

Formation et propagation de kystes rénaux dans la Polykystose Rénale Autosomique Dominante (PKRAD) : étude dans des systèmes microfluidiques biomimétiques, les reins-sur-puce

Sylvie Coscoy, synthèse Journée Annuelle de l'Association Polykystose France 2023

Nous sommes un groupe de chercheurs à l'interface physique-biologie, dont l'activité est localisée au laboratoire Physico Chimie Curie (Institut Curie, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS UMR168) et à l'Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique, à Paris.



Brice Lapin
Thèse 2019 - 2023



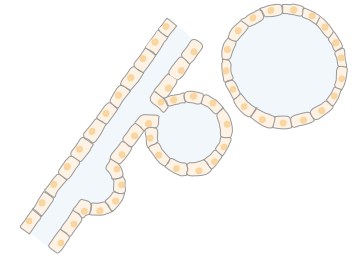
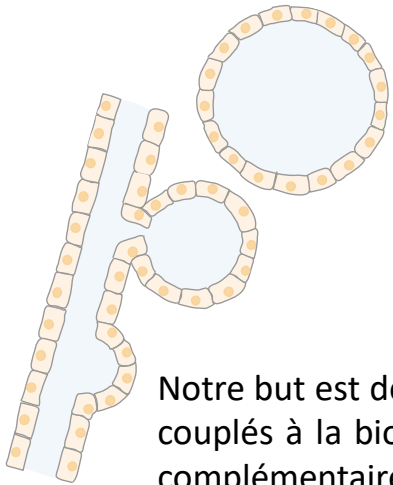
Sarah Myram
Thèse 2016-2020



Stéphanie Descroix
Chercheuse CNRS, microfluidique



Sylvie Coscoy
Chercheuse CNRS, biophysique



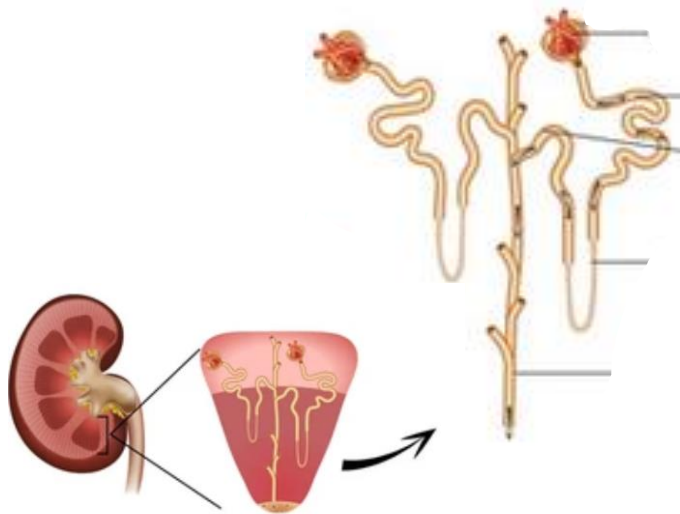
Notre but est de comprendre les mécanismes initiaux de formation des kystes dans la maladie à l'aide d'approches et de concepts physiques couplés à la biologie. Afin d'aboutir à une vision complète des mécanismes de la maladie, nos études bénéficient également d'approches complémentaires, notamment *in vivo* en collaboration avec Frank Bienaimé à l'Institut Necker Enfants Malades.

Nous nous intéressons à la question encore peu explorée des déterminants mécaniques et géométriques du rein responsables de l'initiation des kystes, et avons développé un modèle d'étude *in vitro* innovant de rein-sur-puce spécifiquement dédié à l'étude de la PKRAD.

Nous espérons que notre système et les résultats obtenus contribueront à terme à l'identification de traitements ciblant les étapes précoces de la maladie.

