

## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
<b>2 DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>6</b>
<b>3 OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>8</b>
<b>4 MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>9</b>
4.1 MATERIEL .....	9
4.1.1 <i>Les animaux</i> .....	9
4.1.1.1 Caractéristiques .....	9
4.1.1.2 Recrutement et inspection sanitaire.....	9
4.1.1.3 Identification des brebis .....	10
4.1.1.4 Hébergement des brebis .....	10
4.1.1.5 Répartition des groupes, chronologie des actes chirurgicaux et des prélèvements biologiques .....	10
4.1.2 <i>Les cellules</i> .....	13
4.2 METHODE.....	13
4.2.1 <i>Le prélèvement de moelle osseuse</i> .....	13
4.2.1.1 Anesthésie .....	14
4.2.1.2 Technique de ponction de moelle osseuse .....	15
4.2.2 <i>Culture et amplification cellulaire</i> .....	16
4.2.2.1 Produits utilisés .....	16
4.2.2.2 Démarrage de la culture .....	16
4.2.2.3 Passages.....	16
4.2.3 <i>Le marquage cellulaire</i> .....	17
4.2.3.1 Sélection des marqueurs cellulaires .....	18
4.2.3.2 Coloration au cmDiI (Chlorométhylbenzamido-dérivée du DiI).....	18
4.2.3.3 Coloration au DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole).....	18
4.2.3.4 Coloration au BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine).....	18
4.2.3.5 Evaluation in vitro des marqueurs.....	19
4.2.3.5.1 Expériences de dilution (principe) .....	19
4.2.3.5.2 Expérience de recaptage (principe).....	19
4.2.3.6 Contrôle du marquage avant greffe cellulaire .....	19
4.2.4 <i>Modèle expérimental d'ischémie rénale</i> .....	20
4.2.4.1 Caractéristiques de l'ischémie.....	20
4.2.4.2 Technique de création de l'ischémie rénale à J0.....	20
4.2.5 <i>Technique d'injection des CSM dans l'artère rénale à J15</i> .....	23
4.2.6 <i>Technique d'injection intraparenchymateuse des CSM à J15</i> .....	23
4.2.7 <i>Sacrifice, prélèvement des animaux</i> .....	24
4.2.8 <i>Traitement des reins prélevés</i> .....	24
4.2.8.1 Evaluation macroscopique .....	24
4.2.8.2 Evaluation microscopique .....	25
4.2.8.2.1 Evaluation microscopique des lésions d'ischémie rénale .....	25
4.2.8.2.2 Repérage : évaluation microscopique de l'ensemencement du parenchyme rénal par les CSM injectées .....	25
4.2.8.2.3 Identification cellulaire .....	26
4.2.9 <i>Traitement des prélèvements sanguins</i> .....	26

4.2.9.1	Réalisation des dosages d'urée et de créatinine plasmatique.....	26
4.2.9.2	Réalisation des dosages de l'activité rénine plasmatique (ARP).....	27
4.2.10	<i>Méthode statistique</i> .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>28</b>
5.1	MODELE D'ISCHEMIE RENALE .....	28
5.1.1	<i>Résultats des dosages d'urée et de créatinine plasmatique.</i> .....	28
5.1.2	<i>Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique.</i> .....	31
5.1.3	<i>Résultats de l'évaluation anatomopathologique des lésions rénales.</i> .....	32
5.2	CULTURE ET MARQUAGE CELLULAIRE.....	35
5.2.1	<i>Culture cellulaire</i> .....	35
5.2.2	<i>Le marquage cellulaire</i> .....	36
5.2.2.1	Résultats du contrôle du marquage des cellules avant greffe.....	36
5.2.2.2	Expérience de dilution.....	38
5.2.2.3	Expérience de recaptage.....	38
5.3	RESULTATS DE LA GREFFE CELLULAIRE .....	39
5.3.1	<i>Résultats de la méthode de greffe par voie intra artérielle.</i> .....	39
5.3.1.1	Repérage des cellules .....	39
5.3.1.2	Identification des cellules.....	43
5.3.2	<i>Résultats de la méthode de greffe par voie intra-parenchymateuse</i> .....	45
<b>6</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>47</b>
6.1	CHOIX DE LA POPULATION DES CS. ....	47
6.2	LA VOIE DE GREFFE CELLULAIRE .....	49
6.3	CHOIX DES MARQUEURS .....	51
6.4	NOMBRE DE CELLULES INJECTEES .....	52
6.5	MODELE D'ISCHEMIE REPERFUSION .....	52
6.6	DEVENIR CELLULAIRE .....	55
6.6.1	<i>Rendement de la greffe cellulaire.</i> .....	55
6.6.2	<i>Recrutement préférentiel des CSM par le rein lésé.</i> .....	55
6.6.3	<i>Différenciation des CSM en cellules rénales</i> .....	56
<b>7</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVES DU TRAVAIL .....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUCTION

Malgré une meilleure prise en charge des néphropathies, l'insuffisance rénale terminale constitue un problème majeur de santé publique. A ce stade de la maladie, les thérapeutiques sont peu nombreuses et la dialyse reste le passage obligé en attendant la greffe. La transplantation rénale est la seule alternative thérapeutique curative, mais les listes d'attente s'allongent et les dons d'organes sont insuffisants. Il est donc nécessaire de développer des traitements préventifs visant à ralentir ou arrêter la progression de la maladie vers le stade terminal.

Remplacer des cellules dégénérées, dysfonctionnelles ou absentes sont les atouts primordiaux de la thérapie cellulaire (TC) dans l'objectif de régénérer des organes défectueux.

Différentes populations de cellules souches sont utilisées en TC. Les cellules souches embryonnaires : Elles semblent avoir un potentiel inépuisable de multiplication et de génération de lignées cellulaires très différentes. Pour autant, leur caractère intrinsèque les projette au centre d'une polémique politique, scientifique et éthique qui en rend l'utilisation délicate et controversée (Lenoir 2000). En effet elles sont prélevées à un stade très précoce du développement de l'embryon, individu dont le statut est mal défini juridiquement et éthiquement dans nos sociétés. Ainsi les scientifiques et l'opinion publique sont très soucieux du bien fondé de l'utilisation et de la manipulation de ces cellules.

Les cellules souches de l'adulte : chaque organe posséderait un pool de cellules souches (Watt and Hogan 2000), plus ou moins quiescentes, qui participeraient au turn-over normal de régénération physiologique de l'organe et, en cas d'agression de ce dernier à la réparation du tissu lésé. De même, au sein de la moelle osseuse une population cellulaire appelée cellules souches mésenchymateuses de la moelle (CSM ou cellules souches adhérentes de la moelle) ont, elles aussi, une étonnante capacité de différenciation. En effet, une même cellule souche mésenchymateuse est capable d'engendrer des populations cellulaires aussi différentes que les myocytes, les chondrocytes, les ostéocytes ou les adipocytes (Pittenger, Mackay et al. 1999).

C'est cette dernière famille cellulaire (CSM) que nous nous proposons d'utiliser dans le cadre du traitement des néphropathies. Alors que le potentiel thérapeutique des CSM est massivement exploré en cardiologie, orthopédie ou neurologie, la néphrologie ne s'intéresse que depuis peu à ce nouvel outil thérapeutique.

Le but de ce travail a été d'évaluer la capacité des cellules souches mésenchymateuses adultes de la moelle osseuse à s'intégrer aux structures rénales et à se différencier en cellules rénales après greffe autologue au sein du tissu rénal normal ou lésé par ischémie transitoire.

## 2 DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Quelques études récentes, peu nombreuses, se sont intéressées au potentiel de différenciation des cellules souches en cellules rénales :

- La première étude (Imasawa, Utsunomiya et al. 2001) a consisté à pratiquer une greffe de moelle osseuse provenant de souris transgéniques pour une protéine fluorescente (GFP) à des souris C37BL/6j irradiées. Un nombre grandissant de cellules marquées par la GFP a été observé parmi les cellules glomérulaires des souris greffées, jusqu'à 24 semaines après la greffe. Les cellules marquées ont été identifiées comme appartenant au groupe des cellules mésangiales.
- une deuxième étude (Imasawa and Utsunomiya 2002), menée par la même équipe, a consisté à utiliser le même protocole chez des rats témoins et chez des rats présentant une glomérulonéphrite immune induite par l'anticorps anti-Thy 1, entraînant une protéinurie et une mésangiolyse sévère. Chez les rats témoins, les cellules marquées ont été retrouvées majoritairement dans l'interstitium ; un très petit nombre de cellules marquées étaient présentes dans les glomérules. Chez les rats glomérulonéphritiques, les cellules marquées contribuaient à l'hypercellularité glomérulaire, sous la forme de cellules mésangiales. Ces résultats suggèrent un adressage spécifique des cellules souches vers les sites lésés, contribuant à la réparation cellulaire.
- Un troisième travail (Poulsom, Forbes et al. 2001) a étudié le rôle de cellules greffées dans le renouvellement et la réparation du parenchyme rénal chez des patients transplantés et chez des souris en utilisant comme marqueur du devenir des cellules médullaires le chromosome Y. Dans les deux cas, des cellules greffées ont été retrouvées dans le rein, essentiellement sous la forme de cellules épithéliales mais aussi, en moins grand nombre, sous la forme de cellules glomérulaires.

- Enfin deux travaux récents (Lin, Cordes et al. 2003) (Kale, Karihaloo et al. 2003), ont consisté en l'injection de cellules souches hématopoïétiques (CSH) de souris Rosa 26 mâles à des souris femelles de race sauvage après création de lésions d'ischémie-reperfusion chez les souris receveuses. Ces travaux ont montré que, les CSH avaient la capacité de s'intégrer aux tubules rénaux participant ainsi à leur réparation.

### 3 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les objectifs ont été les suivants :

- Analyse du devenir et de l'intégration des CSM injectées : localisation par analyse morphologique et différenciation par l'étude de différents marqueurs, en fonction du temps après la greffe.
- Recherche d'un adressage ou d'une différenciation préférentielle des cellules dans le tissu lésé en comparant les paramètres précédents dans les groupes de reins témoins et pathologiques.
- Détermination de la voie d'injection préférentielle par analyse du nombre et de la localisation des cellules marquées selon les différents protocoles d'injection. Analyse de la faisabilité des différentes techniques et du nombre de cellules pouvant être injectées.

## **4 MATERIEL ET METHODE**

Le protocole de ce travail de recherche a été validé par le comité d'éthique de la Fondation de l'Avenir. L'ensemble des expérimentations réalisées sur les animaux l'a été en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire, avec un souci permanent du bien-être des animaux. L'ensemble du travail expérimental sur animal a été mené au centre d'expérimentation et de recherche appliquée IMM RECHERCHE, Institut Mutualiste Montsouris, Paris.

### **4.1 Matériel**

#### **4.1.1 Les animaux**

##### **4.1.1.1 Caractéristiques**

L'étude a été réalisée sur des brebis de race Préalpes du Sud, âgées de deux à quatre ans pesant entre 48 et 62 kg.

Le groupe d'animaux sélectionné pour cette étude a été déterminé à l'avance et les animaux alloués aléatoirement par tirage au sort.

##### **4.1.1.2 Recrutement et inspection sanitaire**

Toutes les brebis utilisées dans ce protocole étaient issues d'élevage de station de reproduction de l'INRA. Ces élevages sont garantis indemnes de toute maladie légalement réputée contagieuse (MLRC). Tous ces animaux ont été considérés comme sains à leur entrée en protocole, et ont subi une inspection vétérinaire à leur arrivée dans le laboratoire. Un déparasitage (ectoparasites et endoparasites) systématique a été effectué par injection d'ivermectine (IVOMECA<sup>®</sup>) à la dose de 400 µg par animal par voie sous cutanée.



### 4.1.1.3 Identification des brebis

Les brebis possédaient une double identification par bouclage auriculaire. Un premier numéro de boucle correspondait au numéro de la carte verte, document sanitaire officiel de l'animal ; et un numéro de travail qui lui a été attribué à l'entrée dans l'élevage du laboratoire. Le numéro de protocole a été obtenu après alottement aléatoire comme indiqué ci-dessus.

### 4.1.1.4 Hébergement des brebis

Les animaux ont été hébergés sur deux sites différents en fonction de l'avancement du protocole.

Avant l'entrée en protocole toutes les brebis ont été hébergées pour une période d'acclimatation sur le site de la ferme expérimentale de Bligny, où elles étaient en bergerie paillée et en pâture restrictive pour améliorer leur bien-être. Elles ont été nourries avec foin et granulés et abreuvées *ad libitum* avec de l'eau propre à la consommation humaine.

Les brebis y ont été également hébergées entre les périodes opératoires.

Pour toutes les interventions chirurgicales les brebis ont été amenées au laboratoire 48h à l'avance pour éviter le stress dû au transport et y ont été gardées 48h en post-opératoire pour surveiller l'évolution immédiate de l'animal. Le laboratoire est localisé sur le site de L'Institut Mutualiste Montsouris, 42 bd Jourdan, 75014 Paris. Les animaux y ont été hébergés en cage de 9 mètres carrés sur caillebotis, par 2 ou 3 (l'isolement est à éviter, le comportement grégaire de l'espèce favorise le stress en isolement). Un cycle diurne nocturne de 12 h – 12 h y a été appliqué. Les animaux y ont été nourris avec un aliment complet en granulés et abreuvés *ad libitum* avec de l'eau propre à la consommation humaine.

### 4.1.1.5 Répartition des groupes, chronologie des actes chirurgicaux et des prélèvements biologiques

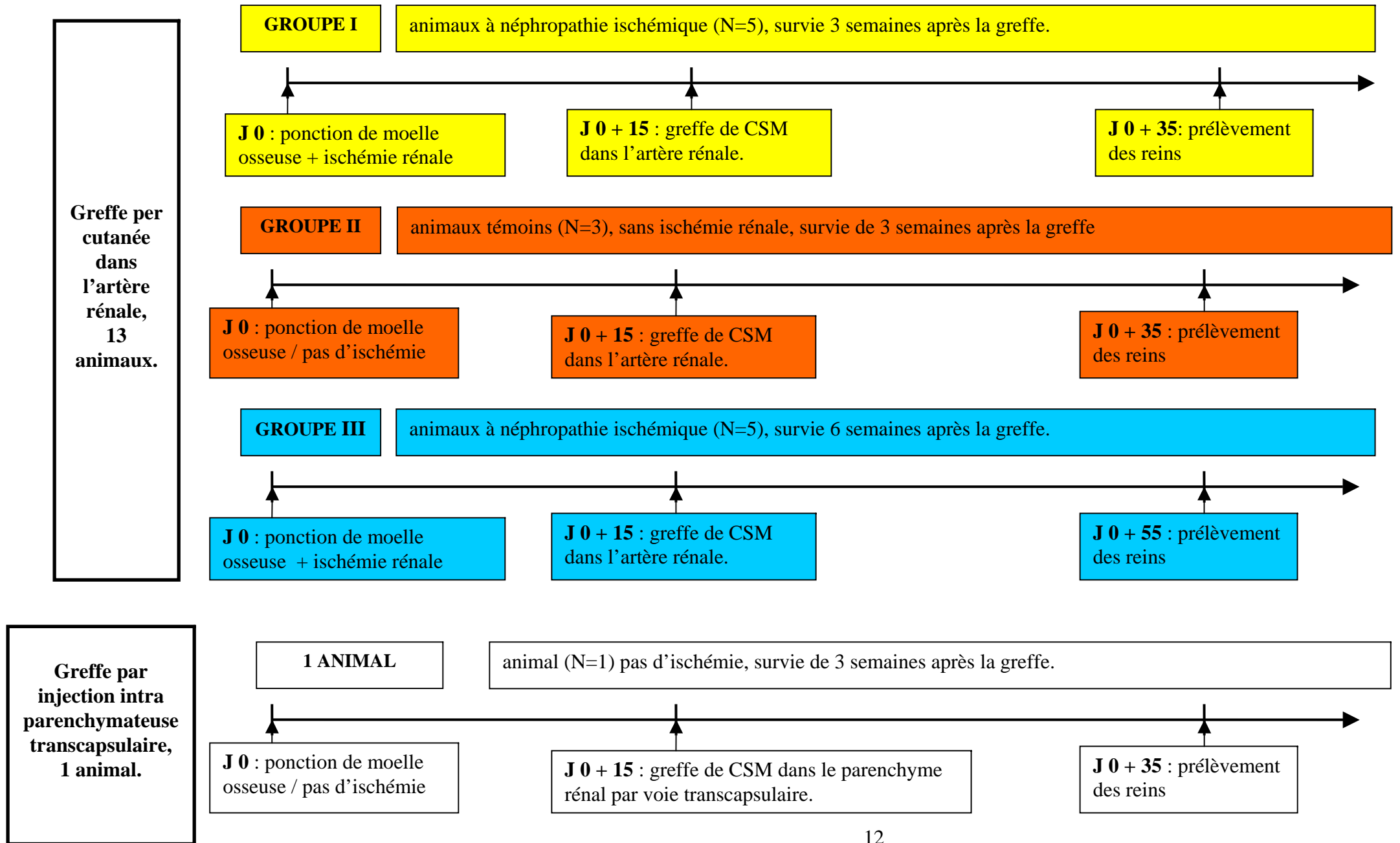
La population de brebis choisie comptait 14 animaux, âgés en moyenne de 2,61 ans (déviatoin standard (DS) = 0,6) pour un poids moyen de 59,65 kg (DS = 6,43). Ces 14 animaux ont été répartis en fonction de la voie de greffe cellulaire.

