

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
INDEX DES FIGURES	3
INTRODUCTION	5
PREMIERE PARTIE	7
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	7
I. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE RENALE	9
A. Embryologie et histologie topographique	9
1. Développement embryologique.....	9
2. Architecture générale.....	10
3. Agencement néphronique	10
B. Histologie rénale	12
1. Le corpuscule de Malpighi	12
1.1. Le glomérule	12
1.2. La capsule glomérulaire ou capsule de Bowman.....	12
2. La partie tubulaire du néphron.....	13
3. Vascularisation des néphrons.....	16
C. Fonctions du rein	17
1. Fonction urinaire.....	17
a. Filtration glomérulaire	17
b. Sécrétion et réabsorption tubulaire	18
2. Fonction endocrine	18
II. L'INSUFFISANCE RENALE	19
A. L'insuffisance rénale aiguë	19
B. L'insuffisance rénale chronique	22
III. LA THERAPIE CELLULAIRE	25
A. Notion de cellule souche	25
B. Les cellules souches embryonnaires	26
C. Les cellules souches adultes	27
1. Localisation.....	27
2. Recrutement	27
3. Potentiel de différenciation	27
4. Mise en culture et capacité de prolifération <i>in vitro</i>	28
5. La moelle osseuse : source de cellules souches	28
D. Exemples d'application de la thérapie cellulaire	28
IV. LA THERAPIE CELLULAIRE EN NEPHROLOGIE	31
A. Modèles animaux	31
1. Animaux sains.....	31
2. Animaux malades	32
B. Chez les patients transplantés	33

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	37
BUT DE L'ETUDE	39
PROTOCOLE	40
I. MATERIEL ET METHODE	41
A. <i>Matériel</i>	41
1. Les animaux	41
1.1 Caractéristiques des brebis.....	41
1.2 Conditions d'élevage des brebis	41
1.3 Répartition des groupes, chronologie des actes chirurgicaux et des prélèvements biologiques	42
2. Les cellules	43
B. <i>Méthode</i>	45
1. Prélèvement de moelle osseuse.....	45
1.1 Anesthésie	45
1.2 Technique de ponction de moelle osseuse	45
2. Culture et amplification cellulaire	46
2.1 Produits utilisés.....	46
2.2 Technique.....	46
3. Marquage cellulaire	48
4. Modèle expérimental d'ischémie rénale	49
5. Technique d'injection des CSM dans l'artère rénale.....	50
6. Sacrifice des animaux et prélèvement des reins	53
7. Etude des reins prélevés.....	53
7.1 Evaluation macroscopique	53
7.2 Evaluation microscopique.....	53
8. Traitement des prélèvements sanguins	56
8.1 Dosage de l'urée et la créatinine plasmatique	56
8.2 Dosage de l'activité rénine plasmatique (ARP).....	56
9. Méthode statistique	56
II. RESULTATS	57
A. <i>Modèle d'ischémie rénale</i>	57
1. Résultats des dosages d'urée et de créatinine plasmatique.....	57
2. Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique (ARP).....	57
3. Résultats de l'évaluation anatomo-pathologique des lésions rénales	59
B. <i>Culture et marquage cellulaire</i>	63
1. Culture cellulaire.....	63
2. Résultats du contrôle de marquage des cellules avant greffe	63
C. <i>Résultats de la greffe cellulaire</i>	65
1. Ensemencement des glomérules :	67
2. Ensemencement des tubules :	67
3. Etude de la différenciation des CSM par la révélation de marqueurs spécifiques de cellules rénales	69
III. DISCUSSION	81
A. <i>Les cellules souches mésenchymateuses : intérêt, mise en culture et marquage</i>	81
B. <i>Le modèle ovin d'ischémie reperfusion</i>	83
C. <i>Interprétation des résultats de l'étude</i>	84
D. <i>Perspectives</i>	86
CONCLUSION	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 1 : Anatomie générale du rein. Structure schématique d'un néphron.....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 2 : Le corpuscule de Malpighi et l'appareil juxta-glomérulaire.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 3: Schéma de la vascularisation du néphron.</i>	<i>14</i>
<i>Figure 5 : Les remaniements cellulaires lors d'ischémie reperfusion du rein.</i>	<i>21</i>
<i>Figure 6 : Les différents types de cellules souches et leur devenir.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 7 : Tableau de comparaison des études expérimentales réalisées en 2001-2004, sur l'application de la thérapie cellulaire en néphrologie.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 8 : Répartition des groupes et chronologie des actes chirurgicaux.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 9 : Artériographie rénale réalisée, pour chaque brebis, avant l'ischémie rénale transitoire.</i>	<i>51</i>
<i>Figure 10 : Mise en place du ballonnet dans l'artère rénale d'une brebis.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 11 : Résultats du dosage de l'urée et de la créatinine plasmatique des brebis des groupes I, IIIa et IIIb, à JO, J15 et lors du sacrifice.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 12 : Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique dans la veine rénale des reins ischémiés pour les groupes II et III.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 15 : Nombre moyen de CSM greffées chez les brebis des groupes I II et III.</i>	<i>63</i>
<i>Figure 16 : Contrôle des marquages cmDiI et BrdU après la greffe cellulaire.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 17 : Pourcentage de glomérulesensemencés par les CSM chez les brebis des groupes I,II et III.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 18: Pourcentage de tubulesensemencés par les CSM chez les brebis des groupes I,II et III.</i>	<i>68</i>
<i>Figure 19 : Glomérule contenant des CSM marquées au cmDiI.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 20 : Tubule contenant des CSM marquées au cmDiI.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 21 : Tubules contenant des CSM marquées au BrdU.</i>	<i>73</i>
<i>Figure 22 : Double marquage BrdU / Pancytokératine.</i>	<i>73</i>
<i>Figure 23 : Double marquage DBA / BrdU.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 24 : Double marquage BrdU / Podocyne.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 25 : CSM marquées au BrdU dans un tubule proximal.</i>	<i>77</i>
<i>Figure 26 : Triple marquage cmDiI/ BrdU/CD68.....</i>	<i>79</i>

INTRODUCTION

La thérapie cellulaire est utilisée avec succès depuis plusieurs décennies, notamment pour le traitement d'affections hématologiques grâce aux greffes de moelle osseuse, chez les grands brûlés avec les greffes de peau [6], ou tout simplement lors d'une transfusion sanguine [47]. Remplacer des cellules dégénérées, dysfonctionnelles ou absentes est l'atout de la thérapie cellulaire, dans le but de régénérer -partiellement- des organes défectueux. Depuis peu, la transplantation cellulaire est l'objet d'un regain d'intérêt, du fait de découvertes majeures sur le potentiel thérapeutique des cellules souches. En cardiologie notamment, les essais cliniques de cardiomyoplastie cellulaire ont des résultats prometteurs pour le traitement de l'infarctus du myocarde ou de certaines cardiomyopathies [35].