Notre but : comprendre les mécanismes physiques initiaux de formation des kystes dans la PKRAD

Le rein : importance des déterminants géométriques et mécaniques

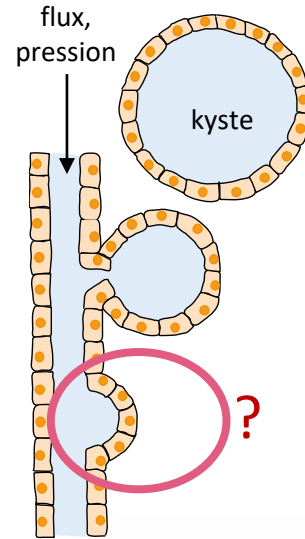


Réseau dense d'unités élémentaires de filtration, les néphrons:

- tubes de diamètre étroitement contrôlé (de 50 à 15 μm selon les segments)
- Contraintes hydrodynamiques permanentes : flux, pression

Chaque rein contient environ un million de néphrons : tubes empaqués de manière très dense

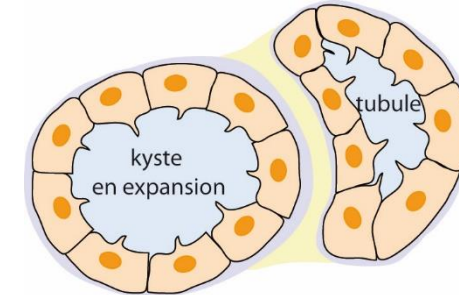
La formation de kystes



d'après Blanco *et al.* *Am. J. Physiol.* 305, F797-F812 (2013)

Perte locale de contrôle du diamètre des tubes

Evolution de la maladie : effet 'boule de neige'

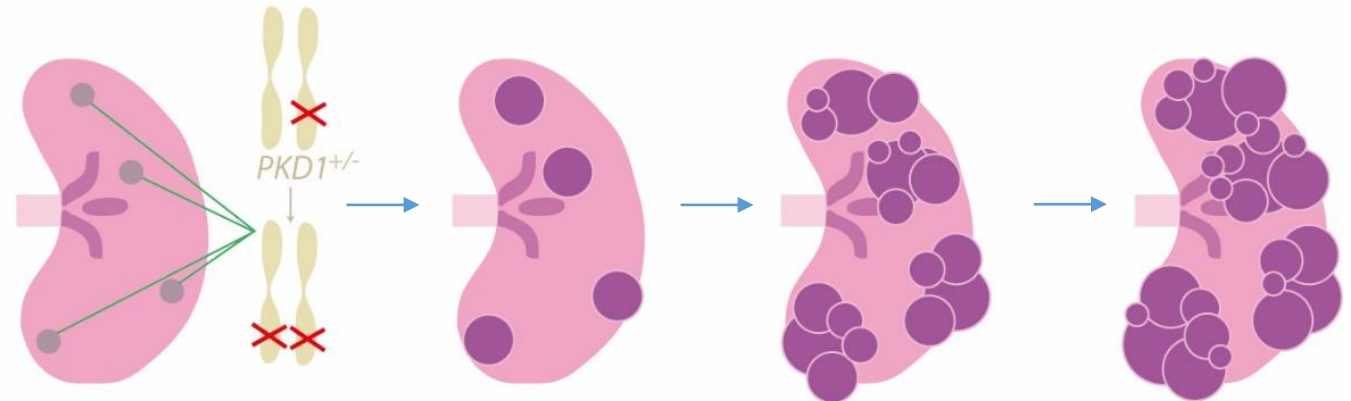


d'après Grantham *et al.*, *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 556-566 (2011)

Au cours de la maladie, les premiers kystes apparaissent de manière aléatoire. L'expansion de ces premiers kystes semble faciliter la formation de kystes secondaires dans les tubules adjacents, très proches : effet 'boule de neige' → regroupement des kystes en grappe et évolution exponentielle du nombre de kystes

Notre hypothèse est que cet effet serait dû à la compression mécanique des tubules par les premiers kystes en expansion.