NB : L'étude de faisabilité comparant la voie d'injection de cellules (par voie intra-artérielle ou par voie intraparenchymateuse) a rapidement montré que la voie intra-parenchymateuse présentait de nombreux inconvénients. Ce qui explique l'abandon rapide de cette méthode et la répartition inégale des animaux.

**Treize brebis ont été réparties en trois groupes** sur lesquels la greffe cellulaire a été réalisée par **voie intra artérielle** (cf. figure 1).

1. **GROUPE I** : 5 brebis âgées de 2,6 ans en moyenne (DS = 0,54) pour un poids moyen de 54,5 kg (DS = 6), qui ont subi le protocole suivant :
  - A J0, ponction de moelle osseuse pour isolement, culture, et marquage des CSM et réalisation simultanément d'une ischémie rénale unilatérale transitoire de 30 min.
  - A J15, greffe des CSM par voie intra artérielle dans l'artère du rein ischémié.
  - A J35, prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.
  
2. **GROUPE II** : groupe témoin, 3 brebis âgées de 2,66 ans en moyenne (DS=1,15) pour un poids moyen de 63,66 kg (DS=5,03), qui ont subi le protocole suivant :
  - A J0, ponction de moelle osseuse pour isolement, culture, et marquage des CSM mais pas d'ischémie rénale.
  - A J15, greffe des CSM par voie intra artérielle dans l'artère d'un seul rein.
  - J 35 prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.
  
3. **GROUPE III** : 5 brebis âgées de 2,6 ans en moyenne (DS = 0,54) pour un poids moyen de 62,4 kg (DS=4,56), qui ont subi le protocole suivant :
  - A J0, ponction de moelle osseuse pour isolement, culture, et marquage des CSM et réalisation simultanément d'une ischémie rénale unilatérale transitoire de 45 min.
  - A J15 greffe des CSM par voie intra artérielle dans l'artère du rein ischémié.
  - A J55 prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

**Figure 1 : Répartition des groupes d'animaux et chronologie de l'expérimentation**



Prélèvement sanguins : tous les animaux ont subi les mêmes analyses sanguines

- A J0, prise de sang (PS) veineuse périphérique pour dosage de l'urée et de la créatinine plasmatique, et PS dans la veine rénale du rein lésé avant et après ischémie pour dosage de l'activité rénine plasmatique (ARP).
- A J15, PS veineuse périphérique pour dosage de l'urée et de la créatinine.
- Au sacrifice, PS veineuse périphérique pour dosage l'urée et de la créatinine.

**Une seule brebis a servi d'animal de faisabilité** pour la méthode d'injection cellulaire **intraparenchymateuse** transcapsulaire (méthode rapidement abandonnée, cf. résultats paragraphe 5.3.2 ) (cf. figure 1). Cet animal âgé de 3 ans pour un poids de 60 kg a subi :

- A J0, ponction de moelle osseuse pour isolement, culture, et marquage des CSM mais pas d'ischémie rénale.
- A J15, greffe des CSM marquées par injection transcapsulaire intraparenchymateuse.
- A J 35 prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

#### **4.1.2 Les cellules**

La population cellulaire sur laquelle nous avons travaillé est issue de la purification de moelle osseuse sur l'animal adulte : ce sont des cellules souches mésenchymateuses adultes isolées et amplifiées comme décrit dans le paragraphe suivant.

## **4.2 Méthode**

### **4.2.1 Le prélèvement de moelle osseuse**

Le prélèvement de moelle osseuse en vue de l'isolement, de la culture, et de l'amplification des CSM, est la première étape du protocole.

### **4.2.1.1 Anesthésie**

Pour toutes les interventions les animaux ont été anesthésiés de la même façon afin de s'affranchir des variations dues à l'anesthésie. Les brebis ont été mises à jeun 24 h avant l'intervention.

#### **Prémédication :**

injection intraveineuse de 0,2 mg / kg de midazolam (HYPNOVEL®).

#### **Induction :**

injection intraveineuse de 0,2 mg / kg de pentobarbital sodique (NESDONAL®).

#### **Entretien :**

anesthésie gazeuse en respiration contrôlée par 1,5 à 2 % d' isoflurane dans 100 % d'oxygène.

#### **Monitoring**

La visualisation de l'électrocardiogramme, de la pression artérielle et du CO<sub>2</sub> expiré, a permis la surveillance des paramètres vitaux au cours de l'anesthésie.

Autres : une sonde gastrique a été placée à demeure pendant toute la durée de l'intervention afin d'éviter la météorisation ainsi que les fausses déglutitions au réveil de l'animal.

#### **Analgésie :**

Dans un souci de bien être animal et parce que l'évaluation de la douleur est difficile à réaliser, tous les animaux ont été systématiquement traités à la morphine (MORPHINE MERAM®) (0,2 mg / kg par voie intra musculaire)

## **Administration d'antibiotiques :**

Une antibioprophyllaxie systématique a été réalisée sur tous les animaux lors de chaque intervention : injection intraveineuse en début d'intervention de 15 mg / kg de céfaléxine (RILEXINE®).

### **4.2.1.2 Technique de ponction de moelle osseuse**

L'animal a été placé en décubitus dorsal. Les zones cutanées en regard des tubercules majeurs huméraux et des tubérosités tibiales ont été largement tondues et l'asepsie chirurgicale a été obtenue par lavages successifs à l'aide de désinfectants à base de povidone iodine (Bétadine®).

## **Localisation des prélèvements :**

Les ponctions de moelle osseuse ont été réalisées sur animal anesthésié en quatre points de ponction différents :

- Les deux tubercules majeurs huméraux.
- Les deux tubérosités tibiales.

## **Technique :**

Après préparation chirurgicale standard un trocard de Mallarmé de 16 gauges a été introduit par voie per cutanée jusque dans la cavité médullaire en regard des sites de ponction ci-dessus mentionnés. Une fois en place, le mandrin a été retiré et une seringue de dix millilitres à luer-lock a permis le recueil de la moelle. La seringue a été préalablement remplie de 1,5 ml d'héparine (Héparine Choay®) pour éviter la formation de caillot lors de l'aspiration de la moelle osseuse.

Le volume prélevé a été de 2 à 3 ml de moelle par site de ponction. Une fois l'aspiration terminée, le prélèvement obtenu a été homogénéisé en agitant la seringue.

L'aspirat a été ensuite transféré dans un flasque de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant 30 ml de milieu de culture (DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO®)) et placé à l'étuve.

L'opération a été répétée quatre fois.

## 4.2.2 Culture et amplification cellulaire

La technique de culture et de caractérisation a été couramment décrite dans la littérature (Bianco and Gehron Robey 2000; Wang, Shum-Tim et al. 2000; Fukuhara, Tomita et al. 2002; Lin, Cordes et al. 2003) et nous avons suivi ces méthodes.

### 4.2.2.1 Produits utilisés

1. DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax-1, sodium pyruvate, pyroxydine, 4500 mg/L glucose, GIBCO®
2. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7,2/0,1M, GIBCO®.
3. Trypsine (1 X), GIBCO®.
4. Sérum de Veau Fœtal (SVF), GIBCO®.
5. Pénicilline/Streptomycine (Péni/Strepto), GIBCO®.
6. DMEM complété (DMEMc) :

DMEM	79%
SVF	20%
Péni/Strepto	1%

### 4.2.2.2 Démarrage de la culture

Les 4 flasques ont été placés 3 jours à l'étuve avant toute manipulation ultérieure. En effet les CSM sont caractérisées par leur propriété d'adhérence au support de culture alors que les autres familles cellulaires restent en suspension dans le milieu de culture. Ainsi l'attente a permis aux CSM de se fixer au fond du flasque. Les conditions de culture cellulaire ont été les suivantes : température = 37°C ; atmosphère humide; saturation en CO<sub>2</sub> = 5%.

### 4.2.2.3 Passages

Le premier passage (transfert du contenu d'une boîte à plusieurs boîtes de culture en vue d'une augmentation de la surface de culture) a été réalisé trois jours après le prélèvement. Le surnageant a été retiré des boîtes par aspiration puis les cellules souches mésenchymateuses adhérentes ont été lavées trois fois de suite avec 10 ml de DMEMc. Les

boîtes ont été ensuite observées au microscope optique inversé (Olympus®, LH50A). Les CSM adhérentes apparaissent sur le fond de la boîte, de forme allongée. Elles sont à ce stade présentes sous forme d'îlots de quelques cellules (3 à 5 cellules regroupées). Ces colonies ont été le point de départ de la multiplication cellulaire.

Une observation quotidienne au microscope inversé à contraste de phase (Olympus®, LH50A) a été réalisée pour déterminer la vitesse de multiplication. Un passage a été pratiqué dès que les cellules arrivaient à plus de 70% de confluence. De la même façon que décrite précédemment les cellules ont été rincées. Puis 5 ml de trypsine ont été ajoutés pendant 2 à 5 minutes en fonction du temps nécessaire au décollement des CSM. Pour améliorer la vitesse de décollement, la boîte a été frappée contre la paillasse, ajoutant à la digestion enzymatique un effet mécanique. Une fois que l'ensemble des cellules a été décollées, la digestion a été stoppée par le SVF en ajoutant à chaque boîte 4 ml de milieu complet (DMEMc) (en effet le SVF neutralise la trypsine).

Les cellules ont été ensuite réparties dans deux flasques de culture et replacées à l'étuve. L'observation quotidienne a permis de déterminer la date des passages ultérieurs. Trois passages ont été nécessaires à l'amplification cellulaire pour obtenir 100 millions de CSM.

Le jour de la greffe, les cellules ont été trypsinées : le surnageant a été enlevé des boîtes puis les cellules ont été rincées avec du PBS (10ml / boîte) pendant 1 minute. Cinq ml de trypsine ont été ajoutés pendant 5 à 10 min en fonction du décollement des cellules du fond de la boîte (la boîte a été frappée sur la paillasse). Cinq ml de milieu complet (DMEMc) ont été ajoutés (le SVF stoppe la digestion). La détermination du nombre de CSM obtenu se fait par comptage à la cellule de Malassez.

### **4.2.3 Le marquage cellulaire**

Le but de l'étude a été de suivre le devenir des cellules souches mésenchymateuses après greffe autologue dans l'artère rénale et leur capacité à ensemencher le rein.

Il a été nécessaire, pour la traçabilité des CSM, de marquer ces cellules. Afin de valider définitivement la meilleure méthode de marquage des cellules et d'identifier le meilleur traceur après transplantation *in vivo*, plusieurs tests *in vitro* ont été réalisés.



#### **4.2.3.1 Sélection des marqueurs cellulaires**

Trois marqueurs nucléaires non génétiques couramment utilisés pour le marquage cellulaire (Horan, Melnicoff et al. 1990; Fukuhara, Tomita et al. 2002) dans le cadre de la thérapie cellulaire ont été sélectionnés : le cmDiI (Chlorométhylbenzamido-dérivée du DiI, marqueur carbocyaninique lipophile) marqueur fluorescent rouge des membranes (Cell tracker, Molecular Probes®), le DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole) marqueur fluorescent bleu de l'ADN (Sigma®) et le BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) marqueur de l'ADN révélé par immuno-histochimie (Roche®)

#### **4.2.3.2 Coloration au cmDiI (Chlorométhylbenzamido-dérivée du DiI)**

Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 ml puis remises en suspension dans 10 ml de PBS. Le cmDiI a été ajouté (un tube de 50 µl, à 1 mg/ml dans du DMSO, dilution=1/200 ( $5 \times 10^{-4}$ /ml)). Les cellules ont été laissées 5 minutes à température ambiante puis 15 minutes dans la glace. Vingt ml de PBS ont été ajoutés puis les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 2000 t/min. Les cellules ont enfin été lavées 3 fois.

#### **4.2.3.3 Coloration au DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole)**

Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 ml puis remises en suspension dans 5 ml de DMEM pur. Le DAPI a été ajouté (25 µl/ 5 ml) et laissé au contact des cellules pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont enfin été lavées 3 fois.

#### **4.2.3.4 Coloration au BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine)**

Les cellules encore en boîtes de Pétri en basse densité (potentiel de division et d'incorporation du BrdU) sont rincées au PBS puis incubées avec le BrdU (10µmol/l) pendant 48 heures à 37°C dans l'incubateur. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS avant d'être trypsinées.

#### **4.2.3.5 Evaluation in vitro des marqueurs**

Nous avons au préalable testé ces trois marqueurs en les évaluant sur deux critères. En effet, deux critiques classiques de ce genre de réactif sont, le risque de dilution rapide au cours des divisions cellulaires (risque de faux négatif) et le risque de relargage lors de mort cellulaire, d'où le risque de marquer les cellules résidentes et ainsi de confondre une cellule native avec une cellule greffée (faux positif).

Plusieurs expériences ont été menées pour répondre à ces deux préoccupations :

##### ***4.2.3.5.1 Expériences de dilution (principe)***

Dix boîtes de Pétri de 35cm<sup>2</sup> ont étéensemencées chacune avec 10.000 cellules marquées par l'un des trois marqueurs d'intérêt. Ces boîtes ont été observées quotidiennement pour noter l'intensité du marquage et le nombre de cellules encore marquées. Une de ces boîtes a été trypsinée tous les deux jours puis les cellules comptées pour identifier le nombre de doublement de population.

##### ***4.2.3.5.2 Expérience de recaptage (principe)***

Des cellules (1x10<sup>6</sup> cellules / boîtes) préalablement marquées avec l'un des trois marqueurs ont été détruites par choc thermique intense : trois cycles d'expositions à -160°C puis à 90°C en quelques minutes. Ces cellules mortes ont ensuite été déversées sur des boîtes de Pétri contenant des cellules vivantes sans marquage préalable (1x10<sup>5</sup> cellules / boîte). Les cellules ont ensuite été observées à 2h, et 48h pour l'intensité de marquage par recaptage.

#### **4.2.3.6 Contrôle du marquage avant greffe cellulaire**

Un contrôle du marquage en terme de qualité colorimétrique et de pourcentage de marquage a été systématiquement réalisé avant la greffe cellulaire. Un prélèvement a été effectué sur la préparation de CSM juste avant leur utilisation pour la greffe et juste après leur marquage au laboratoire. Il est évalué comme suit :

Pour le marquage en fluorescence par le DiI, un étalement sur lame permet l'observation au microscope à fluorescence. Dix champs au grossissement X 400 ont été passés au crible. Les cellules marquées apparaissent en fluorescence rose quant aux cellules non marquées seul leur spectre est visible. On a pu ainsi déterminer le pourcentage de cellules souches mésenchymateuses marquées.

Pour le marquage au Brdu, un étalement sur lame permet la révélation en immunohistochimie et selon la même méthode nous avons déterminé le pourcentage de marquage.

#### **4.2.4 Modèle expérimental d'ischémie rénale**

##### **4.2.4.1 Caractéristiques de l'ischémie**

L'ischémie rénale a été réalisée de façon unilatérale. Elle était réversible et transitoire. Les brebis du groupe I ont subi 30 minutes d'ischémie et les brebis du groupe III 45 minutes.

##### **4.2.4.2 Technique de création de l'ischémie rénale à J0**

La brebis a été anesthésiée et placée en décubitus dorsal. Les zones cutanées du creux de l'aîne droit ou gauche ont été largement tondues et l'asepsie chirurgicale a été obtenue par lavages successifs à l'aide de désinfectants à base de povidone iodine (Bétadine®).