En néphrologie, la thérapie cellulaire pourrait être un moyen de lutter contre l'insuffisance rénale. Différentes études expérimentales récentes (2001-2004) suggèrent que des cellules souches peuvent intégrer les structures rénales et participer à la réparation du tissu rénal. Ces recherches, menées sur modèles murins, révèlent que différentes catégories de cellules souches, issues de la moelle osseuse, colonisent le rein et se différencient en cellules rénales après transplantation hétérologue [22-23, 25-26, 34, 37, 44]. L'étude présentée dans cette thèse a débuté en 2002, le but était d'évaluer le potentiel d'intégration dans le rein, de cellules souches mésenchymateuses amplifiées en culture, après transplantation autologue *via* l'artère rénale, sur un modèle ovin d'ischémie reperfusion.

Après avoir rappelé l'anatomie et la physiologie rénale puis la pathogénie de l'insuffisance rénale, nous nous intéresserons, dans une première partie, aux données actuelles en thérapie cellulaire, et notamment aux travaux réalisés en néphrologie. Enfin nous décrirons, dans la seconde partie, notre protocole expérimental, ainsi que les résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE RENALE

Chez les mammifères, le rein est l'organe excréteur chargé de l'élaboration de l'urine. Cette fonction urinaire permet l'élimination des déchets métaboliques, le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique et de l'équilibre acido-basique. Le rein a également une fonction endocrine.

Après avoir rappelé le développement embryologique du rein, nous étudierons la structure et le fonctionnement rénal.

A. Embryologie et histologie topographique

1. Développement embryologique

Le rein dérive du mésoblaste intermédiaire qui constitue une ébauche rénale primitive, le cordon néphrogène. Ce cordon néphrogène se segmente et donne naissance à trois ébauches qui se succèdent dans le temps et dans l'espace :

- le pronéphros qui régresse rapidement.
- le mésonéphros qui régresse rapidement.
- le métanéphros, à l'origine du rein définitif.

Les voies urinaires se forment à partir d'un renflement de l'allantoïde : l'ébauche vésicale communique temporairement avec la partie postérieure de l'intestin primitif pour constituer un cloaque, dans lequel se jettent les canaux de Wolff, structures paires et symétriques représentant les voies excrétrices temporaires du pro- et du mésonéphros.

Du canal de Wolff se forme un diverticule, le bourgeon urétéral, qui se développe en direction du métanéphros, dans lequel il pénètre.

C'est à partir du métanéphros et sous l'action du diverticule urétéral que se constitue le rein définitif des mammifères ; le tissu métanéphrogène s'organise au fur et à mesure de la pénétration des ramifications du diverticule urétéral. Le diverticule urétéral est à l'origine de l'uretère, du bassinnet, des calices et des tubes collecteurs qui constituent la portion excrétrice du rein. Le tissu métanéphrogène forme le néphron, portion sécrétrice du rein. [16]

2. Architecture générale

Les reins des mammifères sont deux organes pleins, situés en région lombaire crâniale, appliqués contre la paroi dorsale de la cavité abdominale et contre le péritoine ventralement. La partie concave de chaque rein est orientée vers la ligne médiane, où se trouvent l'aorte et la veine cave caudale. Cette partie concave est appelée le hile, siège de l'arrivée de l'artère rénale et des voies urinaires excrétrices.

Chez le chien, l'artère rénale, issue de l'aorte abdominale, se divise à environ 1 cm du hile en 3 à 6 branches interlobaires par rein. Ces branches se divisent à leur tour en artères arquées, interlobulaires, et enfin en artérioles afférentes. Ces dernières irriguent le glomérule, organe de filtration, dont le sang repart par les artérioles efférentes qui se résolvent en capillaires. Le débit sanguin des reins est très élevé puisqu'il représente environ un quart du débit cardiaque. Le drainage veineux est celui des veines rénales qui rejoignent la veine cave caudale. (*figure 3*)

L'observation d'une coupe de rein permet de distinguer trois zones concentriques, avec de la périphérie vers le hile : le cortex, la médulla externe (pyramides de Ferrein) et la médulla interne. (*figure 1*)

3. Agencement néphronique

L'unité fonctionnelle du rein s'appelle le néphron. La structure du rein de l'homme repose sur la juxtaposition d'environ un million de néphrons. [13]

Chaque néphron se compose (*figure1*) :

- D'un glomérule rénal associant le réseau capillaire résultant de la ramification de l'artère glomérulaire afférente et une capsule épithéliale (capsule de Bowman) délimitant un espace urinaire (espace de Bowman) dans lequel se forme l'urine primitive.
- D'une portion tubulaire, divisée en plusieurs sections (tubules contournés proximal et distal, anse de Henlé avec ses branches descendante et ascendante grêles et larges, et le tube collecteur).

Ces sections du néphron occupent une position déterminée, dans la topographie rénale :

- Le cortex rénal comprend l'ensemble des glomérules et des tubules contournés proximaux et distaux.
- La médullaire externe est constituée des tubules droits proximaux et distaux et des tubes collecteurs.
- La médullaire interne correspond aux anses de Henlé et aux tubes collecteurs.