Etapes séquentielles dans la PKRAD



Des modèles pour l'étude de la PKRAD

But : étude de l'effet de l'inactivation des gènes PKD1 ou PKD2

Modèles animaux

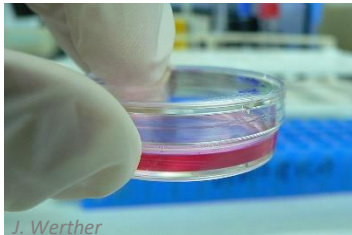


Etude de la formation de kystes dans des modèles intégrés

Systèmes complexes avec des paramètres multiples à découpler

Culture cellulaire

cultures traditionnelles en 2D

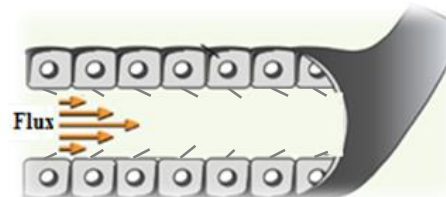


Propriétés à l'échelle cellulaire et multicellulaire
Imagerie à haute résolution spatiotemporelle

nécessité d'un passage en 3D

Propriétés hydrodynamique
Flux (cisaillement)
Pression luminale

Géométrie
Courbure du tube
Confinement



Membrane basale
Rigidité
Densité de sites d'adhésion

systèmes de cultures 3D

Cellules en hydrogels 3D

formation spontanée de tubes ou de cystes

Organoïdes

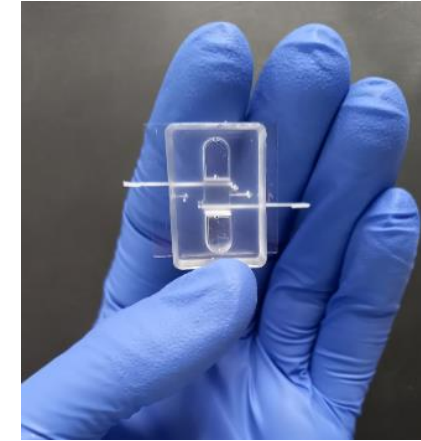
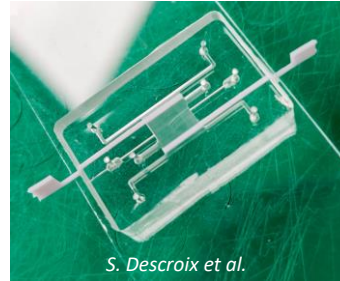
auto-organisation en gel 3D à partir de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites

Organes sur puces

Le champ en expansion des organes sur puce

Microfluidique :

Manipulation et contrôle de fluides (μL - pL), dans des canaux de dimensions $\sim 10\text{-}100\ \mu\text{m}$.

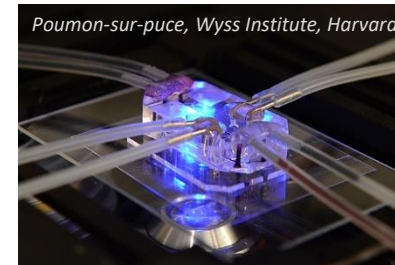


Organes-sur-puce :

Domaine émergent: de plus en plus d'organes-sur-puce: cerveau, foie, coeur, intestin...

Bénéfices attendus:

- Révolutionner le développement de médicaments
- Modélisation des maladies, médecine personnalisée
- Etude des mécanismes biologiques et biophysiques



Reins-sur-puce :

Premiers systèmes :

Mimer les fonctions (filtration, réabsorption, sécrétion...), effet d'un flux physiologique, néphrotoxicité...