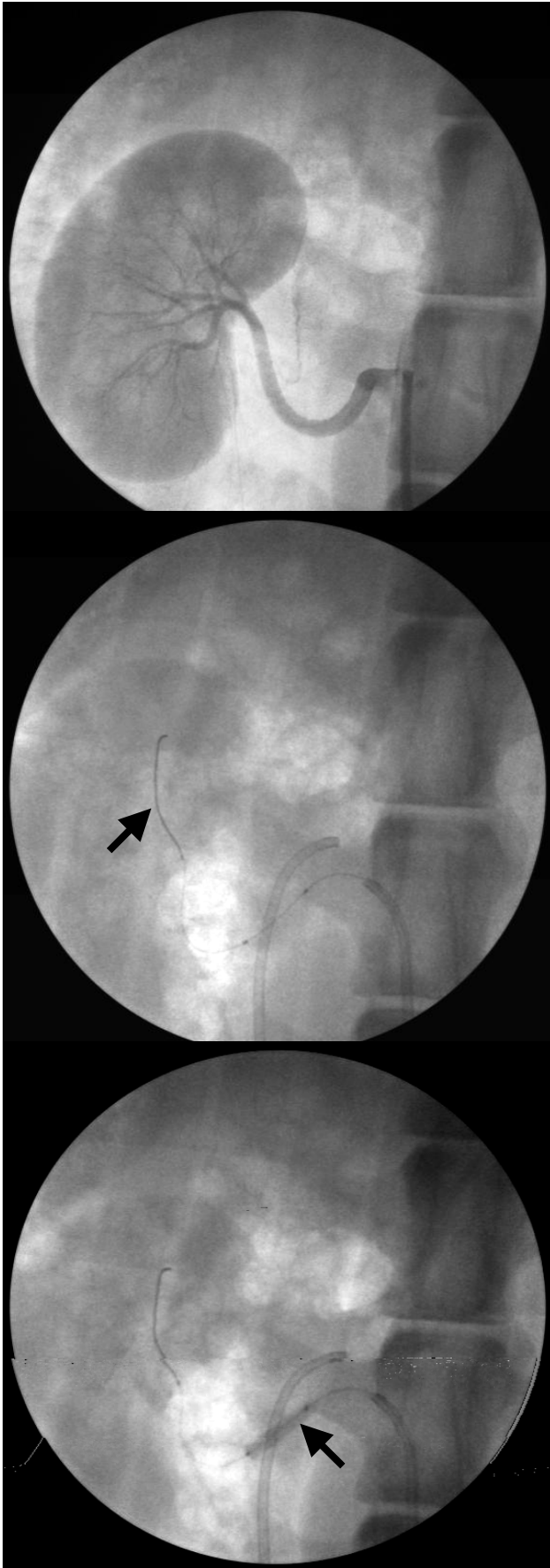
Un seul rein a subi une ischémie.

Un cathéter percutané (Set d'introduction percutanée de cathéter, diamètre 7F / 2,3 mm, longueur 11 cm, INPUT MEDTRONIC AVE®) a été placé dans l'artère et dans la veine fémorales. L'animal a reçu un traitement anticoagulant à la posologie de 0,5 mg / kg d'héparine (Héparine Choay, Choay®) par .725 TD020 de 0,5 mg / kg ie. tion85.9 'intrla coniqueuUn é'introduitjusique

Nous avons ensuite placé un guide (diamètre 0,014''(0,36mm), longueur 190 cm, sparta/core 14 guide wire GUIDANT®) le long du cathéter guide artériel jusque dans les ramifications de l'artère rénale au sein du parenchyme (cf. figure 3). Enfin, nous avons chargé un cathéter à ballonnet (cathéter de dilatation à ballonnet à échange rapide, longueur du cathéter 139 cm, diamètre du ballon 4,0 mm ; longueur du ballon 20 mm ; pression d'insufflation 12 atm ; compatible avec un guide de 0,014 (0,36 mm) Medtronic® AVE) sur le guide. Le ballon a été placé proximale dans l'artère rénale et gonflé à l'aide d'un mélange équivolumique de Télébrix® et de NaCl (cf. figure 4). Le ballon a été maintenu gonflé à une pression optimale de 12 atmosphères à l'aide d'un insufflateur à manomètre. Une injection de liquide de contraste dans l'artère rénale en amont du ballonnet a permis de contrôler l'efficacité de l'occlusion. Le flux sanguin a été ainsi interrompu pendant 30 ou 45 minutes jusqu'au retrait du ballonnet. Un contrôle angiographique a permis en fin d'intervention de s'assurer du retour du flux sanguin dans l'artère rénale.

De la même façon, un cathéter thermoformé par l'opérateur (sur la base d'un cathéter type JR 4 Vistabritetip® CORDIS®) a été placé dans la veine rénale. Le cathéter veineux a permis la prise de sang pour le dosage de l'activité rénine plasmatique dans la veine rénale du rein ischémié.

Les cathéters et introducteurs ont été retirés et un point de compression artériel et veineux a été appliqué pendant 10 minutes aux zones de ponction afin d'éviter les hémorragies post opératoires.



**Figure 2 :** Artériographie rénale réalisée systématiquement sur chaque brebis à J0, J15 et au sacrifice. Le rein de brebis est unilobé et l'arborisation artérielle est de type terminale. Cliché cinéangiographique.

**Figure 3 :** Mise en place du guide métallique (flèche noire) jusque dans l'arborisation artérielle terminale au sein du parenchyme rénal. Cliché cinéangiographique.

**Figure 4 :** Mise en place du cathéter à ballonnet le long du guide métallique jusque dans l'artère rénale principale, le ballon est gonflé à l'aide d'un mélange de NaCl 0,9% et de Télébrix® qui souligne son contour (flèche noire). Cliché cinéangiographique.

#### **4.2.5 Technique d'injection des CSM dans l'artère rénale à J15**

La brebis a été anesthésiée et placée en décubitus dorsal. Les zones cutanées du creux de l'aîne droit et gauche ont été largement tondues et l'asepsie chirurgicale a été obtenue par lavages successifs à l'aide de désinfectants à base de povidone iodine (Bétadine®).

Un seul rein a été greffé. Pour les animaux du groupe I et III c'est le rein ischémié, pour les animaux du groupe II c'est un rein au hasard.

Un cathéter percutané (Set d'introduction percutanée de cathéter, diamètre 7F / 2,3 mm, longueur 11 cm, INPUT MEDTRONIC AVE®) a été placé par voie percutanée dans l'artère fémorale. L'animal a reçu un traitement anticoagulant à la posologie de 0,5 mg / kg d'héparine (Héparine Choay, Choay®) par injection intra veineuse. Sous contrôle radioscopique un cathéter guide (diamètre 6F / 2,0 mm, 100 cm, type Jodkins Right 4, JR 4 Vistabritetip® CORDIS®) a été introduit jusque dans l'artère rénale. Un contrôle angiographique a été réalisé à l'aide d'une injection de 3 ml de produit de contraste radio opaque (Télébrix®) pour confirmer la perméabilité de l'artère rénale. Le cathéter guide a été alors rincé à l'aide de 20 ml de NaCl 0,9% pour éliminer les dépôts de liquide de contraste.

Après préparation des CSM marquées au BrDU (5-bromo-2'-désoxyuridine) et au cmDiI (Chlorométhylbenzamido-dérivée du DiI), elles ont été mises en suspension dans 10 ml de PBS. L'homogénéisat cellulaire a été alors prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml et d'une aiguille de 18 gauges et injecté en respectant un temps d'injection de 2 minutes. Le cathéter guide a été à nouveau rincé une deuxième fois à l'aide de NaCl 0,9% pour le laver de son volume mort et ainsi terminer l'injection cellulaire. Le cathéter guide et l'introducteur ont été retirés et un point de compression artérielle a été appliqué pendant 10 min sur la zone de ponction afin d'éviter une hémorragie post opératoire.

L'animal n'a subi aucun traitement particulier en post opératoire.

#### **4.2.6 Technique d'injection intraparenchymateuse des CSM à J15**

A J15 l'animal a été anesthésié et placé en décubitus latéral gauche. Une préparation chirurgicale de la zone située caudalement au cercle de l'hypochondre, à un travers de main

ventralement à la colonne vertébrale (zone de projection du rein droit chez la brebis) a été effectuée. Une incision cutanée de 15 cm dans le sens crânio-caudal a été réalisée pour atteindre le rein par voie rétro péritonéale. La visualisation de la profondeur d'injection a été obtenue grâce à l'échographie (sonde FLA 7,5 mgH sur échographe System Five® General Electric®). Trois sites d'injection ont été déterminés à la surface du rein, aux deux extrémités et au centre, repérés par des points de suture au Prolène 5-0. L'injection cellulaire a été réalisée à l'aide d'une seringue de 10 ml et une aiguille de 27 gauges. Dix injections d'un volume de 0,2 ml ont été réalisées autour des points de repère.

L'animal a été euthanasié à J35. Ses reins ont été prélevés et analysés en anatomopathologie au niveau des sites d'injection et à distance.

#### **4.2.7 Sacrifice, prélèvement des animaux**

Au terme du délai de survie après la greffe cellulaire (cf. figure 1), les animaux ont été anesthésiés. Une artériographie de contrôle a permis avant l'euthanasie de vérifier la perméabilité de l'artère rénale.

Les animaux ont alors été sacrifiés par une injection de pentobarbital sodique (Doléthal® Vétoquinol®) à la dose de 60 mg / kg / IV. Une fois l'animal mort, les reins ont été prélevés par une laparotomie médiane sus ombilicale.

#### **4.2.8 Traitement des reins prélevés**

##### **4.2.8.1 Evaluation macroscopique**

Les reins ont tout d'abord été évalués macroscopiquement :

- Poids.
- Aspect externe : évaluation des lésions visibles à l'œil nu.
- Aspect interne : évaluation des lésions visibles à l'œil nu.

#### **4.2.8.2 Evaluation microscopique**

Afin de réaliser l'évaluation microscopique chaque rein a été découpé en fragments d'environ 3 cm<sup>3</sup>. Une série de fragments a été fixée dans du formol / PBS à 3,5% pendant 24h puis rincée à l'alcool et incluse en paraffine. Une deuxième série de fragments a été congelée dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide, et conservée au congélateur à -80°C. De même des fragments de rein controlatéral, de rate, de poumon et de foie ont été congelés pour évaluer un éventuel ensemencement par les CSM injectées.

##### ***4.2.8.2.1 Evaluation microscopique des lésions d'ischémie rénale***

Différentes colorations tissulaires ont été réalisées

- Hématoxiline, Eosine, Safran : coloration classique en anatomopathologie pour observer toutes les structures rénales.
- Trichrome Masson : qui met en évidence la fibrose tissulaire
- PAS : qui met en évidence la hyalinose (stade précoce de la fibrose)

##### ***4.2.8.2.2 Repérage : évaluation microscopique de l'ensemencement du parenchyme rénal par les CSM injectées***

###### **Evaluation en coupe congelée :**

Les coupes congelées ont été observées au microscope à fluorescence (LN Leïka®) pour révéler la fluorescence du cmDiI contenu dans les cellules greffées. Les lames sont soumises à une fluorescence verte (longueur d'onde = 570 nm) qui fait apparaître le cmDiI en rouge. Ainsi il a été possible de déterminer dans quelles structures rénales les CSM étaient présentes. Un comptage des différentes localisations cellulaires a été effectué par deux opérateurs en observant 10 champs par lame, grossissement X 200, sur trois lames. La moyenne de ces comptages a permis de déterminer quel pourcentage des différentes structures a été ensemencé par les CSM. Les deux reins ont été ainsi évalués.



### **Evaluation sur coupes en paraffine :**

Les coupes en paraffine ont permis une évaluation structurelle plus fine de la localisation et du devenir des CSM. Le BrdU contenu dans les CSM greffées a été révélé en immunohistochimie soit en phosphatase alcaline (coloration rouge) soit en peroxydase (coloration brune) (Méthode automatisée type VENTANA® : Kit de révélation Ventana iVIEW DAB DTECTION KIT® Ventana Medical Systems, Inc.®) Le repérage a donc été double.

#### ***4.2.8.2.3 Identification cellulaire***

Le double marquage immunohistochimique combinant le BrdU et des marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires rénales a permis de déterminer quelles différenciations cellulaires ont subi les CSM greffées. Trois marqueurs spécifiques ont été utilisés, la pancytokératine spécifique des podocytes, la vimentine spécifique des cellules mésangiales et la desmine spécifique des cellules glomérulaires (Bariety, Nochy et al. 1998; Bariety, Bruneval et al. 2001; Imai and Ito 2002). Méthode automatisée type VENTANA®.

### **4.2.9 Traitement des prélèvements sanguins**

#### **4.2.9.1 Réalisation des dosages d'urée et de créatinine plasmatique**

Trois prélèvements sanguins ont été réalisés sur chaque animal en vue du dosage de l'urée et de la créatinine plasmatique. Les prélèvements ont été obtenus par ponction de la veine jugulaire à J0 avant l'occlusion de l'artère rénale, à J15 au moment de la greffe cellulaire, et au moment du sacrifice. Quatre ml de sang total sur tube hépariné ont été envoyés au laboratoire pour analyse de routine.

#### **4.2.9.2 Réalisation des dosages de l'activité rénine plasmatique (ARP)**

Deux prélèvements sanguins ont été réalisés en vue du dosage de l'ARP. Au moment de l'intervention chirurgicale à J0 juste avant le gonflage du cathéter à ballonnet dans l'artère rénale, et juste après le retrait de celui-ci. La prise de sang a été effectuée dans la veine rénale du rein ischémié. Quatre mL de sang ont été transférés sur tube EDTA, et centrifugés à 3000 tours / min pendant 5 min. Le plasma récupéré a été transféré dans des tubes Ependorf® congelés à -20°C jusqu'au jour du dosage. Le dosage a été réalisé en routine au laboratoire par une méthode RIA.

#### **4.2.10 Méthode statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne (moy)  $\pm$  déviation standard (DS). Les comparaisons des résultats des différents groupes ont été réalisées en utilisant l'analyse de la variance ANOVA, logiciel « STAT VIEW » sur MACINTOSH. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTATS

### **5.1 Modèle d'ischémie rénale**

Tous les animaux ont survécu en bon état général jusqu'à la fin prévue de leur protocole. Aucune déviation majeure du protocole n'est survenue.

Deux complications liées à la pose de cathéter jugulaire pour la perfusion ont nécessité une trachéotomie d'urgence. En effet, suite à la transfixion de la veine jugulaire par le cathéter de perfusion intra veineuse une collection de NaCl a comprimé localement la région laryngée, diminuant le drainage veineux de la tête, ce qui a engendrer une dyspnée sévère au réveil nécessitant la pose d'une sonde de trachéotomie pour 48h en post-opératoire. Les animaux n'ont gardé aucune séquelle de cet accident.

#### **5.1.1 Résultats des dosages d'urée et de créatinine plasmatique.**

Les résultats restent dans l'intervalle physiologique. Les moyennes et déviations standard sont exposées dans les figures 5 et 6.

Les résultats du dosage de créatinine plasmatiques sont eux aussi sont dans les normes physiologiques. Les moyennes et déviations standard sont exposées dans les figures 7 et 8.

Résultats du dosage de l'urée plasmatique des groupe I,II,III en fonction du temps.				
		J0	J15	SACRIFICE
groupe I survie 3 semaines après greffe	moy	10,16	9,52	9,08
	DS	2,68	1,45	1,40
groupe II non ischémié survie 3 semaines après greffe	moy	11,23	8,67	9,13
	DS	1,91	1,30	1,89
groupe III ischémié survie 6 semaines après greffe	moy	11,70	12,08	11,76
	DS	1,97	2,72	1,98

Figure 5

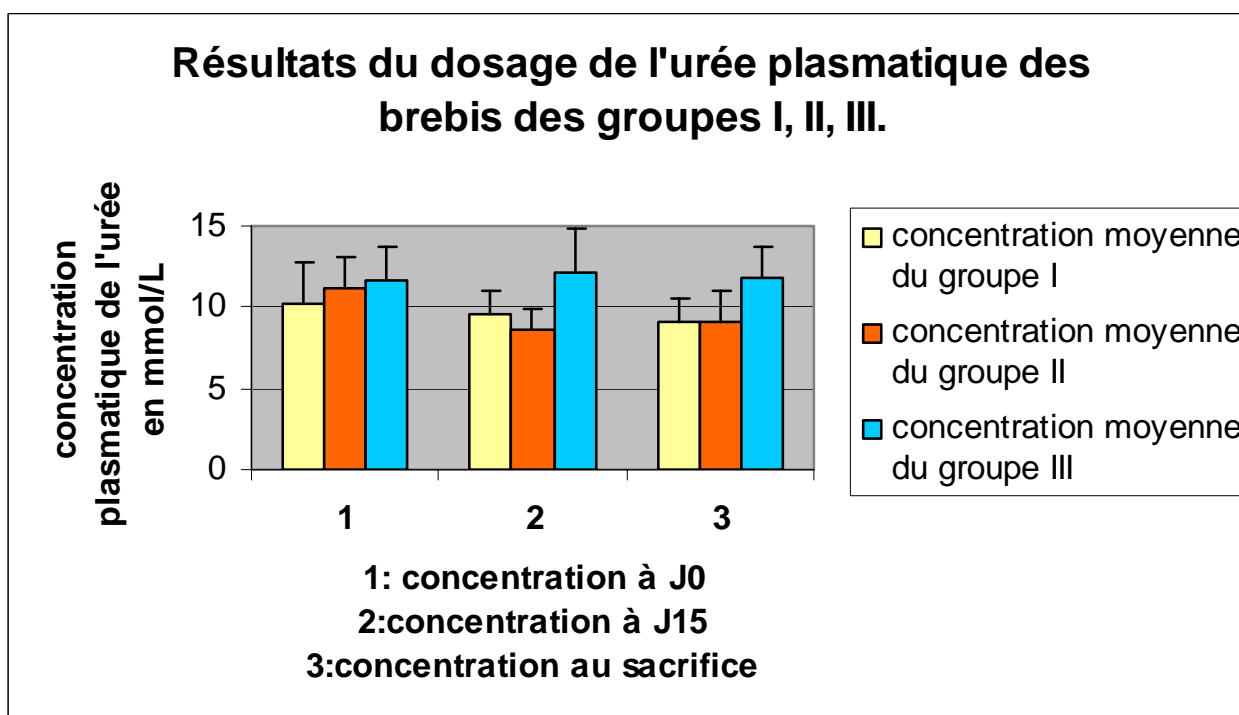


Figure 6

Résultats du dosage de la créatinine plasmatique des groupes I, II, III en micromol / L				
		J0	J15	SACRIFICE
groupe I ischémié survie 3 semaines après greffe	moy	83,40	93,00	84,00
	DS	25,74	23,03	24,26
groupe II non ischémié survie 3 semaines après greffe	moy	74,00	77,67	78,67
	DS	7,00	1,53	8,62
Groupe III ischémié survie 6 semaines après greffe	moy	76,00	74,00	79,40
	DS	11,38	15,18	9,32