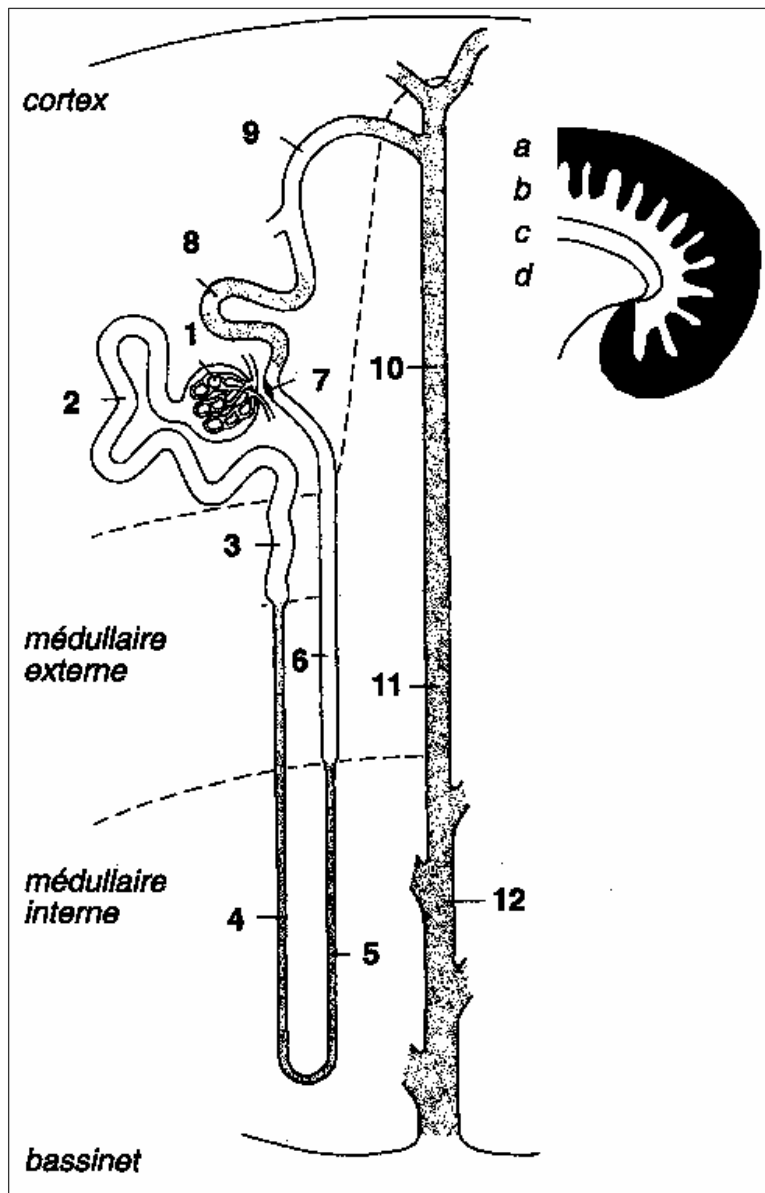


Figure 1 : Anatomie générale du rein. Structure schématique d'un néphron.
(D'après KRIZ et BANKIR [31])

- 1 : corpuscule de Malpighi
- 2 : tubule contourné proximal
- 3 : tubule droit proximal
- 4, 5, 6 : Anse de Henlé (4 : branche descendante grêle, 5 : branche ascendante grêle, 6 :
branche ascendante large ou tubule droit distal)
- 7 : macula densa située dans la portion terminale de la branche ascendante large
- 8 : tubule contourné proximal
- 9 : tubule de connexion
- 10 : tube collecteur cortical
- 11, 12 : tube collecteur médullaire

En insert, topographie du rein

- a : cortex
- b : couche externe de la médullaire externe
- c : couche interne de la médullaire externe
- d : médullaire interne

B. Histologie rénale

1. Le corpuscule de Malpighi

Le corpuscule de Malpighi comporte deux parties étroitement associées (*figure 2*) :

1.1. Le glomérule

Le glomérule est formé par un peloton de capillaires, entre lesquelles sont disposées les cellules conjonctives du mésangium (support architectural à potentiel contractile).

Le réseau capillaire est artériel (c'est un réseau admirable) ; il est alimenté par une artériole afférente et évacué par une artériole efférente, situées au pôle vasculaire du corpuscule. Le glomérule est le siège de la filtration initiale du sang arrivant dans l'artériole afférente.

Les cellules mésangiales, les cellules granuleuses à rénine et les cellules de la macula densa forment le complexe juxta-glomérulaire, qui intervient dans la régulation de la pression artérielle.

1.2. La capsule glomérulaire ou capsule de Bowman

La capsule glomérulaire représente l'extrémité proximale dilatée du néphron, refermée sur le glomérule. Elle aboutit au pôle urinaire du corpuscule, le tubule contourné proximal.

Sa paroi externe est un épithélium simple.

Sa paroi interne est formée par les podocytes, dont les cytotrabécules et les cytopodes englobent les capillaires glomérulaires.

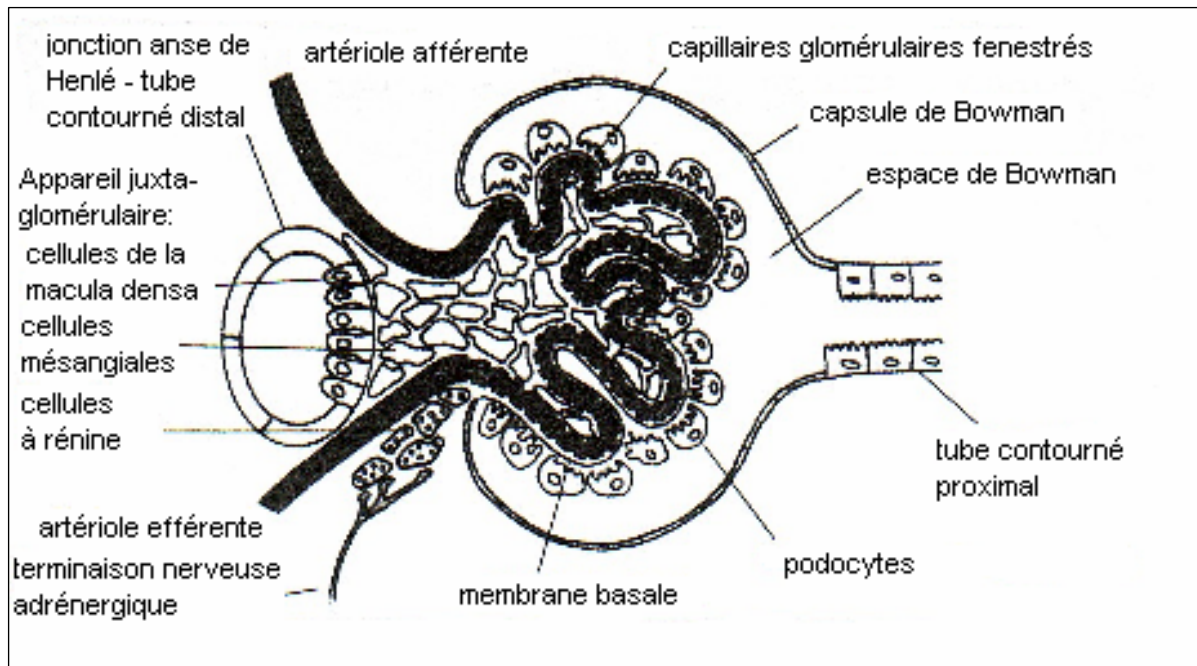


Figure 2 : Le corpuscule de Malpighi et l'appareil juxta-glomérulaire.