Exemple : Jang *et al.* Integr Biol 5(9) (2013)

Flux / échanges mais géométries non réalistes (cellules en 2D)



Plus récemment : importance de l'architecture 3D

Bio-impression 3D

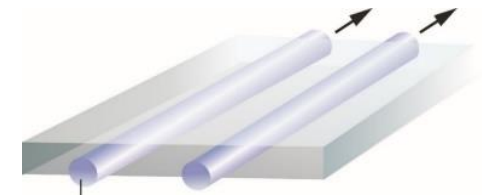
Homan *et al.* Sci Rep 6, 34845 (2016)

Moulage de fils

Weber *et al.* Kidney Int 90(3): 627–637 (2016)

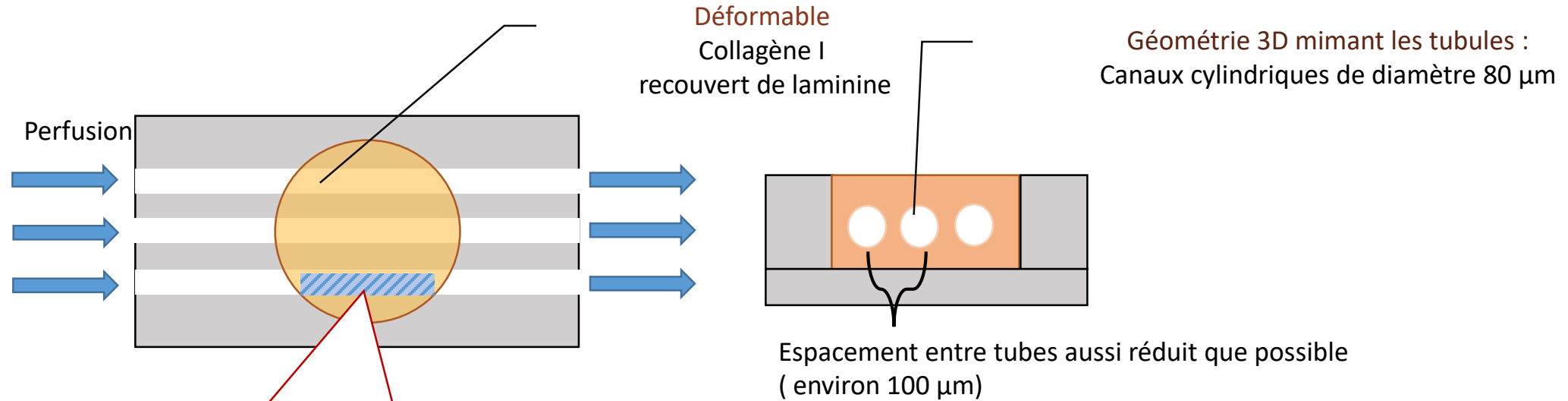
← Venzac *et al.* Biomicrofluidics. 12(2):024114 (2018)

Publication de l'équipe : tubes avec changement de diamètre pour l'étude de la néphronoptise

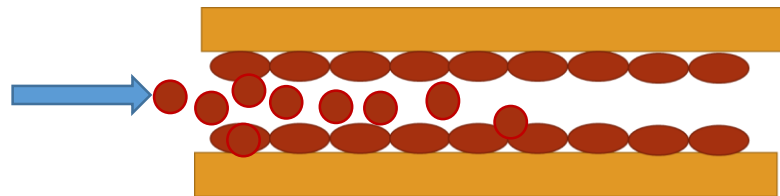


Notre système de rein-sur-puce spécifiquement dédié à l'étude de la PKRAD

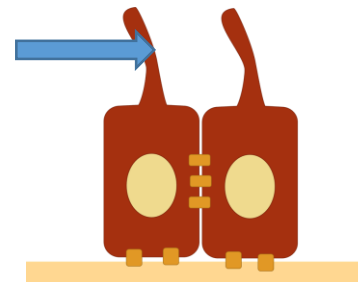
Cahier des charges :



Perfusion
pour l'ensemencement...