Figure 7

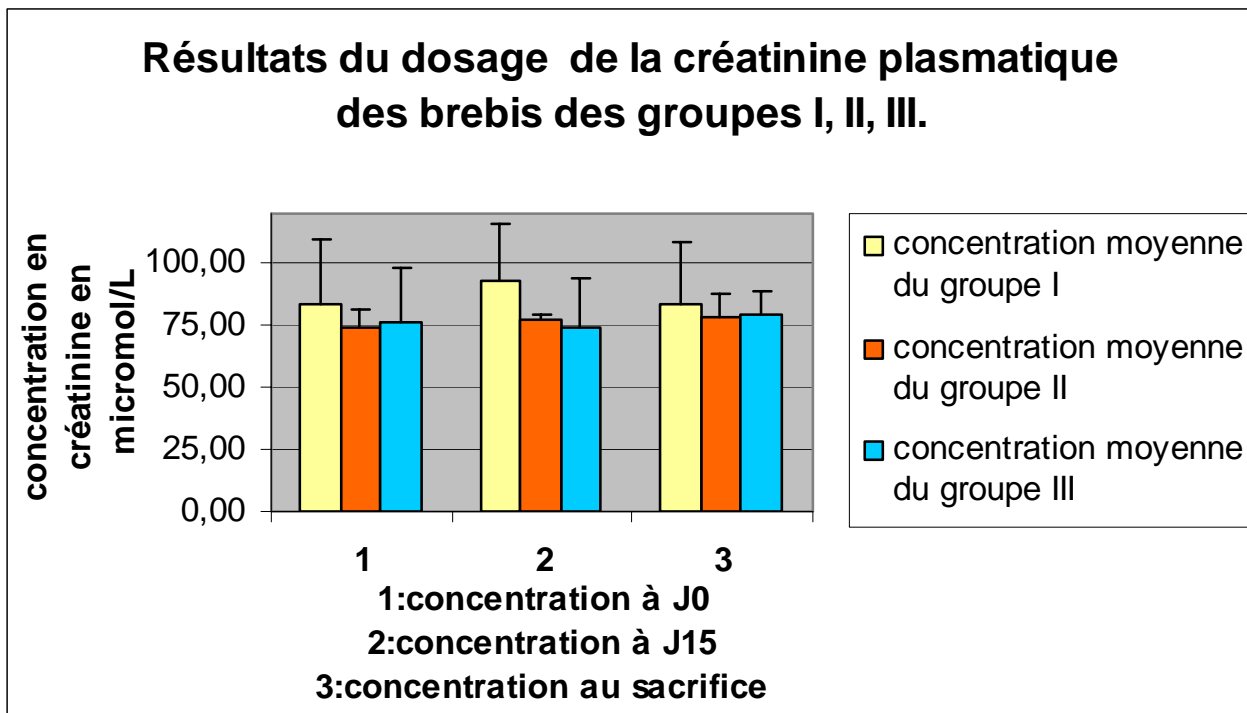


Figure 8

### 5.1.2 Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique.

L'ARP a été évaluée juste avant et après l'occlusion de l'artère rénale à J0 par prélèvement sanguin dans la veine rénale. Les résultats des groupes I (cf. figure 9) et III (cf. figure 10) montrent une augmentation systématique des valeurs de l'ARP (sauf pour une brebis du groupe I) après l'ischémie rénale à J0. Le groupe témoin ne révèle pas d'augmentation.

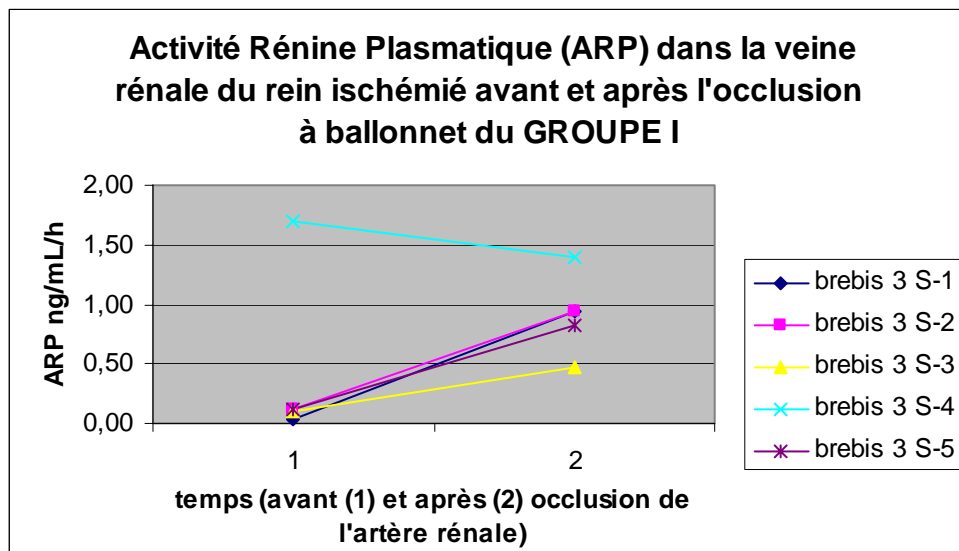


Figure 9

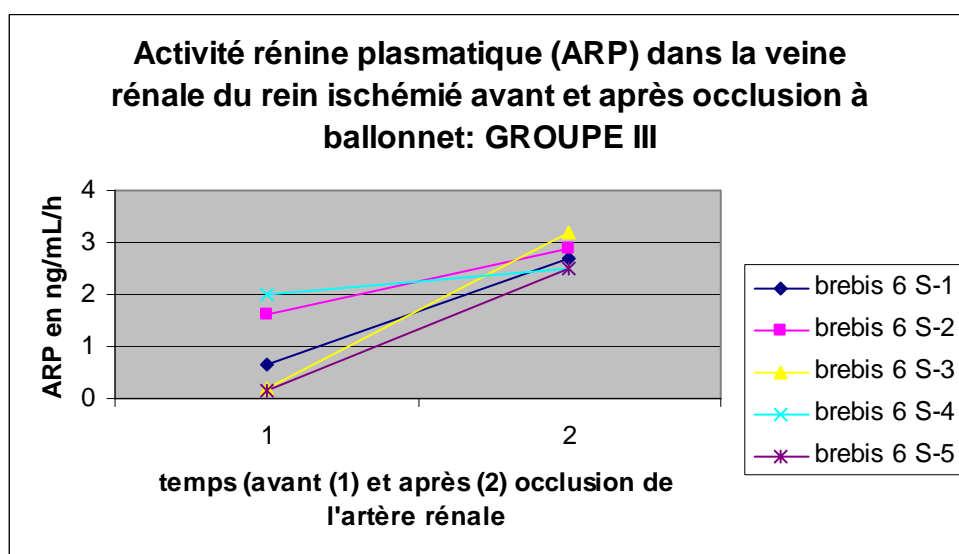


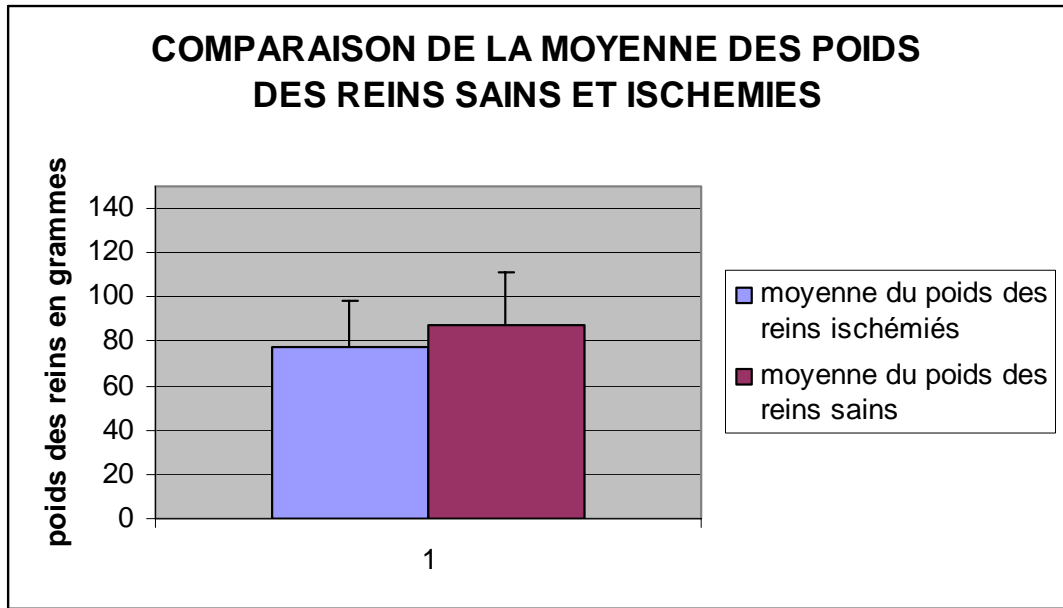
Figure 10

### **5.1.3 Résultats de l'évaluation anatomopathologique des lésions rénales.**

L'étude macroscopique des reins n'a révélé d'anomalie que lorsque les lésions de nécrose étaient massives : un rein atrophié et fibrosé a été découvert et quelques reins ischémiés ont présenté des foyers d'infarctus sous capsulaires visibles à l'œil nu. Le poids des reins ischémiés (moyenne du poids des reins ischémiés = 77,22 g ( $\pm$  20,67)) était systématiquement inférieur à celui des reins sains (moyenne du poids des reins sains = 87,53 g ( $\pm$  24,14)) (cf. figure 11), la différence n'était pas significative au seuil de 5%. Une brebis du groupe III qui a présenté une atrophie sévère du rein ischémié a également présenté un rein controlatéral hypertrophié ; poids du rein ischémié égal à 35g contre 145g pour le poids du rein non ischémié (cf. figure 12).

L'étude microscopique des lésions induites par l'ischémie a confirmé l'atteinte rénale. En effet les groupes I et III ayant subi une ischémie rénale unilatérale ont présenté des lésions significatives sur le rein en question. Le groupe I a présenté moins de lésions que le groupe III. L'analyse des reins du groupe témoin (groupe II) n'a révélé aucune anomalie.

Deux types de lésions microscopiques ont été observées : des lésions inflammatoires modérées avec infiltration par des neutrophiles et des lésions de nécrose avec destruction du parenchyme rénal et remplacement par de la fibrose (cf. figures 13 et 14). Les lésions rénales dans le groupe I étaient hétérogènes avec plus ou moins de gravité dans les lésions de nécrose. Les lésions du groupe III étaient plus homogènes avec la présence systématique de foyers de nécrose étendus. Les reins controlatéraux non ischémiés des groupes I et III n'ont pas révélé d'anomalie sauf dans un cas d'hypertrophie compensatrice évoquée ci-dessus.

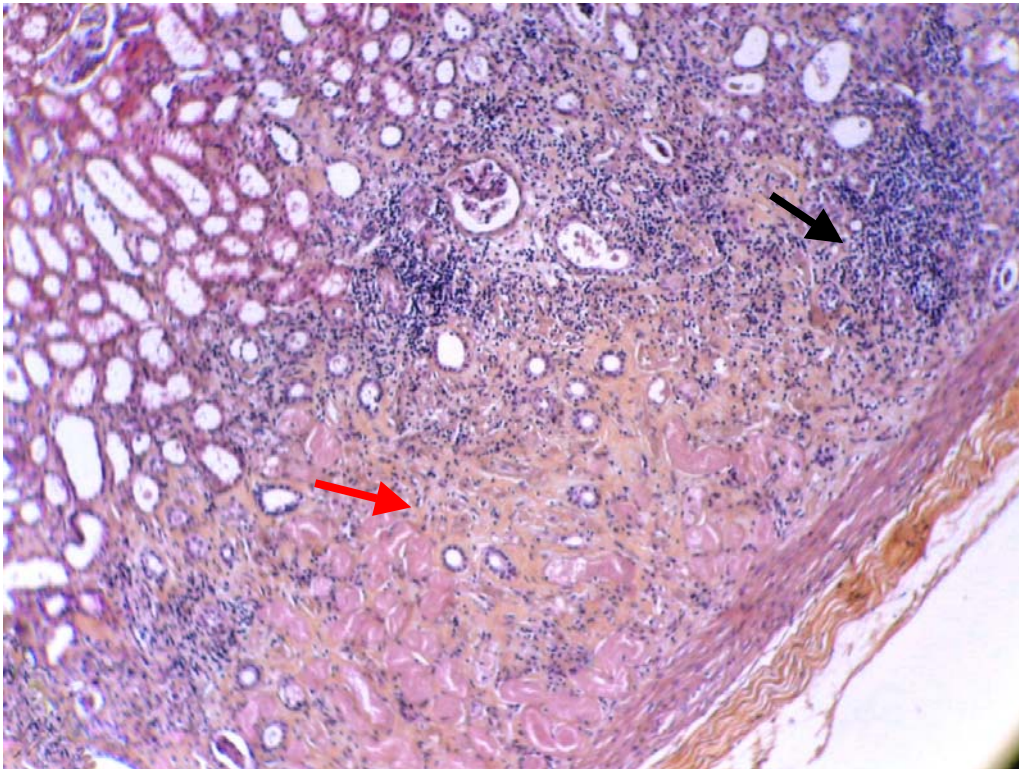


**Figure 11**

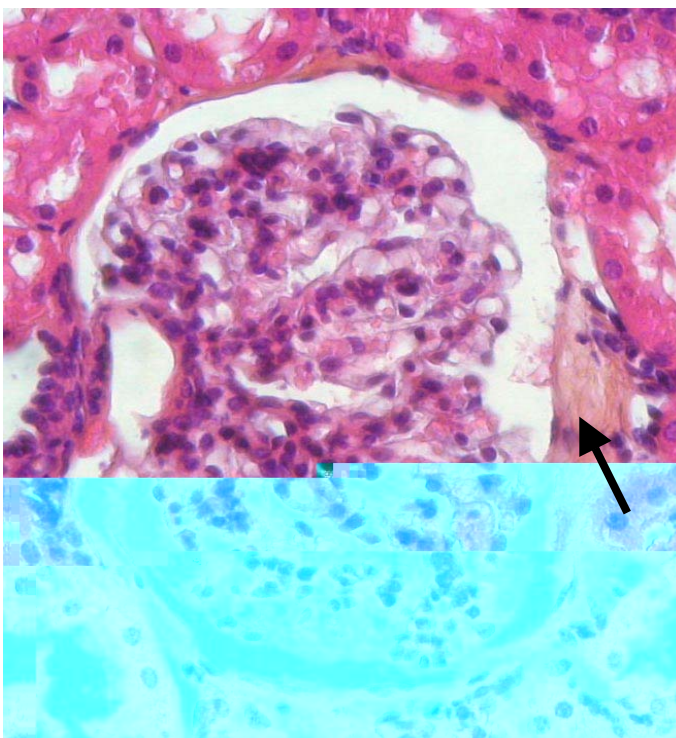


**Figure 12** : photo des reins de la brebis du groupe III ayant présenté une atrophie sévère du rein ischémié (rein de gauche) et une hypertrophie compensatrice du rein contro-latéral (rein de droite).





**Figure 13** : Lésion d'infarctus rénal (conséquence de l'ischémie rénale) sur une coupe de rein de brebis du groupe III. Une zone sous corticale présente une profonde modification de l'architecture rénale, entourée d'une marge de cellules inflammatoires (flèche noire). Cette zone contient des dépôts de collagène importants (flèche rouge) signant une fibrose avancée. Coloration HES. Observation au microscope grossissement X 100.



**Figure 14** : Lésions glomérulaires sur le rein d'une brebis du groupe I avec hypercellularité au sein de la touffe glomérulaire (conséquence de l'ischémie rénale). Un dépôt collagénique (flèche noire) sous la capsule de Bowmann indique une fibrose rénale débutante. Coloration Trichrome Masson. Grossissement X 400 (+ zoom numérique).

