissance.

Précédée d'une perfusion d'eau déionisée, la décellularisation est habituellement obtenue par perfusion intra-artérielle et/ou intra-urétérale d'une solution contenant 1 % de Triton X-100 et 0,1 % d'hydroxyde d'ammonium ou du Sodium Dodecyl Sulphate. Elle entraîne la disparition de tous les éléments cellulaires du parenchyme rénal laissant en place la plupart des éléments de la matrice extracellulaire et ceux du système vasculaire comme le confirme les biopsies et les angiographies. D'autres méthodes de décellularisation peuvent être utilisées avec d'autres agents chimiques ou enzymatiques ainsi que des agents physiques (congélation, agitation mécanique, ultrasons...).

## Source de cellules pour la recellularisation

Plusieurs types de cellules souches ou de cellules progénitrices ont été utilisées, qu'il s'agisse de cellules souches embryonnaires, fœtales, adultes ou progénitrices et plus récemment de cellules souches pluripotentes (12).

- Les cellules souches embryonnaires représentent une source idéale de par leur capacité à proliférer alors qu'elles sont encore indifférenciées et à se différencier en plusieurs types cellulaires : ectodermiques, mésodermiques et endodermiques. Sans aborder les questions éthiques, leur utilisation apparaît cependant limitée par leur caractère allogénique susceptible d'entraîner une réponse immunitaire et leur rejet ainsi que par le risque de formation de tératomes in vivo. Ces obstacles pourraient être levés par les techniques de transfert nucléaire à partir de cellules somatiques du receveur. Celles-ci doivent cependant progresser encore avant de devenir applicables.
- Les cellules fœtales conservent leur capacité de prolifération et se différencient facilement sans faire courir de risque d'induction de tératomes in vivo. De nombreuses publications traitent de leur application en ingénierie tissulaire chez l'animal mais leur utilisation reste très controversée. Le liquide amniotique représente une alternative. Il contient de nombreuses cellules souches ou progénitrices ainsi que des cellules cutanées reprogrammables en cellules souches pluripotentes (13). Elles ont fait l'objet de nombreuses études. Actuellement, plusieurs essais cliniques sont en cours dans les domaines de l'ingénierie tissulaire des voies aériennes supérieures, de la réparation osseuse et en urologie (1).
- Les cellules souches pluripotentes induites résultent de la « reprogrammation » génétique de cellules adultes. La faisabilité en a été démontrée chez le rat comme chez l'homme. Évitant de faire appel à des embryons, elles pourraient fournir une source idéale de cellules de par leur caractère autologue et leur faculté à proliférer en grand nombre. Elles sont utilisées dans la construction d'artères, d'épithélium des voies aériennes ou de tissus complexes comme le parenchyme hépatique.
- Les cellules souches adultes ou progénitrices sont présentes dans la plupart des tissus ainsi que dans la moelle osseuse et le sang (y compris celui du cordon ombilical). Leur potentiel de prolifération et de différenciation est plus limité, rendant leur utilisation pour la construction de tissus complexes plus difficile.
- Les cellules souches ou progénitrices présentes dans la plupart des organes sont une autre source de cellules pouvant être utilisées pour l'organogénèse in vitro qu'il s'agisse du cœur, du poumon, du foie, du pancréas ou du rein. Considérées comme des outils ou du matériel de réparation des organes correspondants, elles restent cependant très difficiles à maintenir en culture et à faire proliférer.

## Recellularisation

Le type et le nombre de cellules à ensemercer varient avec l'organe à reconstruire. À l'évidence les cellules spécifiques du parenchyme à reconstruire sont indispensables. D'autres types de cellules, comme des cellules endothéliales et des fibroblastes, sont nécessaires car elles favorisent le phénotype fonctionnel des cellules parenchymateuses et contribuent à l'organisation structurelle du tissu. La matrice du système vasculaire de l'organe à reconstruire doit être ré-endothélialisée pour orienter le flux sanguin et éviter la thrombose. En co-culture les fibroblastes améliorent la fonction des cellules parenchymateuses in vitro et in vivo.