... ou l'application
de flux ou pression



Lignées cellulaires rénales "Pdk1-" ou contrôle,
issues du tubule proximal (PCT)
ou du canal collecteur (mIMCD-3)

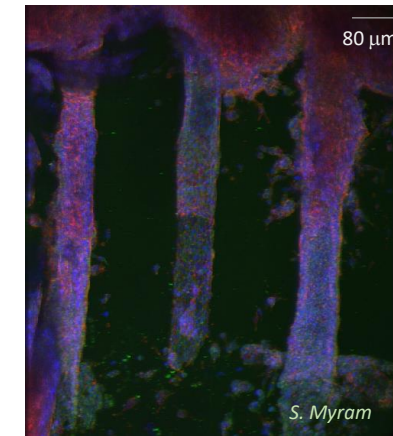
PCT : S. Somlo, Georges M. O'Brien

mIMCD-3 : M. Köttgen, L. Westermann, Tilman Busch

Résultats : modèle cellulaire PKRAD → dilatation des tubes

Travail publié sur les cellules du tubule proximal (PCT)

Myram et al., Frontiers Bioeng. Biotechnol. 2021



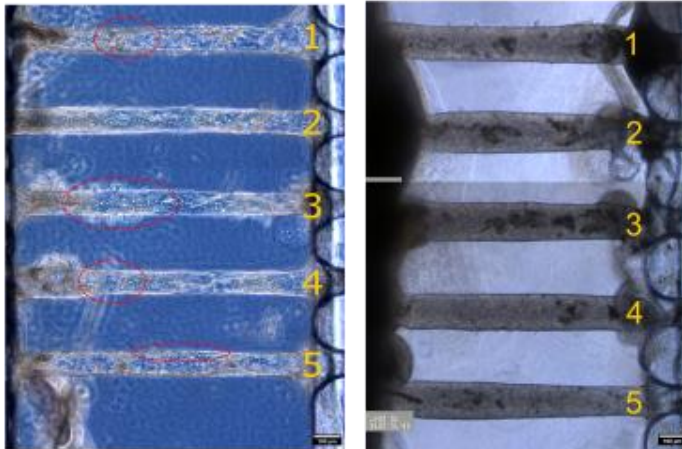
Cellules PCT tapissant les tubes, imagerie confocale

Dilatation tubulaire spécifique des cellules PKRAD...

plus importante si tubes rapprochés (couplage entre tubes)

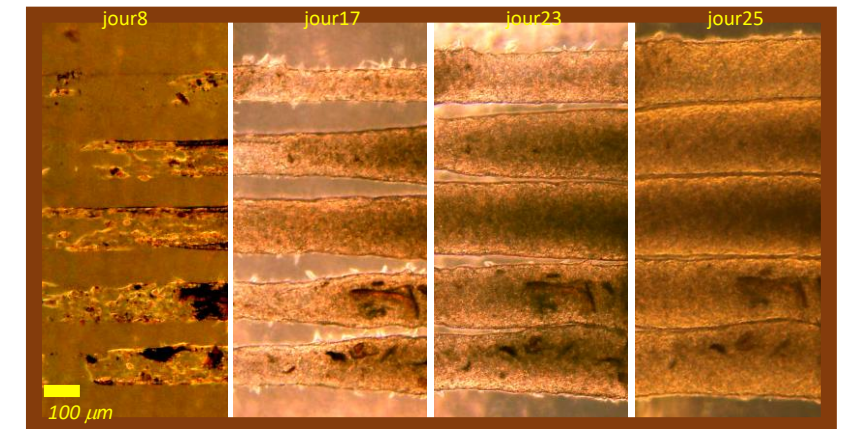
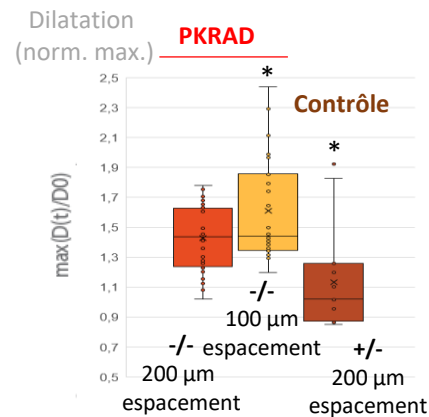
Contrôle PCT *Pkd1*^{+/-}