## 5.2 Culture et marquage cellulaire

### 5.2.1 Culture cellulaire

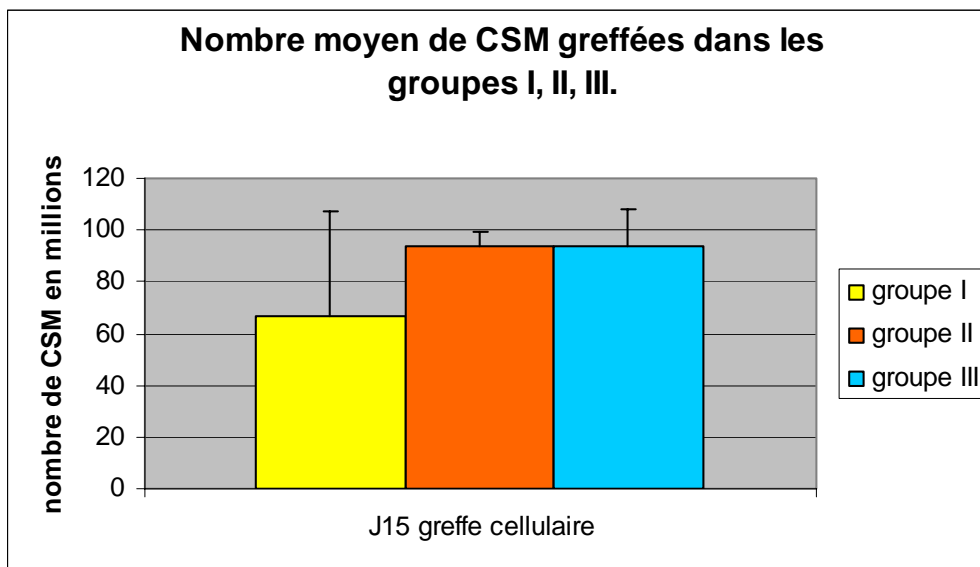
Le temps de culture avant greffe cellulaire a été de 15,5 jours ( $\pm 1,8$  jours).

La multiplication des sites de prélèvement a été justifiée par :

- L'hétérogénéité de la richesse en CSM des prélèvements.
- Le raccourcissement du délai d'amplification cellulaire, car quatre cultures ont été menées de front.

Le nombre de cellules obtenues a été variable en fonction des groupes.

Le groupe I a été greffé avec 66 millions ( $\pm 41$ ) de CSM en moyenne, le groupe II avec 94 millions ( $\pm 5,9$ ) et le groupe III avec 94 millions ( $\pm 14,3$ ) (cf. figure 15).



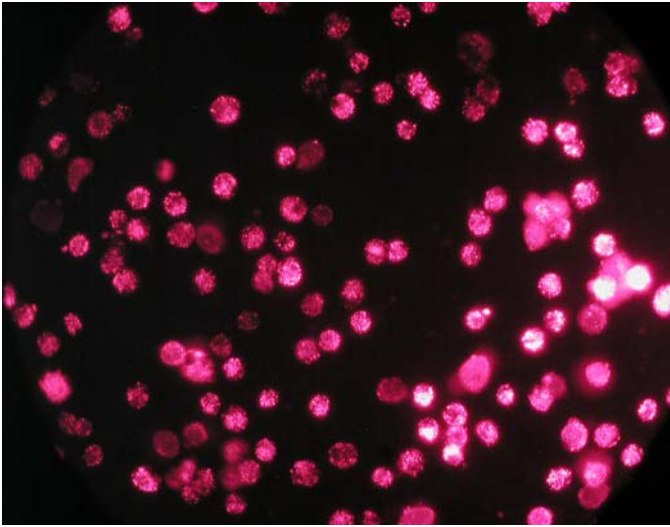
**Figure 15**

## **5.2.2 Le marquage cellulaire**

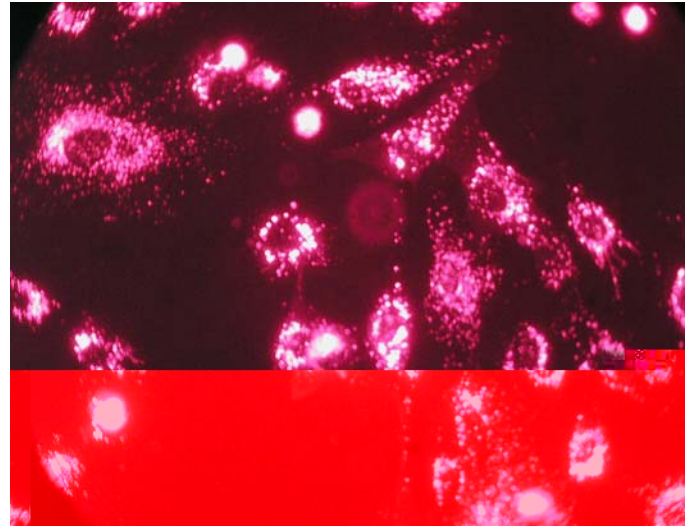
### **5.2.2.1 Résultats du contrôle du marquage des cellules avant greffe**

Le contrôle systématique du pourcentage de cellules marquées en culture juste avant la greffe a permis de s'assurer de la qualité du marquage (cf. figure 16, 17, 18). Ainsi le marquage par le cmDiI et par le BrdU ont montré une efficacité de marquage à plus de 95%. La qualité en terme d'intensité de marquage a été très satisfaisante permettant le repérage cellulaire ultérieurement.

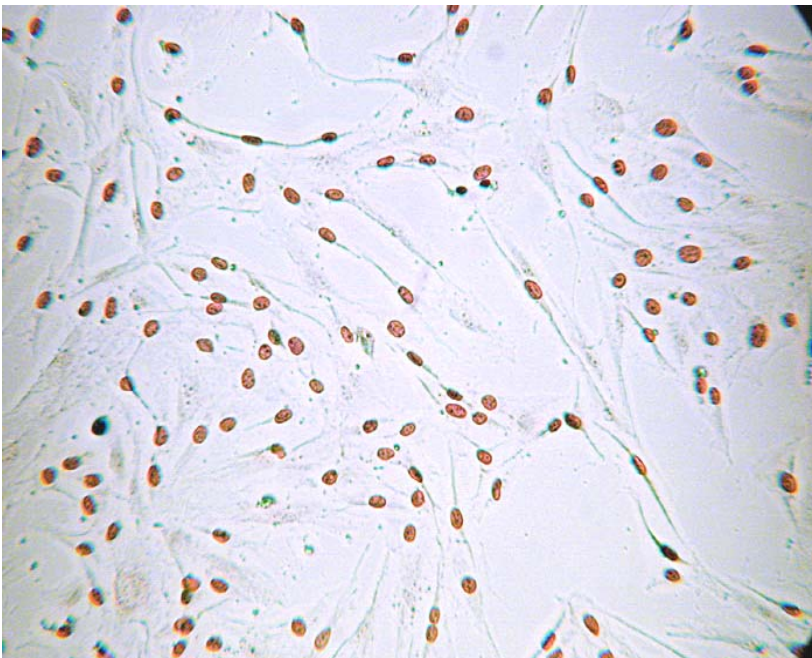




**Figure 16 :** Contrôle du marquage des CSM par le cmDiI juste avant la greffe. Les cellules sont en suspension sur une lame, leur silhouette est alors ronde. Le pourcentage de cellules marquées atteint presque 100%. Observation au microscope à fluorescence. X 200.



**Figure 17 :** Contrôle du marquage des CSM par le cmDiI 1 jour après la greffe. Un échantillon des CSM greffées a été remis en milieu de culture où les CSM adhèrent au support prenant alors une forme allongée. Le pourcentage de cellules marquées atteint presque 100%. Observation au microscope à fluorescence. X 400.



**Figure 18 :** Contrôle du marquage des CSM par le BrdU 1 jour après la greffe. Un échantillon des CSM greffées a été remis en culture. La coloration brune (révélation en peroxydase) des noyaux a été obtenue en immunohistochimie. Observation au microscope grossissement X 200.

### 5.2.2.2 Expérience de dilution

On a pu observer que 90% des cellules marquées au cmDiI ou au BrdU l'étaient encore après 5 divisions alors que 0% des cellules marquées au DAPI l'était encore après 3 divisions. Le BrdU ainsi que le cmDiI ont démontré leur présence après 7 à 10 divisions. Ce nombre de doublements de populations est considérable : 10 doublements de populations déterminent le passage de 50 milles à 50 millions de cellules (cf. figure 19). En d'autres termes, le BrdU et le cmDiI permettent de suivre à moyen terme le destin des cellules greffées. En revanche, le DAPI est le marqueur le moins performant en terme de durabilité sur une population cellulaire en division.

Type de marqueur	Nombre de divisions	Pourcentage de cellules marquées
cmDiI	5	90%
	10	10%
DAPI	3	0%
	Expérience interrompue	Expérience interrompue
BrdU	5	90%
	7	30%

**Figure 19 :** Résultats de l'expérience de dilution des marqueurs

### 5.2.2.3 Expérience de recaptage

Les expériences *in vitro* ont démontré que le recaptage par les cellules résidentes était très important avec le DAPI mais quasi inexistant avec le cmDiI et le BrdU (cf. figure 20).

Type de marqueur	après 2 heures de contact	après 48 heures de contact
<b>CmDiI</b>	0 cellules résidentes marquées	Quelques cellules résidentes marquées
<b>DAPI</b>	Quelques cellules résidentes marquées	100% de marquage des cellules résidentes
<b>BrdU</b>	0 cellules résidentes marquées	Quelques cellules résidentes marquées

**Figure 20** : résultats de l'expérience *in vitro* de recaptage des marqueurs chimiques libérés sur une population cellulaire non marquée à 2h et 48h.

### **5.3 Résultats de la greffe cellulaire**

#### **5.3.1 Résultats de la méthode de greffe par voie intra artérielle**

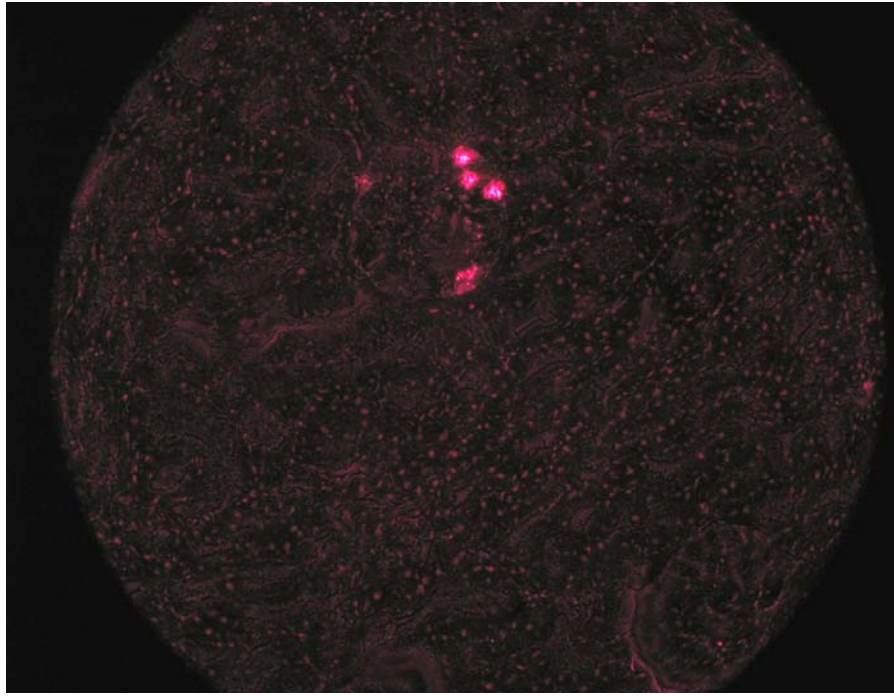
##### **5.3.1.1 Repérage des cellules**

Le marquage par le BrdU et le cmDiI a permis de repérer les CSM. Elles ont été retrouvées dans différentes structures rénales en plus ou moins grand nombre en fonction des groupes.

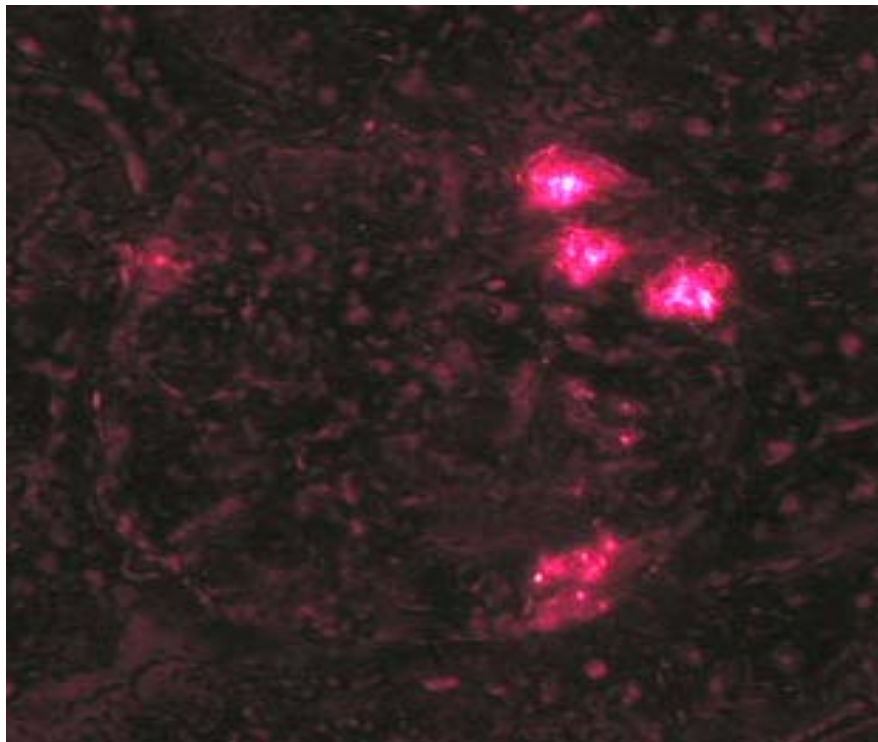
Pour tous les groupes, les CSM ont principalement colonisé les glomérules alors qu'on retrouve moins de cellules dans les tubules. Chaque glomérule colonisé contenait en moyenne 2 à 3 cellules marquées (cf. figure 21, 22).

Le comptage des glomérules marqués par la présence d'au moins une CSM a permis d'évaluer le pourcentage d'ensemencement par les CSM (cf. figure 23). Pour le groupe II (témoin) 32% (DS=2,3) des glomérules présentent des CSM marquées, pour le groupe I (ischémie et survie à 3 semaines après greffe) 39,6% (DS=14,3) des glomérules ont capté des CSM marquées et pour le groupe III (ischémie et survie à 6 semaines après greffe) 55,8%

( $\pm 7,8$ ) des glomérules ont capté des CSM marquées par le DiI. La différence d'ensemencement par les CSM est statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) entre les groupes I et III, et entre les groupes II et III.

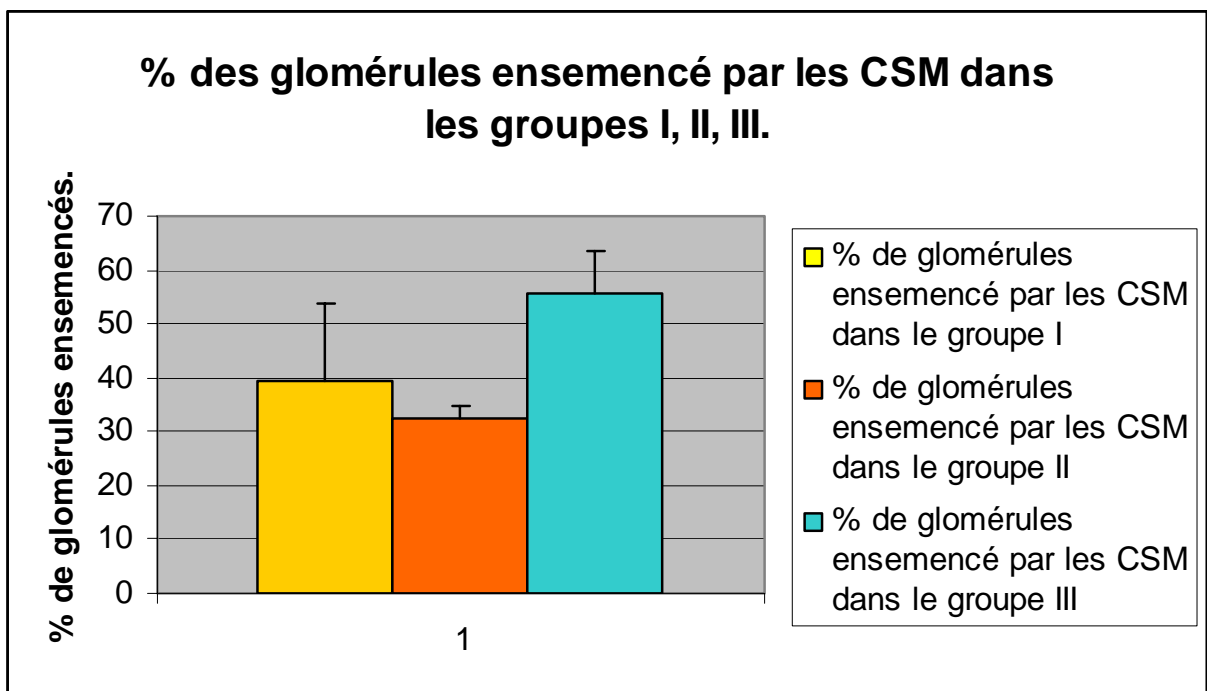


**Figure 21** : Révélation de la fluorescence du cm-DiI, repérage des CSM marquées pour comptage de l'ensemencement du parenchyme rénal. On note un glomérule positif et un glomérule négatif. Observation au microscope à fluorescence. X 400.