(D'après Koushanpour et Kriz [28])

2. La partie tubulaire du néphron

Le tubule rénal est un épithélium simple de plusieurs centimètres de longueur, pelotonné et replié sur lui-même.

Il comprend différentes parties (*figure 3 et 4*) :

- Le **tubule contourné proximal** puis le **tubule droit proximal** : Les cellules de l'épithélium ont une grande surface luminale (pôle urinaire), qui forme une bordure en brosse résultant des nombreuses microvillosités de la membrane. Le pôle basal de ces cellules contient de nombreuses mitochondries. Ces caractéristiques correspondent à des cellules assurant de multiples échanges, nécessitant une forte consommation d'énergie.

- L'**anse de Henlé** est constituée de trois parties ; branche descendante grêle, branche ascendante grêle, et branche ascendante large. Les cellules de l'épithélium de l'anse sont minces, avec peu de microvillosités. Elles ne présentent pas les caractères de cellules ayant une intense activité de transport.

- Le **tubule distal** est plus court que le tubule proximal, son épithélium est moins épais et les microvillosités apicales moins abondantes et moins hautes. Cependant, ces cellules contiennent de nombreuses mitochondries (intensité des transports actifs).

- Le **tube collecteur** comporte des cellules larges avec peu de microvillosités reposant sur une basale épaisse.

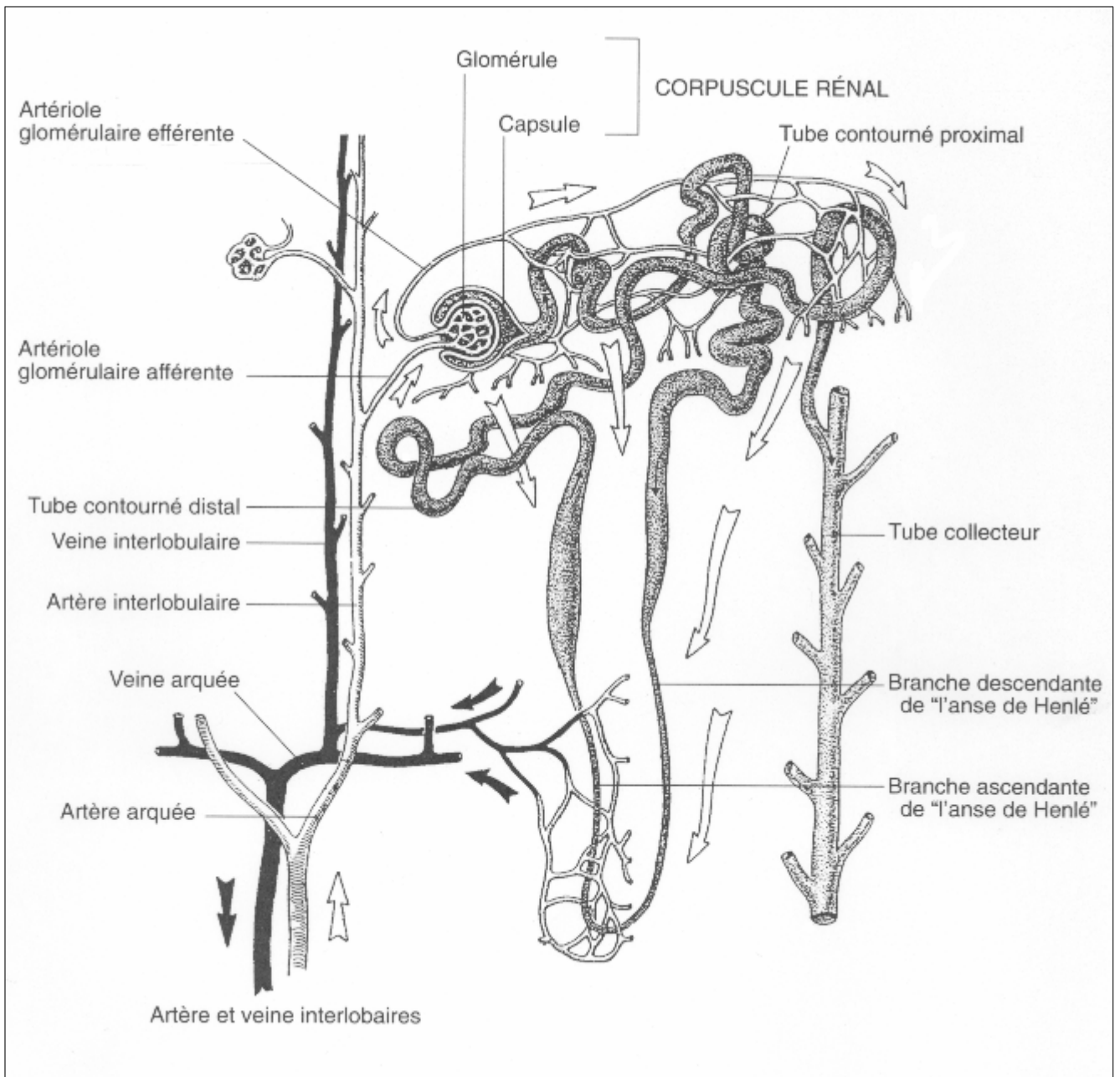


Figure 3: Schéma de la vascularisation du néphron.

(D'après Braun et al. [11])

Les cellules tubulaires, situées dans la médullaire externe, sont les moins vascularisées, alors que paradoxalement ce sont les cellules rénales qui ont un métabolisme cellulaire et une dépense énergétique élevés.