PKRAD PCT *Pkd1*^{-/-}



jour16-17

200 μm d'espacement entre tubes

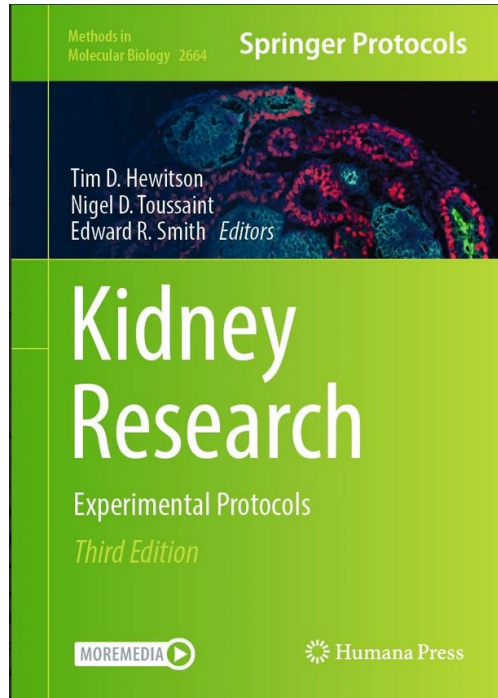


PKRAD, 100 μm d'espacement entre tubes

La dilatation tubulaire observée lorsque les tubes sont tapissés de cellules modèles de PKRAD est encore plus importante lorsque les tubes sont rapprochés (de 200 μm à 100 μm d'espacement entre tubes).

Cela suggère un couplage entre tubes en accord avec l'effet 'boule de neige'.

Actualité : parution d'un article de méthodes en juillet 2023



Construction of a Multitubular Perfusable Kidney-on-Chip for the Study of Renal Diseases

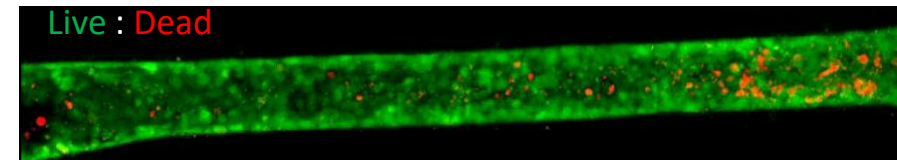
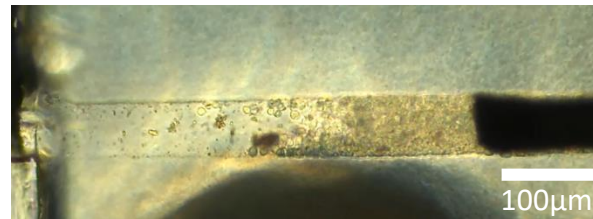
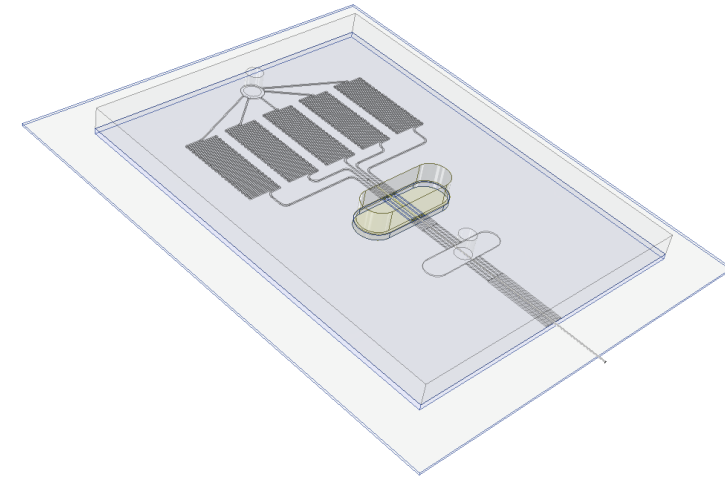
Brice Lapin, Sarah Myram, Manh-Louis Nguyen, Giacomo Gropplero, Sylvie Coscoy & Stéphanie Descroix