**Figure 22** : Détail de la figure 21 qui montre que le glomérule contient au moins 4 CSM greffés. Observation au microscope à fluorescence. X 400 (+ zoom numérique).





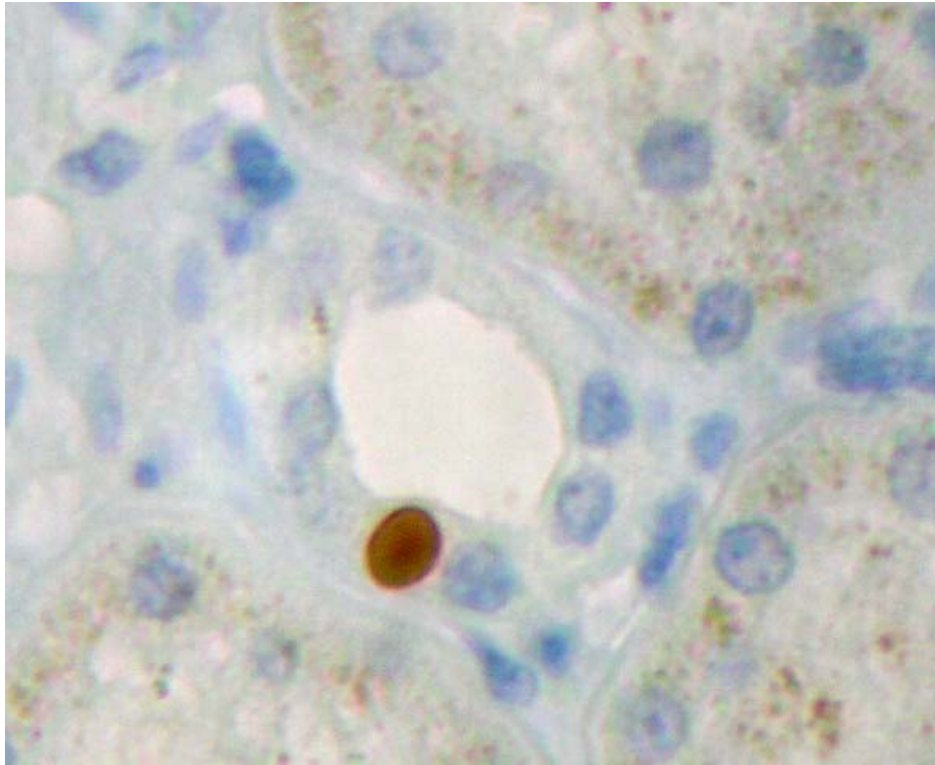
**Figure 23 :** Le pourcentage d'ensemencement du nombre de glomérules par les CSM est significativement différent entre les groupes I et III, de même entre les groupes II et III ( $p < 0,05$ )

### 5.3.1.2 Identification des cellules

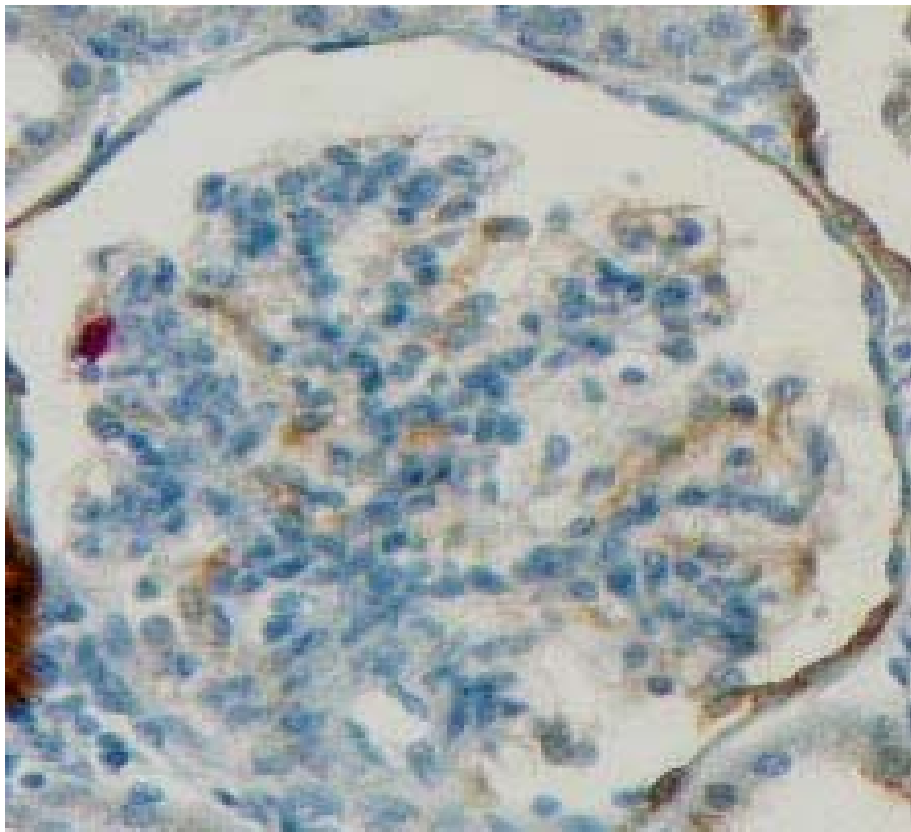
L'analyse histologique a permis de statuer sur la différenciation cellulaire « adoptée » par les cellules souches mésenchymateuses. Deux types de différenciation ont été observés :

- **Des cellules dans les tubules :** la localisation et la morphologie des cellules retrouvées marquées au sein des tubules les classent dans la famille des cellules épithéliales tubulaires, principalement du tube distal (cf. figure 24).
- **Des cellules dans les glomérules :** la localisation en périphérie de la touffe glomérulaire, la morphologie du cytoplasme émettant des pseudopodes et la positivité en double marquage BrdU / Pancytokératine signe l'appartenance à la famille des podocytes (cf. figure 25).

Ainsi les deux voies de différenciation des CSM greffées montrent un lignage cellulaire épithélial.



**Figure 24** : CSM marquée au BrdU révélé en peroxydase (noyau marron) au sein d'un tubule distal. Il s'agit une cellule tubulaire épithéliale. X 400 (+ zoom numérique).



**Figure 25** : Glomérule montrant une CSM marquée au BrdU révélé en phosphatase alcaline (noyau rose) dont le cytoplasme exprime la pancytokératine (halo brun autour du noyau rose) : il s'agit d'un podocyte. X 400 (+ zoom numérique).

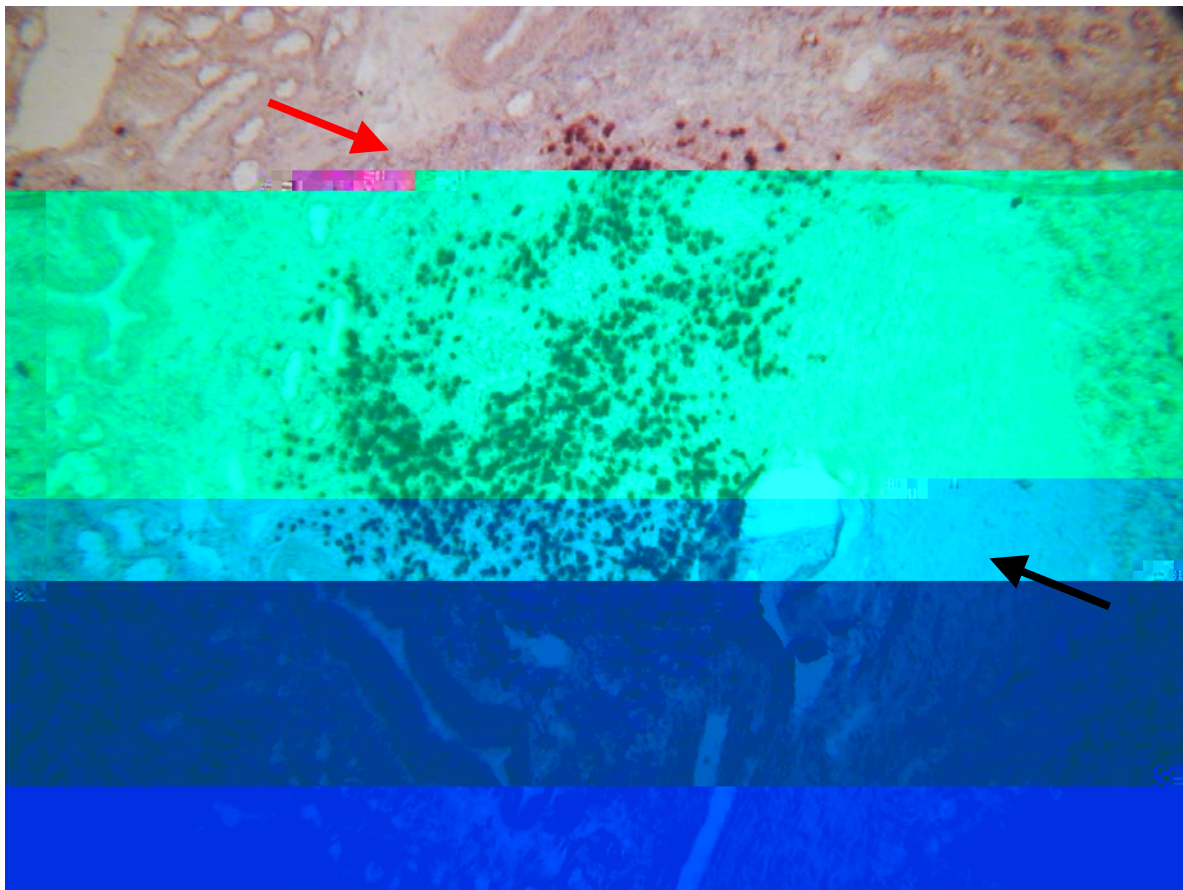
### **5.3.2 Résultats de la méthode de greffe par voie intra-parenchymateuse**

#### **Résultats de la technique.**

Un seul animal a subi cette méthode car dès la première expérience nous sont apparus les inconvénients de cette méthode. L'injection a été traumatisante pour l'organe comme l'ont montré les saignements importants au cours de l'expérience. Le liquide contenant les cellules fuit abondamment à la surface de l'organe.

#### **Les résultats de la greffe.**

Les images anatomopathologiques montrent bien la présence de CSM impactées très localement sur le site d'injection. Ces CSM sont entourées par une cohorte de cellules inflammatoires, elles ne sont intégrées à aucune structure identifiable (cf. figure 26). L'analyse à distance des sites d'injection ne montre pas de cellules marquées.



**Figure 26** : résultat de l'injection intraparenchymateuse des CSM. Révélation du BrdU en peroxydase les noyaux des CSM greffées sont marrons. Les cellules sont impactées dans une zone de nécrose tissulaire (flèche noire) entourée de cellules inflammatoires (flèche rouge). X 100.

## 6 DISCUSSION

### **6.1 Choix de la population des CS.**

Il existe plusieurs sources de cellules souches, elles sont toutes caractérisées par leurs capacités d'autorenouvellement, de différenciation et de prolifération en culture (van der Kooy and Weiss 2000; Watt and Hogan 2000). On distingue plusieurs types de cellules souches. Les **cellules souches totipotentes**, issues des premières divisions de l'œuf fécondé qui sont les seules à permettre le développement d'un individu complet. Les **cellules pluripotentes** ou cellules souches embryonnaires (ES) qui sont présentes jusqu'à un certain stade de division de l'embryon et ont pour vocation de former tous les tissus de l'organisme (plus de 200 types cellulaires). Enfin, les **cellules souches multipotentes** hébergées dans les tissus fœtaux ou adultes qui peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules. C'est sur les cellules souches multipotentes de l'adulte que nous avons décidé de travailler. En effet les cellules souches fœtales sont de part leur nature au centre d'une polémique éthique (Lenoir 2000) qui en rendra à terme l'utilisation clinique difficile.

De nombreux tissus adultes contiennent des cellules souches multipotentes. Certains organes (voire tous) contiendraient ces cellules quiescentes qui participeraient au turn over de régénération tissulaire physiologique de l'organe. La moelle osseuse reste le réservoir principal de cellules souches, non seulement les cellules souches hématopoïétiques qui engendrent les différentes lignées cellulaires sanguines mais aussi une population cellulaire identifiée comme cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle. C'est cette dernière population que nous avons cultivée, sélectionnée, et greffée. En effet de nombreuses études ont montré que ces cellules ont la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes (adipeuse, osseuse, cartilagineuse, musculaire cardiaque) (Pittenger, Mackay et al. 1999; Wang, Shum-Tim et al. 2001).

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle se différencient des CSH grâce à plusieurs critères. Leurs propriétés de culture in vitro : potentiel élevé de prolifération, adhérence au support et morphologie particulière (étalées sur le support de culture). A ce jour le phénotype précis de ces CSM de la moelle n'a pas été décrit même si certains auteurs comme Pittenger ont réussi à typer ces cellules par un ensemble de marqueurs de surface

spécifiques qui ne croisent pas avec les CSH. Les CSM sont positives pour les antigènes de surface SH2, SH3, CD29, CD 44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 (Pittenger, Mackay et al. 1999) et négatives pour des marqueurs de surface des CSH comme CD14, CD34 ou le CD45 spécifique des leukocytes.

Les CSM ont comme avantage d'être disponibles en grande quantité dans la moelle, faciles à cultiver et à amplifier permettant de bénéficier de tous les avantages de la greffe autologue. Leur utilisation clinique à terme en sera simplifiée.

Nous sommes partis du postulat que le rein est un organe d'origine principalement mésenchymateuse. Toutes les structures fonctionnelles du rein dérivent du mésenchyme sauf les tubes collecteurs qui dérivent du bourgeon urétéral lui-même issu du tissu épithélial. Le parenchyme rénal contient pourtant des cellules épithéliales comme les podocytes au sein du glomérule ou les cellules épithéliales des tubes contournés. L'origine de ces cellules épithéliales reste le mésenchyme. En effet certaines cellules mésenchymateuses acquièrent un phénotype épithélial après transdifférenciation cellulaire induite par l'action du bourgeon urétéral. Il était alors légitime de tester le pouvoir d'intégration des CSM aux structures rénales. Jusqu'alors aucun travail de ce type n'a été rapporté. En effet les précédentes études de thérapie cellulaire en néphrologie ont utilisé soit une greffe de moelle complète sans sélection préalable (Imasawa, Utsunomiya et al. 2001; Ito, Suzuki et al. 2001; Poulosom, Forbes et al. 2001; Yamagishi, Yokoo et al. 2001; Kale, Karihaloo et al. 2003) soit des cellules souches hématopoïétiques (Lin, Cordes et al. 2003) soit enfin ont étudié l'ensemencement d'un rein greffé (patients transplantés) par les cellules qualifiées d'« extra-rénales » du receveur (Poulosom, Forbes et al. 2001; Gupta, Verfaillie et al. 2002). Dans le premier cas les équipes ont rapporté une intégration des cellules greffées au parenchyme rénal et une différenciation en plusieurs types de cellules rénales. Mais l'absence de sélection sur la population cellulaire initiale rend impossible l'identification du lignage cellulaire, sont-ce les cellules souches hématopoïétiques ou les CSM qui ont ensemencé le rein et quelles cellules souches ont engendré quel lignage ? Dans le deuxième cas les CSH se sont également différenciées en cellules rénales (principalement en cellules tubulaires épithéliales). Dans le troisième cas l'origine des cellules n'est absolument pas connue si ce n'est qu'elles proviennent du milieu circulant du receveur du greffon rénal, la filiation cellulaire n'est alors pas possible. Le potentiel des CSM dans ce domaine restait donc à explorer.

## **6.2 La voie de greffe cellulaire**

Dans cette étude nous avons testé deux voies d'injection des CSM dans le rein : la voie intraparenchymateuse transcapsulaire après dissection et la voie intra artérielle directement dans l'artère rénale par voie percutanée. Ces deux techniques présentent des avantages et inconvénients dans leur faisabilité technique.