Le nombre de cellules à utiliser dépend de l'organe à reconstruire mais la prolifération in vitro et ex vivo peut prendre des semaines avant qu'elles ne se développent complètement dans la matrice. Les méthodes d'ensemencement pour la re-

cellularisation s'inspirent de celles utilisées en thérapie cellulaire. La solution la plus pratique semble être l'injection intra-artérielle ou intraportale pour le foie ou la perfusion, continue ou pulsatile. Cette stratégie d'ensemencement mérite d'être précisée pour d'autres organes avant d'être appliquée au rein.

L'utilisation d'un système de perfusion extracorporel pulsatile ou continu - un bioréacteur - est indispensable pour apporter aux cellules de l'oxygène et maintenir le perfusé à une température constante et satisfaisante (32°C semble être l'idéal pour le parenchyme rénal). L'apport en oxygène peut relever de globules rouges ou de sang complet ajoutés au perfusé. Les liquides de perfusion dérivent des milieux de cultures utilisées pour les cellules concernées. Ils contiennent des facteurs de croissance ou autres molécules plus spécifiques à chaque organe.

Une autre possibilité de recellularisation est la transplantation de l'organe decellularisé chez le receveur en espérant que la recellularisation se produira directement à partir des cellules du receveur (3).

## Conclusion

De très nombreux problèmes restent à résoudre avant de fabriquer ou de construire un organe et notamment un rein à partir d'une matrice extracellulaire. D'ailleurs, aucun des organes « autoconstruits » chez l'animal n'ont fait la preuve de leur capacité à assurer pour plus de quelques heures une fonction vitale chez le receveur.

Pour le rein, aucune transplantation n'a encore été rapportée alors qu'elle représente l'enjeu principal de la recherche dans ce domaine. Cet objectif reste plausible même s'il apparaît encore très lointain. Nous sommes encore loin des applications cliniques : c'est ce qui a poussé certains chercheurs à s'orienter vers l'amélioration du rein artificiel en lui associant des cellules épithéliales rénales. Ces cellules dérivées du tubule rénal peuvent compléter la fonction de filtration réabsorption par leurs caractéristiques métaboliques, endocrinologiques et immunomodulatrices (réabsorption du glucose, des acides aminés, de l'eau ; régulation de la concentration en sodium, potassium, phosphore et équilibre acide-base ; sécrétion d'érythropoïétine, rénine, prostaglandine, vitamine D). Le rein bio-artificiel ainsi réalisé a fait l'objet d'essais cliniques phase I et II démontrant son intérêt chez les patients à insuffisance rénale aiguë terminale (14) et la nécessité de poursuivre la recherche dans ce domaine.

## Références

1. Atala A. Engineering organs. *Curr Opin in biotechnologies* 2009 ; 20 : 575-92.
2. Atala A, Bauer SB, Soler S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006 ; 367 : 1241-6.
3. Raya-Rivera A, Esquiliano J, Yoo J, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction : an observational study. *Lancet* 2011 ; 377 : 1175-82.
4. Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation; past, present, and future. *Transplantation* 2011 ; 91 : 1310-7.
5. Orlando G, Baptista P, Birchall M, De Coppi P, Farney A, et al. Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation : current status and future challenges. *Transplant Intern* 2011 ; 24 : 223-32.
6. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, et al. Perfusion-decellularized matrix : using nature's platform to engineer a bio artificial heart. *Nat Med* 2008 ; 14 : 213-21.
7. Nigam SK, Wu W, Bush KT. In vitro kidney development, tissue engineering and systems biology. *Organogenesis* 2008 ; 4 : 137-43.
8. Rosines E, Johkura K, Zhang X, Schmidt HJ, Decambre M, et al. Constructing kidney-like tissues from cells based on programs for

- organ development: toward a method of in vitro tissue engineering of the kidney. *Tissue Eng Part A* 2010 ; 16 : 2441-55.
9. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 2338-47.
  10. Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani SH, Siddiqui M, Atala A, Soker S. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009 ; 2009 : 6526-9.
  11. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Engineering* 2010 ; 16 : 2207-16.
  12. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011 ; 13 : 27-53.
  13. Galende E, Karakikes I, Edelman L, Desnick RJ, Kerenyi T, et al. Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells. *Cell Reprogram* 2010 ; 12 : 117-25.
  14. Tasnim F, Deng R, Hu M, Liour S, Li Y, Ni M, Ying JY, Zink D. Achievements and challenges in bioartificial kidney development. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010 ; 3 : 14-26.