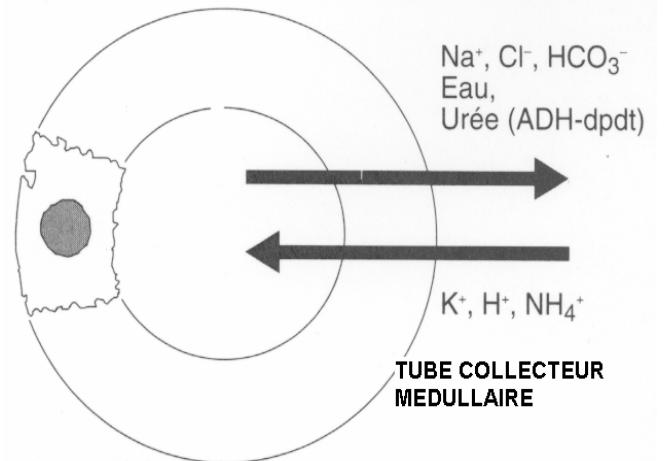
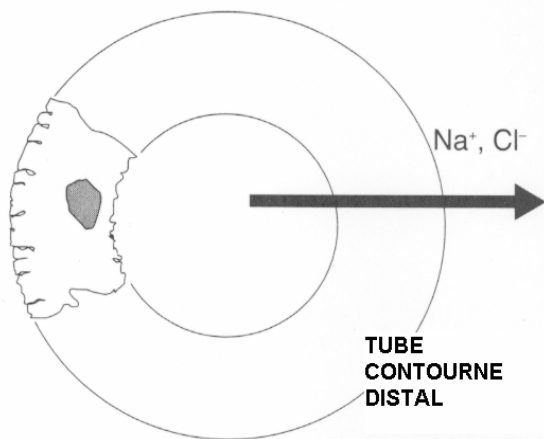
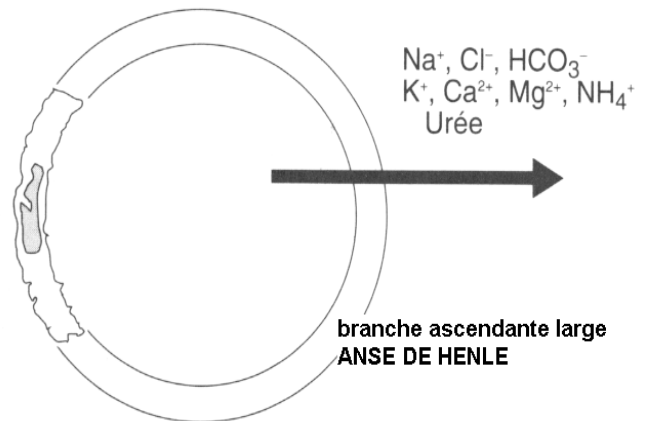
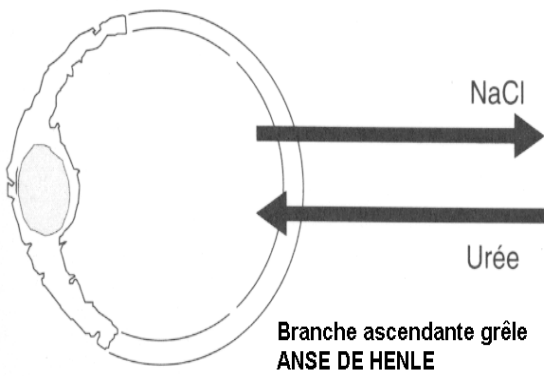
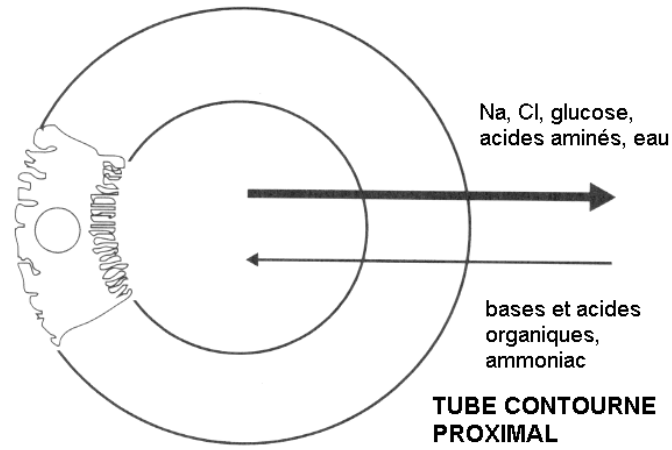


Figure 4 : Schémas morphologiques simplifiés des différents types cellulaires tubulaires et des principaux processus de transports.
(D'après Cotard [13])

3. Vascularisation des néphrons

La vascularisation du néphron est particulière ; le glomérule est alimenté par une artériole afférente. Le sang sortant du glomérule converge ensuite dans une artériole efférente dont le sang est distribué soit dans un réseau capillaire péri-tubulaire cortical, soit sous forme d'artères droites (*vasa recta*) longeant les tubules profonds vers la médullaire. En fait, cette vascularisation est beaucoup plus complexe et dépend de la localisation superficielle ou profonde des glomérules dans le cortex.

La vascularisation très dense des néphrons est indispensable aux échanges d'eau et de solutés. Elle est répartie inégalement entre les différentes parties du néphron [13] :

- 80% dans le cortex,
- 15% dans la médullaire externe et 3% dans la médullaire interne,
- 2% dans les tissus périrénaux et dans la graisse du hile.

Ainsi, les cellules tubulaires, situées dans la médullaire externe, sont les moins vascularisées, alors que paradoxalement ce sont les cellules rénales qui ont un métabolisme cellulaire et une dépense énergétique élevés. (*figure 3*)

La circulation rénale est soumise à une régulation particulière qui permet de maintenir la pression artérielle glomérulaire constante malgré les changements notables de la pression artérielle systémique (variation < 10% pour des valeurs de pression artérielle comprise entre 80 et 180 mmHg).

C. Fonctions du rein

L'activité de l'organe comporte deux fonctions différentes.

1. Fonction urinaire

a. Filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire correspond au passage de l'eau et de substances dissoutes provenant du plasma au travers du glomérule pour former l'urine primitive dans la capsule de Bowman.

Le filtre glomérulaire est constitué de l'endothélium vasculaire discontinu (capillaire fenestré), de la membrane basale glomérulaire et des prolongements des podocytes. Les dimensions des pores de ces trois écrans vont en décroissant (de 30 à 5-7nm) ; ils font obstacle aux cellules et à des macromolécules de poids moléculaires différents (>400 000 Da pour la basale, >70 000 Da pour les podocytes).