Les différentes voies de greffe cellulaire rapportées dans la littérature sont : **a)** les voies intravasculaires comme la voie intraveineuse périphérique (Ito, Suzuki et al. 2001) (veine caudale ou voie rétro orbitaire chez les rongeurs), la voie intra artérielle dans l'artère irriguant l'organe (Wang, Shum-Tim et al. 2001) (exemple de la voie intra coronaire en cardiomyoplastie cellulaire) **b)** la voie d'injection directe dans le parenchyme de l'organe concerné (en cardiomyoplastie cellulaire, l'injection peut se faire par voie endo ou épicaudique), **c)** la voie intrapéritonéale surtout utilisée chez les petits rongeur et dans le cadre d'étude sur le fœtus (Liechty, MacKenzie et al. 2000) ou **d)** l'apport de cellules sur un support pouvant servir de trame de soutien.

La voie intraparenchymateuse est inspirée des techniques d'injection intramyocardiques en cardiomyoplastie cellulaire (Qu, Balkir et al. 1998; Wang, Shum-Tim et al. 2000) utilisant soit la dissection soit un abord indirect percutané. Nous avons opté pour la dissection afin d'évaluer de visu la réussite de l'injection. Nous avons alors rapidement constaté des obstacles majeurs à la réalisation de cette méthode. En effet l'injection est traumatisante pour l'organe avec un saignement important qui non seulement entraîne un traumatisme du parenchyme rénal mais aussi charrie une partie des cellules injectées. Nous avons observé que juste avant l'afflux de sang sur le site d'injection c'est d'abord une remontée de liquide injecté qui s'opère en quantité non négligeable. Le problème de fuite cellulaire par le site d'injection est rapporté dans la thérapie cellulaire sur d'autres organes comme le cœur. En effet le myocarde est contractile et refoule les liquides injectés.

Par ailleurs, l'injection dans un organe solide tel que le rein correspond à un traumatisme pour les CSM greffées qui se trouvent confinées dans un espace restreint défini par le site d'injection qui va être le lieu d'une réponse inflammatoire importante (Qu, Balkir et al. 1998) et de fibrose cicatricielle locale. Les coupes anatomopathologiques sur le rein de l'animal ayant subi cette technique d'injection confirment ces craintes. La figure 26 montre que les CSM sont impactées très localement au centre d'une zone circonscrite par les cellules inflammatoires. Le rendement de cette technique en terme de survie cellulaire est faible. Qu et



son équipe (Qu, Balkir et al. 1998) ont travaillé sur la greffe de myoblastes dans le cadre du traitement de la Myopathie de Duchenne montrant un taux de mortalité cellulaire atteignant 95% dans certains cas par injection directe dans le muscle. Leur étude rapporte une amélioration de la survie cellulaire si les myoblastes sont modifiés génétiquement pour exprimer un inhibiteur de la cytokine inflammatoire IL-1, illustrant l'importance de la réponse inflammatoire locale dans le taux de survie cellulaire.

Le rein est un organe d'architecture complexe qui intègre de nombreuses entités fonctionnelles constituées de différentes populations cellulaires (le glomérule, les tubes contournés, les tubes collecteurs), injecter ces cellules localement ne permet pas d'atteindre toutes ces structures et la répartition cellulaire de la greffe n'est pas harmonieuse cf. figure 26. Cette méthode est certainement plus adaptée au cœur dans le cadre du traitement de l'infarctus du myocarde. On injecte alors les cellules dans le site lésé (CSM ou cellules musculaires satellites) au sein du myocarde constitué principalement de cellules musculaires cardiaques.

Ainsi nous avons très rapidement abandonné la voie d'injection intra parenchymateuse.

La voie intra artérielle rénale percutanée est issue des méthodes de cathétérisme vasculaire maîtrisées en pratique courante et donc facile à mettre en œuvre en application clinique. L'injection cellulaire lente dans l'artère rénale permet d'atteindre l'ensemble du parenchyme et donc toutes les structures. Les CSM greffées sont soumises à un stress minime puisqu'elles sont mises en circulation et la survie cellulaire devrait être meilleure que dans le cas de l'injection intra parenchymateuse même si cela n'a pas encore été évalué. Le rendement de ce type de greffe en terme d'ensemencement est mal connu. En effet, les cellules sont introduites dans la circulation rénale et toutes ne vont pas ensemer le rein, une grande partie sera lavée par le flot sanguin. Malgré tout, les CSM ont la capacité à passer la barrière vasculaire et à ensemer le rein. Ce phénomène de diapédèse cellulaire a été démontré aussi bien en cardiologie (Wang, Shum-Tim et al. 2001) qu'en néphrologie où toutes les études menées sur les greffes de CS sont réalisées par injection intraveineuse périphérique (Imasawa, Utsunomiya et al. 2001; Ito, Suzuki et al. 2001; Poulosom, Forbes et al. 2001; Gupta, Verfaillie et al. 2002; Kale, Karihaloo et al. 2003).

### **6.3 Choix des marqueurs**

Afin de tracer le devenir des CSM, nous avons choisi d'utiliser des marqueurs chimiques. Le marquage génétique (type GFP, sonde du chromosome Y) utilisé avec succès par certaines équipes (Horan, Melnicoff et al. 1990; Imasawa, Utsunomiya et al. 2001; Poulosom, Forbes et al. 2001) reste le traceur de choix car il est transmis à toute la descendance cellulaire (et seulement elle) avec une spécificité et une sensibilité optimales. Il est néanmoins difficile à utiliser (transfection virale) et coûteux (confinement élevé si la commission de génie génétique classe l'utilisation des cellules transgéniques en zone de confinement P2 ou P3). Ainsi nous avons sélectionné le cmDiI, le BrdU et le DAPI qui ont fait leurs preuves dans le domaine de la biologie cellulaire et la transplantation cellulaire (Fallon, Reid et al. 2000). Par souci de rigueur, nous avons testé les propriétés de ces trois marqueurs et avons éliminé le DAPI malgré une utilisation avec succès rapportée par certains auteurs (Wang, Shum-Tim et al. 2000). En effet il présentait *in vitro* un défaut de rémanence du marquage au cours des divisions cellulaires (risque de faux négatif) et un fort risque de fuite de fluorescence qui aurait pu engendrer un marquage des cellules résidentes du rein (risque de faux positif).

Le cmDiI et le BrdU sont des marqueurs membranaire pour l'un, et nucléaire pour l'autre, non toxiques pour les cellules et qui ne modifient pas l'ultra structure des organites cellulaires préservant l'intégrité de la cellule. Ils ont été utilisés avec succès dans de nombreuses études. Le contrôle du marquage cellulaire juste avant la greffe a démontré la qualité de ces marqueurs, la quasi-totalité des CSM sont marquées avec une intensité de coloration très satisfaisante. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par d'autres équipes (Horan, Melnicoff et al. 1990; Wang, Shum-Tim et al. 2000; Fukuhara, Tomita et al. 2002). Ces marqueurs ont confirmé leur fiabilité dans notre mise à l'épreuve *in vitro*. Leur rémanence après 5 à 10 divisions cellulaires a été confirmée et l'absence de recaptage du marqueur en cas de fuite hors des cellules a été jugée largement supérieure aux propriétés du DAPI. Au-delà d'une dizaine de divisions cellulaires la dilution du marqueur distribué de façon équivalente de la cellule mère aux cellules filles rend le repérage plus difficile, et l'utilisation de nos marqueurs pour des études à très long terme est donc plus délicate (Horan, Melnicoff et al. 1990). La durée de survie relativement courte des animaux après la greffe dans notre étude, nous permet de contourner cet écueil.

L'association d'un marqueur fluorescent et d'un marqueur révélé en immunohistochimie permet de bénéficier des avantages de nombreuses techniques en

anatomopathologie. La fluorescence du DiI a été mise en évidence sur coupes congelées et a permis un repérage aisé des CSM. Quant au BrdU, sa révélation en coupes paraffinées a non seulement permis un repérage cellulaire (double repérage) mais aussi une excellente visualisation de l'architecture tissulaire et donc une localisation structurelle précise. De plus le BrdU associé en double marquage immunohistochimique avec un marqueur spécifique des différentes populations cellulaires rénales a permis l'identification du lignage des CSM greffées.

#### **6.4 Nombre de cellules injectées**

Les conditions de culture ont permis d'obtenir en moyenne 83 millions ( $\pm 28$ ) de CSM en environ deux semaines de culture à partir d'un aspirat total d'environ 10 ml de moelle osseuse. Ces chiffres sont à majorer car sur les trois premiers animaux prélevés, une seule ponction de moelle osseuse de 3 ml a été effectuée et c'est à partir de ces faibles quantités que nous avons obtenu le plus faible nombre de CSM au terme de la culture. Nous avons donc multiplié les points de ponction. Ces chiffres sont en accord avec la littérature, Pittenger (Pittenger, Mackay et al. 1999) a obtenu 50 à 200 millions de cellules dans les mêmes délais à partir d'un volume équivalent de moelle humaine. Le nombre total de cellules injectées est lui aussi en accord avec les données des études précédentes qu'elles relèvent de la thérapie cellulaire en néphrologie ou en cardiomyoplastie (Wang, Shum-Tim et al. 2001; Lin, Cordes et al. 2003), la quantité de CS greffée a été alors suffisante pour obtenir des résultats significatifs dans la quasi totalité de ces travaux.

#### **6.5 Modèle d'ischémie reperfusion**

Pour évaluer l'adressage spécifique des CSM vers l'organe lésé ou sain, nous avons développé un modèle ovin d'ischémie-reperfusion rénale. Le groupe I a subi une occlusion unilatérale de l'artère rénale pendant 30 minutes, le groupe III pendant 45 minutes et le groupe II sans ischémie a constitué le groupe témoin. Le groupe III a subi une ischémie plus sévère car après évaluation des lésions anatomopathologiques du groupe I (lésions hétérogènes et de gravité mineure) nous avons décidé d'augmenter le temps d'occlusion artérielle. La littérature (Shin, Lee et al. 1997) rapporte la même évolution de l'intensité des

lésions en fonction de la durée d'ischémie. En effet la privation d'oxygène déclenche une réaction en cascade au sein du rein impliquant les voies humorale et cellulaire de l'inflammation. La libération de cytokines pro inflammatoires, l'activation de la coagulation et la libération de radicaux libres initient les lésions d'apoptose cellulaire (Thadhani, Pascual et al. 1996; Bonventre 1998; Sheridan and Bonventre 2001) (Hourmant 1999). L'infiltration leucocytaire (neutrophiles) entretient ce phénomène par la poursuite de la libération de cytokines et de radicaux libres. Les lésions rénales induites sont localisées dans tout le parenchyme rénal et atteignent tubules et glomérules. La nécrose tubulaire est classiquement la principale et première lésion observée puis suit un remodelage glomérulaire.

La zone la plus sensible à l'ischémie semble être la zone de transition entre la corticale et la médullaire, le segment S 3 du tube contourné proximal est le plus touché. En effet cette zone semble être moins vascularisée que le reste du rein en conditions physiologiques normales et serait la dernière à retrouver une circulation sanguine après interruption du flux sanguin dans le rein. Ainsi au sein même du rein les différentes structures ne sont pas touchées de la même façon.

Les lésions évoluent en fonction du temps. Dans un premier temps prime l'infiltration par des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles) et ensuite s'installent les lésions de nécrose. La nécrose est plus ou moins importante et traduit la gravité de l'ischémie. Cette nécrose touche d'abord les tubules puis l'ensemble du parenchyme.

Nous avons observé ces types de lésions sur les coupes histologiques des reins des groupes I et III. Le groupe I présentait des lésions éparses et le groupe III montrait des lésions de nécrose extensives systématiques. L'inflammation avait partiellement disparue, en effet nous avons étudié les reins 5 à 8 semaines après l'ischémie.

Les résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique dans la veine rénale confirment la validité de notre modèle. En effet l'augmentation de l'ARP est systématique après la levée de l'occlusion à ballonnet. Les dosages de l'urée et de la créatinine ne sont pas modifiés car nous ne sommes pas dans une situation d'insuffisance rénale, un seul rein ayant été lésé de façon partielle. Les valeurs des concentrations d'urée et de créatinine restent dans les normes physiologiques et nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes aux différents moments du dosage. Le poids des reins systématiquement inférieur pour le rein ischémié traduit certainement le remplacement d'une partie du parenchyme par du tissu de fibrose rétracté.

Nous avons au départ choisi une durée d'occlusion relativement courte parce que nous craignons alors une fibrose trop importante voire totale du rein, milieu qui n'aurait pas été propice au développement (rein atrophié) des CSM injectées.

Le modèle d'altération rénale que nous avons choisi est de type ischémique. En effet plusieurs études dans différents domaines ont utilisé des modèles d'ischémie de différents organes pour tester la participation des cellules souches à la réparation de l'organe lésé. Ce modèle a permis avec succès d'explorer la mécanique de recrutement des cellules souches. Ainsi Gupta (Gupta, Verfaillie et al. 2002) a utilisé ce modèle pour explorer l'implication des cellules du receveur dans le cadre de la réparation du tissu rénal après transplantation chez l'homme. En effet la transplantation d'organe correspond à un modèle d'ischémie où les lésions observées sont du même type que celles décrites dans notre modèle. De plus l'auteur a découvert que dans le cas des reins transplantés présentant des lésions de nécrose tubulaire ischémique l'ensemencement par les cellules du receveur était plus important que dans le cas des greffons ne présentant pas de lésions d'ischémie.

De même, d'autres auteurs ont utilisé le modèle d'ischémie pour explorer le potentiel d'intégration des cellules souches dans le rein. Lin (Lin, Cordes et al. 2003) ou Kale (Kale, Karihaloo et al. 2003) ont utilisé un modèle d'ischémie-reperfusion rénale pour explorer le potentiel des cellules souches hématopoïétiques à participer à la régénération du rein. Dans ces études ce modèle s'est révélé pertinent et les auteurs ont pu conclure quant à la participation des CSH dans la régénération.

Notre modèle a par ailleurs l'avantage d'éviter l'écueil du rejet cellulaire car la greffe est autologue. Dans la plupart des études explorant le potentiel des cellules souches en néphrologie, les greffes sont hétérologues nécessitant alors un traitement immunosuppresseur chez le receveur, soit chimique (médicamenteux chez les patients transplantés rénaux par exemple) soit par irradiation préalable (animaux receveurs (souris et rats) irradiés à forte dose). Les modèles se placent alors dans un contexte physiologique modifié. La greffe autologue quant à elle est réalisable dans le cadre d'une éventuelle application clinique des CS dans le traitement des néphropathies.

## **6.6 Devenir cellulaire**

### **6.6.1 Rendement de la greffe cellulaire**

Nous avons observé un ensemencement très important des glomérules et dans une moindre mesure des tubules rénaux par les CSM. Mais si on estime le nombre de cellules retrouvées par rapport au nombre de cellules injectées on remarque que seulement 10% approximativement des cellules ont intégré le rein. Le reste des cellules injectées n'a pas été retrouvé dans les autres organes prélevés et étudiés (rate, foie, poumon ou rein controlatéral). Le devenir de ces cellules reste incertain, elles ont pu être éliminées par l'organisme après mort cellulaire ou simplement filtrées par le rein et éliminées dans l'urine. L'urine des brebis n'ayant pas été analysée cette hypothèse ne peut être confirmée.

### **6.6.2 Recrutement préférentiel des CSM par le rein lésé**

Si les cellules souches (cellules souches résidentes (CSR) de l'organe ou issues de la moelle osseuse) participent au turn over physiologique de régénération des organes et au même titre du rein, l'hypothèse a été émise qu'après une altération organique le recrutement des CS était alors plus important (Gage 2000; Blau, Brazelton et al. 2001; Al-Awqati and Oliver 2002; Imai and Ito 2002; Poulsom 2003; Rafii and Lyden 2003). Pour qu'une cellule souche (CSH, CSM ou CSR) soit dirigée vers l'organe malade et qu'elle s'engage dans une voie de différenciation spécifique de cette organe, elle répondrait à un ensemble de facteurs clés régissant, migration, croissance et différenciation cellulaire. Ces facteurs seraient relargués par l'organe en souffrance, ils seraient tissulaires dépendants, fonction du degré des lésions et spécifiques du type de cellules souches (Watt and Hogan 2000; Blau, Brazelton et al. 2001). Ces facteurs agiraient en activant sélectivement certains gènes au sein des cellules souches. Une étude (Fallon, Reid et al. 2000) portant sur le système nerveux central a montré que le Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) était impliqué dans la migration des cellules souches nerveuses du cerveau. Quand le TGF  $\alpha$  a été injecté dans le lobe frontal du cerveau de rats présentant des lésions de substantia nigra, il a engendré la migration massive de CSN vers le site lésé injecté, illustrant l'adressage spécifique des CSN dans le site lésé sous l'action de facteurs multiples.

Dans notre étude les résultats d'ensemencement du parenchyme rénal par les CSM sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) entre les groupes II et III, de même entre les groupes I et III. Le groupe témoin II sans lésions rénales présente le taux d'ensemencement le plus faible, avec 32% de glomérules contenant des CSM marquées, alors que les groupes I et III présentaient des taux respectivement de 40% et 55% d'ensemencement des glomérules.