Protocol | First Online: 11 July 2023

Part of the [Methods in Molecular Biology](#) book series (MIMB, volume 2664)

Nouvelle génération de rein-sur-puce
développée par Brice Lapin

**Contrôle amélioré de la perfusion et de
l'ensemencement cellulaire**



Les résultats récents obtenus font l'objet de **publications en rédaction** (communication sur le site après publication)

Axes principaux :

Dans le canal collecteur (d'où sont issus les premiers kystes), une dilatation tubulaire est également observée pour des modèles PKRAD.

Méthode originale mise au point par Brice Lapin pour découpler flux et pression, et étudier indépendamment l'effet de ces contraintes sur l'organisation cellulaire et la dilatation tubulaire.

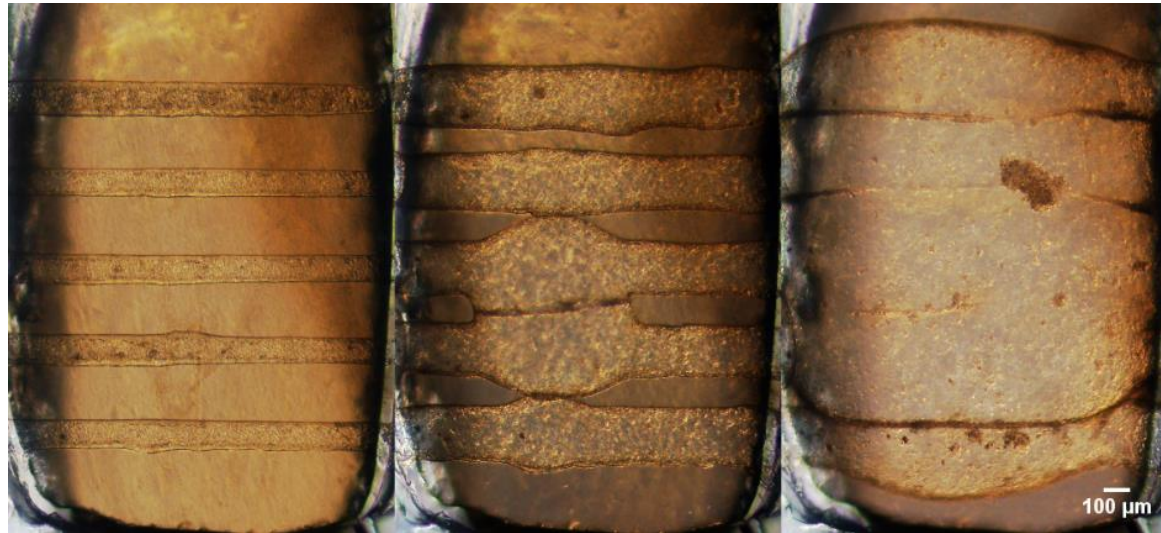


Conclusions sur la dilatation tubulaire

- observée dans deux lignées de modèles PKRAD issues de parties différentes du néphron
- accentuée par rapprochement des tubes (effet boule de neige)
- observée en conditions statiques ou sous contraintes hydrodynamiques (flux + pression)
- dépendante des propriétés mécaniques de la matrice