La filtration glomérulaire est un phénomène passif. Le débit de filtration glomérulaire (DFG en ml/m²/min.) correspond au volume de plasma transitant dans les glomérules par unité de temps. Il est fonction de quatre facteurs principaux :

- le gradient de pression hydrostatique entre la lumière des capillaires glomérulaires et l'espace de Bowman. Il correspond à la différence entre la pression sanguine intra-capillaire ($P_{h_{capill}}$) et la pression hydrostatique de l'urine ($P_{h_{tub}}$). Il dépend donc essentiellement de facteurs vasculaires.
- le gradient de pression oncotique entre la lumière des capillaires et l'espace de Bowman. La majorité des protéines ne passant pas le filtre glomérulaire, seules les protéines plasmatiques exercent une pression oncotique ($P_{onc_{capill}}$) qui retient l'eau dans les capillaires glomérulaires.
- le coefficient d'ultrafiltration (hf) qui caractérise la qualité du filtre glomérule donc de l'intégrité des structures décrites plus haut.

$$DFG = hf \times (P_{h_{capill}} - P_{onc_{capill}} - P_{h_{tub}})$$

b. Sécrétion et réabsorption tubulaire

L'urine primitive subit des modifications par le jeu des phénomènes de réabsorption et de sécrétion de divers éléments au travers de l'épithélium tout au long de sa progression dans les tubules rénaux.

La réabsorption correspond au transfert actif ou passif de constituants urinaires du milieu intratubulaire vers l'espace péritubulaire. Cette réabsorption concerne l'eau (plus de 99% de l'eau est réabsorbée), de nombreux électrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , PO_4^- , HCO_3^-), ainsi que l'urée, le glucose et les acides aminés.

La sécrétion correspond au transport actif de substances vers l'espace péritubulaire vers la lumière. Ce mécanisme concerne essentiellement des ions (K^+ , H^+), et des substances synthétisées par les cellules tubulaires à partir de précurseurs fournis par le sang (NH_4^+). Ceci contribue pour une grande part au maintien de l'équilibre acido-basique de l'organisme.

2. Fonction endocrine

La rénine est synthétisée par les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire lorsque la pression artérielle rénale diminue ou lorsque la concentration en sodium dans l'urine diminue au contact de la macula densa.

La rénine est l'enzyme de transformation de l'angiotensinogène plasmatique en angiotensine I, qui sera elle-même convertie en angiotensine II active, au niveau du poumon par une enzyme de conversion. L'angiotensine II a une action directe vasoconstrictrice. L'angiotensine active également la sécrétion d'aldostérone par la surrénale et ainsi, augmente la réabsorption hydro-sodée tubulaire.

Le système rénine - angiotensine contribue globalement à augmenter la volémie et la pression sanguine systémique, et donc à augmenter la filtration glomérulaire. Ce mécanisme permet au rein de réguler, à l'état normal, la perfusion glomérulaire et de contrôler la concentration sodique de l'urine définitive.

Le rein est aussi responsable de la synthèse de l'érythropoïétine, hormone stimulant l'érythropoïèse médullaire. Il participe en outre à la transformation de la vitamine D3 en son métabolite actif, le 1,25-dihydroxycholécalférol, impliqué dans le métabolisme phospho-calcique.

II. L'INSUFFISANCE RENALE

On rencontre deux types d'insuffisance rénale, en fonction de leur mode d'apparition et de leur durée d'évolution ; l'insuffisance rénale aiguë et l'insuffisance rénale chronique.

A. L'insuffisance rénale aiguë

L'insuffisance rénale aiguë est un syndrome au cours duquel la fonction rénale est brutalement altérée.

Ce syndrome, parfois réversible, se traduit par l'installation d'une oligo-anurie, responsable de troubles de l'équilibre acido-basique, de l'équilibre hydro-électrolytique et de la rétention des produits du catabolisme azoté.

Le traitement de l'insuffisance rénale aiguë est avant tout étiologique, mais la correction des désordres hydro-électrolytiques est indispensable.

On distingue trois formes d'insuffisance rénale aiguë (IRA) [8] :

- IRA pré-rénale ou fonctionnelle (hypoperfusion rénale d'origine systémique ou hypoperfusion rénale par lésions obstructives de l'artère rénale)
- IRA rénale ou parenchymateuse, caractérisée par des lésions massives d'évolution aiguë des deux reins (nécrose tubulaire post-ischémique, nécrose tubulaire toxique, néphropathie interstitielle ou néphropathie glomérulaire)
- IRA post-rénale ou obstructive (obstruction ou rupture des voies excrétrices).

La seconde partie, expérimentale, de cette thèse s'intéresse à un modèle particulier d'insuffisance rénale prérénale aiguë, l'ischémie transitoire du rein.

Cette forme d'insuffisance rénale aiguë, dite syndrome d'ischémie reperfusion, est fréquemment rencontrée chez l'homme comme chez l'animal, lors de thrombose partielle et transitoire de l'artère rénale ou lors de choc hypovolémique entraînant une hypoperfusion du rein. Il s'agit du même phénomène lors de la transplantation rénale ; en effet, la soustraction totale et prolongée du rein à la circulation lors du prélèvement du greffon entraîne des lésions de néphrose ischémique. [20]

Les lésions rénales provoquées par l'ischémie, ont été étudiées sur des modèles animaux, par clampage de l'artère rénale. Les zones les plus sensibles du néphron semblent être le segment S3 du tubule proximal, et à un moindre degré, la branche ascendante large de l'anse de Henlé [50]. Ces segments tubulaires se trouvent tous deux dans la médullaire externe du rein. Cette zone serait physiologiquement la moins vascularisée du rein [8]. Ainsi, alors que la pression partielle en oxygène est basse, les demandes métaboliques sont élevées (transports actifs des cellules épithéliales tubulaires). Un défaut de perfusion se traduit donc par un déséquilibre important « demande-fourniture » énergétique.

Suivant la durée et la sévérité de l'ischémie, les cellules tubulaires subissent soit des lésions irréversibles, nécrose ou apoptose, soit des lésions réversibles de dysfonctionnement cellulaire. La désorganisation de l'architecture cellulaire qui en résulte se traduit par un détachement des cellules de la membrane basale ; celles-ci sont évacuées dans la lumière tubulaire, obstruant alors les voies excrétrices. L'hémodynamique rénale est alors fortement perturbée.