La différence significative entre les groupes II (témoin) et III (ischémié et survie 6 semaines) est certainement en relation avec la présence de lésions rénales dans le groupe III alors que le groupe II est sain. Nos résultats corroborent alors ceux de la littérature avec un recrutement dirigé vers l'organe en souffrance. La différence significative entre les groupes I (ischémié et survie 3 semaines) et III (ischémié et survie 6 semaines) renforce cette hypothèse : cette différence serait liée à l'augmentation de la sévérité des lésions dans le groupe III.

La différence évoquée entre les groupes I et III en terme d'ensemencement pourrait également être le résultat de la multiplication des CSM après intégration dans le parenchyme rénal. En effet le temps de survie plus long des animaux après la greffe pour le groupe III (3 semaines de survie pour le groupe I et 6 semaines de survie pour le groupe III) aurait permis la prolifération cellulaire, certaines images d'histologie supportent cette hypothèse (l'histologie montre dans le groupe III la présence de cellules adjacentes couplées par deux, laissant penser à un phénomène de division).

La présence de cellules souches en quantité moins importante dans les glomérules des reins injectés du groupe témoin pourrait être l'illustration de la participation des CSM à la régénération physiologique que subissent constamment les organes comme l'avait montré Poulson (Poulson, Forbes et al. 2001).

### **6.6.3 Différenciation des CSM en cellules rénales**

Les précédentes études menées sur le rein ont montré que les CS ont la capacité de s'intégrer et de se différencier en cellules rénales. Gupta (Gupta, Verfaillie et al. 2002), Kale (Kale, Karihaloo et al. 2003), Lin (Lin, Cordes et al. 2003), Poulson (Poulson, Forbes et al. 2001) et Ito (Ito, Suzuki et al. 2001; Ito, Suzuki et al. 2001; Ito 2003) ont démontré chez l'homme ou la souris que les CS issues de la moelle pouvaient se différencier en cellules épithéliales tubulaires. Nous avons nous aussi observé ce phénomène puisque les CSM

injectées se sont différenciées en cellules épithéliales tubulaires. Mais cette observation semble être secondaire dans notre étude en terme de quantité. En effet la transition des CSM en cellules épithéliales tubulaires a été observée plus rarement que dans les études précitées et surtout c'est principalement vers une transition podocytaire que se sont orientées en grand nombre les CSM. Poulsom (Poulsom, Forbes et al. 2001) dans son travail rapporte la même observation, démontrant à la fois une transition podocytaire et tubulaire épithéliale.

Notre travail se singularise par le type de CS utilisée pour la greffe. En effet c'est la première étude s'intéressant aux cellules souches mésenchymateuses en néphrologie, les autres auteurs ont, soit transplanté des CSH (Kale, Karihaloo et al. 2003; Lin, Cordes et al. 2003), soit n'ont pas sélectionné au préalable la population cellulaire et ont alors injecté de la moelle totale (Imasawa, Utsunomiya et al. 2001; Ito, Suzuki et al. 2001; Ito, Suzuki et al. 2001; Gupta, Verfaillie et al. 2002), soit enfin dans le cadre des patients transplantés rénaux les cellules sont définies simplement comme issues du receveur (Poulsom, Forbes et al. 2001; Gupta, Verfaillie et al. 2002). Dans le cas des études n'ayant pas défini la population cellulaire injectée, la filiation cellulaire est impossible. Dans le cas de transplantation de la moelle, toutes les cellules de la moelle ont pu participer à la réparation tissulaire, les CSH ou les CSM. Dans le cas des études plus ciblées, les CSH ont engendré des cellules tubulaires épithéliales dans le rein. Ainsi la différence observée dans le lignage cellulaire chez les auteurs pourrait simplement être dû à la nature variable des cellules greffées. Les CSM auraient un potentiel différent des CSH par exemple.

Une autre hypothèse permettrait d'expliquer cette variation dans le devenir cellulaire. Dans les études précédentes, la greffe cellulaire intervient rapidement après la lésion rénale (quelques heures après les lésions) alors que les brebis dans notre étude ont été greffées 15 jours après la création de l'ischémie. Or comme explicité précédemment, la chronologie des phénomènes de réparation du tissu rénal après ischémie montre d'abord un remaniement tubulaire avec régression des lésions en deux à trois semaines. Ainsi nous avons certainement injecté nos cellules à la fin de la période de cicatrisation tubulaire. Les lésions glomérulaires persisteraient alors plus longtemps, et les CSM greffées interviendraient dans le remodelage glomérulaire.



## 7 CONCLUSION

Ce travail a permis de développer un modèle expérimental ovin adulte d'ischémie-reperfusion valide dans le cadre de la recherche sur le potentiel des cellules souches.

Nous avons mis au point, la culture, la sélection et l'amplification des CSM en vue de l'obtention d'un nombre conséquent et suffisant de CSM pour une greffe autologue. Le choix de marqueurs cellulaires chimiques sur la base d'un test *in vitro* confirmant leur fiabilité a permis le marquage des cellules souches mésenchymateuses de la moelle de brebis adulte en vue du repérage cellulaire après greffe dans le rein sain et en voie de réparation.

Le développement de la technique de greffe percutanée dans l'artère rénale a permis dans un cadre mini invasif, de délivrer les CSM spécifiquement dans l'organe cible.

Le double marquage cellulaire immunohistochimique a permis d'identifier le devenir des cellules greffées. Les CSM ont démontré leur capacité à ensemençer le parenchyme rénal, à s'intégrer et à se différencier en cellules rénales. Dans l'ensemble des groupes, témoins ou ischémiés, les cellules se sont différenciées en podocytes au sein des glomérules ou en cellules épithéliales au sein des tubules. Ces résultats montrent la participation des CSM dans la régénération physiologique du rein (groupe témoin), et l'ensemencement supérieur dans les groupes pathologiques est en faveur d'un adressage préférentiel vers le rein lésé. Cette constatation est en accord avec la littérature, l'hypothèse ayant été émise que l'organe en souffrance libèrerait des facteurs régissant, migration, croissance et différenciation cellulaire.

Ainsi, même si le rein possède une structure plus complexe que d'autres organes comme l'os ou le cœur, la thérapie cellulaire utilisant les CSM de la moelle adulte ouvre une nouvelle voie thérapeutique dans le cadre du traitement de nombreuses affections rénales. Les CSM adultes dans notre étude ont démontré leur capacité de régénération du rein, ces cellules sont faciles à obtenir par rapport aux cellules souches embryonnaires ; une simple ponction de moelle osseuse sur le patient lui-même permet la récolte la culture et l'amplification. La greffe autologue évite quant à elle tous les écueils liés aux rejets d'origine immune.

## 8 PERSPECTIVES DU TRAVAIL

La confrontation de ce travail à la littérature souligne la nécessité de compléter en premier lieu le protocole par l'adjonction d'un groupe supplémentaire : dans ce groupe les animaux subiront d'abord une ponction de moelle osseuse, puis quinze jours plus tard, alors que les CSM seront prêtes à être injectées, l'animal subira une ischémie rénale unilatérale suivi une heure après la lésion, de la greffe cellulaire. Les animaux seront alors sacrifiés trois semaines plus tard. Ce groupe nous permettra d'étudier l'intégration des CSM en phase de cicatrisation tubulaire active et ainsi répondre à l'interrogation soulevée à ce stade du travail.

Notre projet aurait dû comprendre une étude sur l'animal en voie de développement. Ce travail est en cours de financement. Parce que chez le fœtus l'organe est en voie de développement, il est légitime d'émettre l'hypothèse de la plus forte implication et activité des CS dans la construction de l'organe par rapport au stade adulte. De plus l'étude sur l'organe en développement apporterait peut-être des réponses sur les facteurs régissant la différenciation cellulaire. Ce travail sur le fœtus de brebis est en attente de financement.

Une étude intégrant une évaluation fonctionnelle de la réparation du tissu rénal par thérapie cellulaire est nécessaire pour objectiver la pertinence et l'efficacité de la greffe de cellules souches mésenchymateuses dans le cadre du traitement des néphropathies.

L'association à la thérapie cellulaire des atouts de la thérapie génique pourrait augmenter les bénéfices de cet outil thérapeutique (Yamagishi, Yokoo et al. 2001). En effet on peut imaginer modifier génétiquement les CSM en culture afin qu'elles expriment une protéine défective dans une certaine population cellulaire rénale chez le patient, permettant le traitement de certaines néphropathies par injection de cellules modifiées par transgénèse.

## 9 REFERENCES

- Al-Awqati, Q. and J. A. Oliver (2002). "Stem cells in the kidney." *Kidney Int* **61**(2): 387-95.
- Bariety, J., P. Bruneval, et al. (2001). "Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation." *J Am Soc Nephrol* **12**(2): 261-74.
- Bariety, J., D. Nochy, et al. (1998). "Podocytes undergo phenotypic changes and express macrophagic-associated markers in idiopathic collapsing glomerulopathy." *Kidney Int* **53**(4): 918-25.
- Bianco, P. and P. Gehron Robey (2000). "Marrow stromal stem cells." *J Clin Invest* **105**(12): 1663-8.
- Blau, H. M., T. R. Brazelton, et al. (2001). "The evolving concept of a stem cell: entity or function?" *Cell* **105**(7): 829-41.
- Bonventre, J. V. (1998). "Pathogenetic and regenerative mechanisms in acute tubular necrosis." *Kidney Blood Press Res* **21**(2-4): 226-9.
- Fallon, J., S. Reid, et al. (2000). "In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14686-91.
- Fukuhara, S., S. Tomita, et al. (2002). "Comparison of cell labeling procedures for bone marrow cell transplantation to treat heart failure: long-term quantitative analysis." *Transplant Proc* **34**(7): 2718-21.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* **287**(5457): 1433-8.
- Gupta, S., C. Verfaillie, et al. (2002). "A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure." *Kidney Int* **62**(4): 1285-90.
- Horan, P. K., M. J. Melnicoff, et al. (1990). "Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking." *Methods Cell Biol* **33**: 469-90.
- Hourmant, M. (1999). "[Renal ischemia reperfusion syndrome]." *Nephrologie* **20**(7): 371-5.
- Imai, E. and T. Ito (2002). "Can bone marrow differentiate into renal cells?" *Pediatr Nephrol* **17**(10): 790-4.
- Imasawa, T. and Y. Utsunomiya (2002). "Stem cells in renal biology: bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy." *Exp Nephrol* **10**(1): 51-8.
- Imasawa, T., Y. Utsunomiya, et al. (2001). "The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* **12**(7): 1401-9.

- Ito, T. (2003). "Stem cells of the adult kidney: where are you from?" *Nephrol Dial Transplant* **18**(4): 641-4.
- Ito, T., A. Suzuki, et al. (2001). "Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling." *J Am Soc Nephrol* **12**(12): 2625-35.
- Ito, T., A. Suzuki, et al. (2001). "Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology." *Exp Nephrol* **9**(6): 444-50.
- Kale, S., A. Karihaloo, et al. (2003). "Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule." *J Clin Invest* **112**(1): 42-9.
- Lenoir, N. (2000). "Europe confronts the embryonic stem cell research challenge." *Science* **287**(5457): 1425-7.
- Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." *Nat Med* **6**(11): 1282-6.
- Lin, F., K. Cordes, et al. (2003). "Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice." *J Am Soc Nephrol* **14**(5): 1188-99.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-7.
- Poulsom, R. (2003). "Does bone marrow contain renal precursor cells?" *Nephron Exp Nephrol* **93**(2): e53.
- Poulsom, R., S. J. Forbes, et al. (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." *J Pathol* **195**(2): 229-35.
- Qu, Z., L. Balkir, et al. (1998). "Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy." *J Cell Biol* **142**(5): 1257-67.
- Rafii, S. and D. Lyden (2003). "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration." *Nat Med* **9**(6): 702-12.
- Sheridan, A. M. and J. V. Bonventre (2001). "Pathophysiology of ischemic acute renal failure." *Contrib Nephrol* **132**: 7-21.
- Shin, C. S., K. Y. Lee, et al. (1997). "Renal ischemia-reperfusion injury does not induce pulmonary dysfunction in sheep." *Yonsei Med J* **38**(3): 142-50.
- Thadhani, R., M. Pascual, et al. (1996). "Acute renal failure." *N Engl J Med* **334**(22): 1448-60.
- van der Kooy, D. and S. Weiss (2000). "Why stem cells?" *Science* **287**(5457): 1439-41.

- Wang, J. S., D. Shum-Tim, et al. (2001). "The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications." *J Thorac Cardiovasc Surg* **122**(4): 699-705.
- Wang, J. S., D. Shum-Tim, et al. (2000). "Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages." *J Thorac Cardiovasc Surg* **120**(5): 999-1005.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." *Science* **287**(5457): 1427-30.
- Yamagishi, H., T. Yokoo, et al. (2001). "Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy." *J Immunol* **166**(1): 609-16.

Titre :

**EVALUATION DU POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE (CSM) DANS LA REGENERATION DU REIN APRES ISCHEMIE: ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LA BREBIS ADULTE.**

Nom : **BEHR**

Prénom : **Luc**

Le but de ce travail a été d'évaluer la capacité des CSM, à s'intégrer au rein et à se différencier en cellules rénales après greffe autologue au sein du tissu rénal normal et lésé par ischémie transitoire. La greffe cellulaire a été réalisée par voie per cutanée dans l'artère rénale (n=13), ou par voie intra parenchymateuse après dissection de l'organe (n=1). Pour la voie d'injection intra artérielle les animaux ont été répartis en 3 groupes : le premier groupe (témoin) (n=3) a subi à J0 une ponction de moelle osseuse, à J15 la greffe autologue de CSM (100 millions) marquées par des colorants chimiques (BrdU et DiI), à J35 sacrifice. Le deuxième groupe (n=5) a subi le même protocole que le groupe témoin, mais à J0 a subi en plus une ischémie rénale de 30 min par gonflage d'un ballonnet dans l'artère rénale. Le troisième groupe (n=5) a subi le même protocole que le deuxième mais l'ischémie a été de 45 min et le sacrifice a eu lieu à J55. Pour la voie d'injection intra parenchymateuse l'animal (n=1) a subi le même protocole que les animaux du deuxième groupe. Le modèle d'ischémie a été validé par la mesure de l'activité rénine plasmatique (ARP) et par l'évaluation anatomopathologique des lésions rénales. La voie d'injection intra parenchymateuse a été abandonnée pour des raisons de faisabilité et la voie intra artérielle a été choisie. Les CSM, ont la capacité de se différencier en cellules rénales (podocytes et cellules tubulaires épithéliales). Les CSM pourraient être un outil thérapeutique dans la réparation rénale, ralentissant les phénomènes dégénératifs qui mènent au stade terminal de l'insuffisance rénale.

Mots clés :

Cellules souches mésenchymateuses

Greffe cellulaire

Rein

Ischémie

Podocyte

Etude expérimentale

Brebis

Modèle animal

Jury :

Président :

Directeur : Pascal Fayolle

Assesseur : Valérie Chetboul

Invité : Alain Fontbonne

Adresse de l'auteur :

Luc BEHR

44, rue du Faubourg du Temple

75011 Paris

**Title:BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) IN RENAL REGENERATION AFTER RENAL ISCHEMIC INJURY: AN EXPERIMENTAL STUDY IN THE SHEEP.**

**Surname: BEHR**

**Given name: Luc**

**Summary:**

**The aim** of the study was to investigate the possibility that MSC may integrate renal structures and differentiate into renal cells after ischemic injury. **Studies** were performed at three weeks after autologous MSC graft in controls (II;n=3) and in ewes subjected 15 days before to unilateral renal ischemia (I;n=5) or at six weeks in ewes subjected 15 days before to unilateral renal ischemia (III;n=5). Renal injury was performed by percutaneous transluminal placement of a balloon catheter inflated in the renal artery. Ischemia was assessed by renin activity in the renal vein and morphological analysis of the kidney. MSC were isolated from cells aspirated from the bone marrow and cultured to obtain  $10^8$  cells that were injected into the renal artery. Nuclear (BrDU) and membrane (DiI) bound dyes were used to track and recover cells from specific location. **Results:** after injection all ewes from both groups show renal engraftment of MSC. MSC were mostly localised in glomeruli (I:40±13.5%; C:32.2±2.6% of glomeruli). Based on their location at the periphery of the glomerular tuft and immunoreactivity for podocine and cytokeratin MSC appeared to have acquired a podocyte phenotype. Few cells were detected in tubules, in group I and III only. These results show that MSC can successfully engraft and differentiate into glomerular cells and suggest a preferential targeting toward the damaged kidney .

**Key words:**

Mesenchymal stem cell

Experimental study

Cell graft

Sheep

Kidney

Animal model

Ischemia

Podocyte

**Jury**

President:

Director: Pr Fayolle P.

Assessor : Pr Chetboul V.

Guest : Dr Fontbonne A.

**Author's Address :**

Mr. Luc BEHR

44, rue du Faubourg du temple

75011 Paris