Perspectives

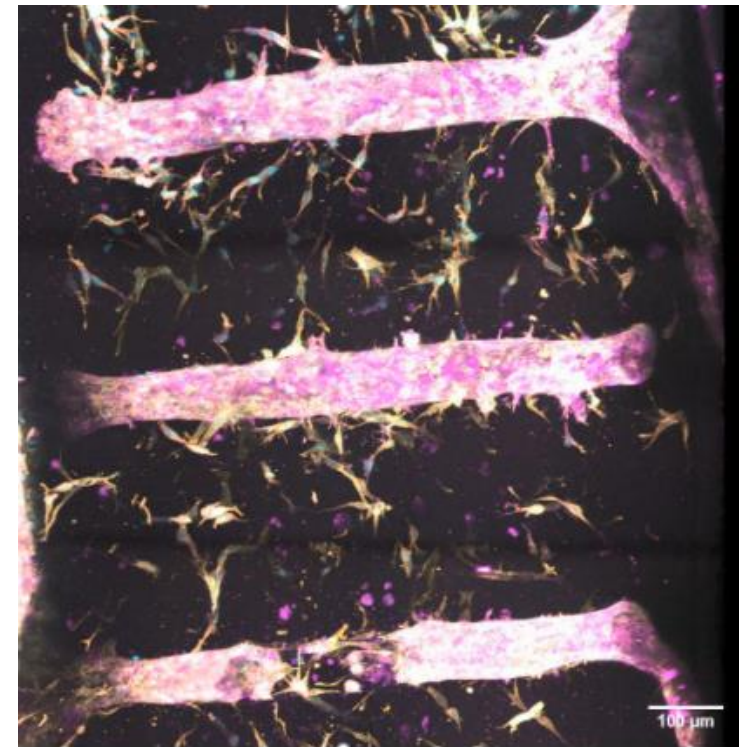
- (1) comprendre et modéliser les mécanismes de dilatation tubulaire
- (2) mosaïcisme, compétition et dilatation localisée
- (3) interactions kystes - néphrons



*Dilatation de tubule sous flux + pression,
0, 2 et 4 jours après ensemencement cellulaire*

Brice Lapin

- (4) : co-culture avec des fibroblastes ou des cellules immunitaires pour mimer la fibrose et l'inflammation aux stades tardifs de la PKRAD



*Fibroblastes (en jaune) insérés dans la matrice de collagène du rein-sur-puce,
entre les tubes bordés de cellules épithéliales (magenta) Brice Lapin*

Remerciements

Un réseau multidisciplinaire pour l'étude de la PKRAD

UMR 168

Tous les membres des équipes
PBME et MMBM

Isabelle Bonnet

Axel Buguin

Stéphanie Descroix

Giacomo Groppero

Brice Lapin

Pascal Silberzan

Pierre Ucla

Jean-Louis Viovy

BMBC UMR168

Fanny Tabarin

Equipe administrative UMR 168

Anciens membres

François Amblard

Aude Battistella

Taous Benarab

Charles Cavaniol

Lorraine Couteau

Ludovic Leconte

Irène Le Moine - Caubarrère

Randa Madoun

Laurent Malaquin

Sylvain Monnier

Sarah Myram

Manh-Louis Nguyen

Polina Rapoport

Bastien Venzac

Institut Necker

Frank Bienaimé

Manal Mazloum

Rushdi Alghamdi

Marco Pontoglio

Sophie Saunier

Fabiola Terzi

IPMC, Sophia Antipolis

Sophie Demolombe

Eric Honoré

Amanda Patel

Uniklinik Freiburg

Tilman Busch

Michael Köttgen

Lukas Westermann

Yale University

Stefan Somlo

Georges M. O'Brien

Plateforme technologique IPGG

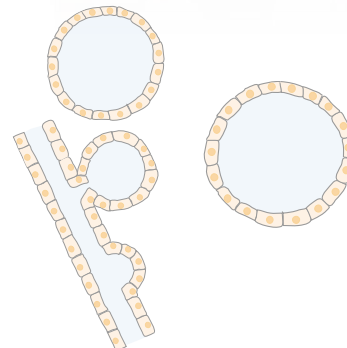
Bertrand Cinquin

Plateforme d'imagerie PICT-IBISA

Physico Chimie Curie



Équipe Physico-Biologie aux Méso-Echelles



Institut Necker Enfants Malades



Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la Microfluidique



Frank Bienaimé



Équipe Macromolécules et Microsystèmes pour la Biologie et la Médecine