La phase de reperfusion est caractérisée par une cascade d'événements successifs : production de radicaux oxydants, de médiateurs lipidiques, de cytokines et chémokines par les cellules endothéliales puis recrutement de leucocytes circulants, qui atteignent l'interstitium et vont à leur tour sécréter cytokines et radicaux oxydants. La libération des radicaux oxydants excède largement les capacités cellulaires de « tampon ». L'hypoxie favorise la production de collagène et diminue le renouvellement de la matrice extra-cellulaire. [20]

Ainsi, le syndrome d'ischémie reperfusion se traduit par une cascade de signaux (libération de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes), l'activation des leucocytes et engendre des lésions principalement tubulaires. Un processus de réparation se met alors en place afin de remplacer les cellules dégénérées et restaurer la fonction rénale grâce notamment à la dédifférenciation de cellules voisines [50]. (*figure 5*)

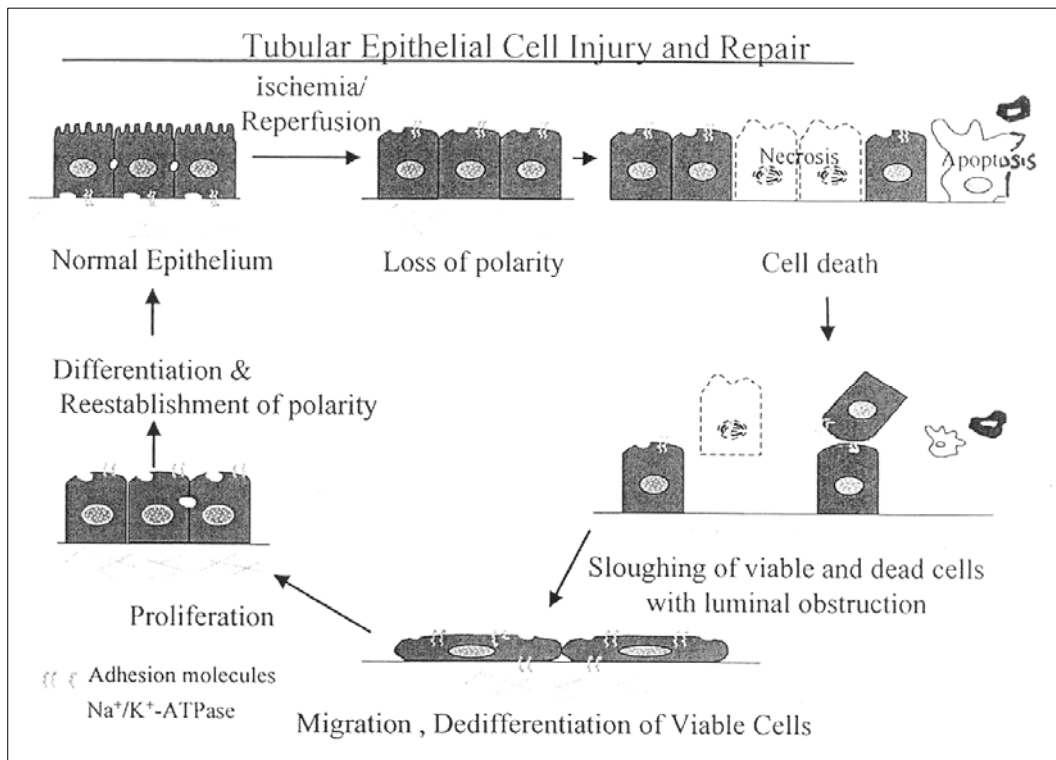


Figure 5 : Les remaniements cellulaires lors d'ischémie reperfusion du rein.
(D'après Sheridan et Bonventre [50])

Les cellules rénales saines migrent et se différencient pour reconstituer l'épithélium tubulaire lésé lors de l'ischémie-reperfusion.

Dans la majorité des cas, l'insuffisance rénale aiguë est réversible mais elle peut parfois évoluer, lorsque les lésions rénales sont étendues, vers une insuffisance rénale chronique.

B. L'insuffisance rénale chronique

En France, à l'heure actuelle, environ 33 000 personnes souffrent d'insuffisance rénale chronique terminale [33]. L'incidence de l'insuffisance rénale terminale est croissante en raison du vieillissement de la population.

En médecine vétérinaire, l'insuffisance rénale chronique représente la deuxième cause de mortalité dans les espèces canines et félines, après les tumeurs malignes [13].

Une insuffisance rénale chronique peut être la conséquence d'une grande variété d'atteintes du parenchyme rénal, qui peuvent toucher initialement les glomérules, les vaisseaux ou les structures tubulaires et interstitielles. Les lésions rénales sont alors étendues, en général bilatérales et touchent $\frac{3}{4}$ des néphrons.

Principales lésions responsables d'insuffisance rénale chronique chez le chien et le chat [13] :

- glomérulopathies (immunes, amyloïdose, néphroangiosclérose)
- néphropathies interstitielles chroniques
- pyélonéphrites chroniques
- tumeurs rénales
- anomalies héréditaires ou congénitales (maladie polykystique, dysplasie rénale, hydronéphrose bilatérale)

Les lésions rénales sont à l'origine d'une réduction progressive du nombre de néphrons fonctionnels, la diurèse est alors assurée par les néphrons non lésés.

La phase de compensation initiale est caractérisée par une hypertrophie glomérulaire des néphrons sains et par une hypertension capillaire glomérulaire, à l'origine d'une hyperfiltration. Ces mécanismes permettent de maintenir une filtration glomérulaire normale malgré la réduction néphronique.

La mise en jeu de ces mécanismes compensateurs induit des effets délétères, en particulier une sclérose glomérulaire, qui viennent s'ajouter aux lésions initiales. [13]

Ainsi, une fois établie, l'insuffisance rénale chronique évolue inexorablement et indépendamment de sa cause initiale vers l'insuffisance rénale terminale. [32, 48]

Chez l'homme comme chez l'animal, le diagnostic de l'atteinte rénale doit être précoce afin de retarder, par un traitement médical approprié, l'apparition du stade terminal de l'insuffisance rénale.

Le traitement médical et diététique vise à ralentir la progression de l'insuffisance rénale et à conserver au mieux l'état général du patient. Il s'agit de diminuer les signes cliniques liés à l'accumulation des déchets azotés et prolonger la durée de vie des néphrons sains en diminuant l'hypertension artérielle glomérulaire et le phénomène d'hyperfiltration à l'origine de la sclérose glomérulaire.

Chez l'animal, des progrès déterminants ont été réalisés au cours de la dernière décennie dans la connaissance et le traitement médical de l'insuffisance rénale chronique [13]. Cependant, la prise en charge souvent tardive des animaux et la gravité du syndrome urémique accompagnant l'insuffisance rénale terminale amène le plus souvent le propriétaire à demander l'euthanasie de son animal. Aux Etats-Unis, en Angleterre et au Japon, la transplantation rénale est parfois réalisée, chez le chat. Cependant le coût de l'opération et le débat éthique suscité par les greffes en restreignent l'application. [18]

Chez l'homme, au stade terminal, un traitement substitutif ou de suppléance par dialyse ou transplantation est mis en œuvre. Cependant, la dialyse reste très contraignante pour les patients. La transplantation rénale, quant à elle, obéit à des contraintes strictes et comporte des risques qui en limitent l'application à un nombre restreint de malades, un traitement immunosuppresseur étant obligatoire. Le petit nombre de donneurs est également un obstacle important au développement de ces greffes.

Malgré les progrès réalisés en néphrologie, l'insuffisance rénale est encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Il est nécessaire de développer des traitements préventifs visant à ralentir ou arrêter la progression de la maladie vers le stade terminal. Les néphrologues s'intéressent depuis peu à la thérapie cellulaire, qui donne des résultats encourageants dans d'autres domaines comme la cardiologie, l'orthopédie ou la neurologie.

III. LA THÉRAPIE CELLULAIRE

La thérapie cellulaire consiste à implanter des cellules, les cellules souches, au sein d'un organe ou d'un tissu lésé, afin de remplacer les cellules dégénérées, dysfonctionnelles ou absentes.

A. Notion de cellule souche

Une cellule souche est une cellule qui, placée dans un environnement approprié, est capable de se multiplier (capacité de prolifération) et de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques d'un tissu (capacité de différenciation). [41, 53]

Une cellule souche n'exprime aucune spécialisation, elle est « indifférenciée ».

En thérapie cellulaire, deux catégories de cellules souches peuvent être utilisées (*figure 6*) :

- Les cellules souches embryonnaires, qui peuvent donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme (totipotence).
- Les cellules souches adultes, qui sont, pour leur part, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence), mais limités dans leur variété.

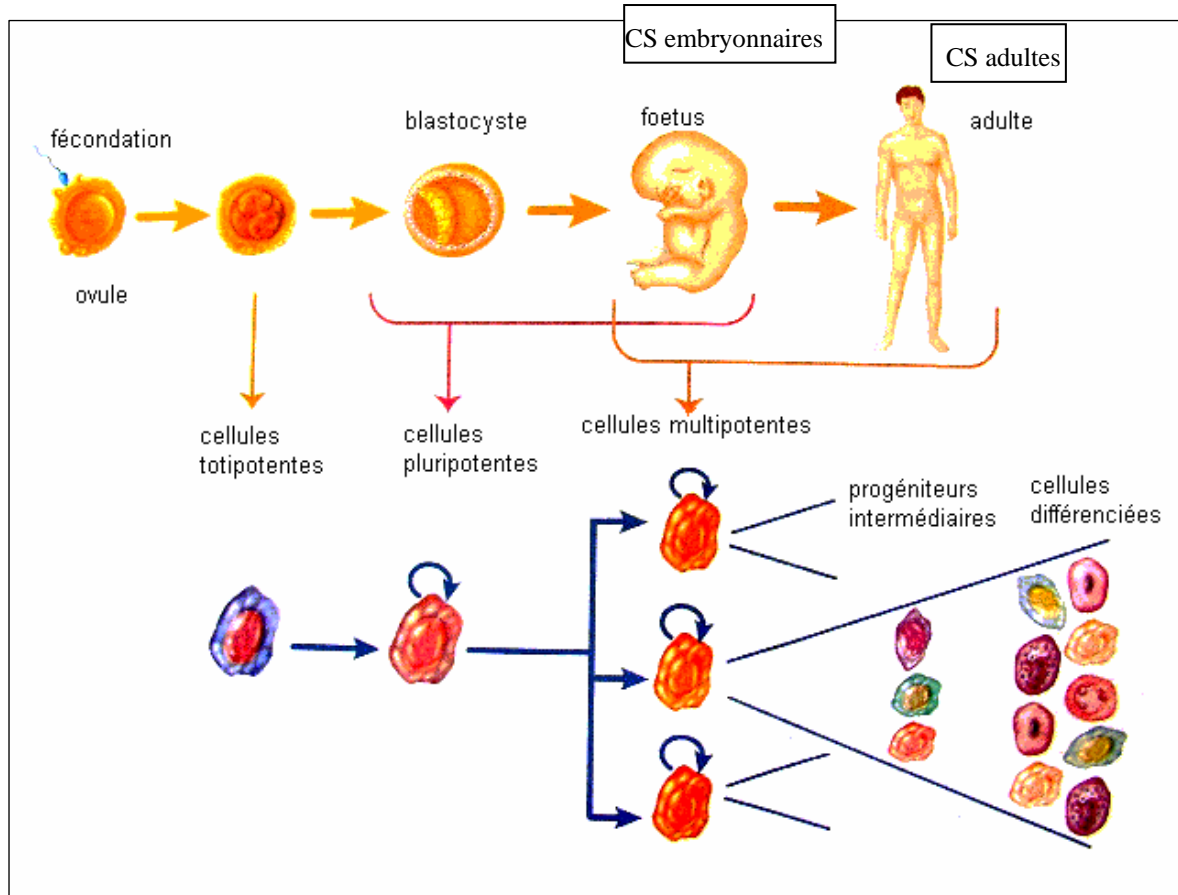


Figure 6 : Les différents types de cellules souches et leur devenir.
(D'après une brochure de l'INSERM.)

B. Les cellules souches embryonnaires

On distingue deux types de cellules souches embryonnaires :

- Les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé (jusqu'au quatrième jour), sont les seules à permettre le développement d'un individu complet.
- Les cellules du blastocyste (cinquième au septième jour après la fécondation) peuvent former tous les tissus de l'organisme (plus de 200 types cellulaires). Elles pourraient constituer un réservoir permanent de cellules pour la thérapie cellulaire.

Pour des raisons éthiques (statut juridique de l'embryon et avortement), l'utilisation des cellules souches embryonnaires est controversée et soumise à des contrôles très stricts.

Les états membres de l'Union Européenne ont adopté des positions très différentes [33]. En France, la loi de bioéthique de 1994 interdisait toute recherche sur l'embryon humain. La révision de cette loi en juillet 2004 autoriserait la recherche sur les embryons humains surnuméraires, notamment le prélèvement de cellules souches embryonnaires humaines, sous des conditions bien définies, et pour une période dérogatoire de cinq ans. La conception *in vitro* d'embryon humain à des fins de recherche ou à des fins commerciales, ainsi que le clonage thérapeutique et reproductif demeurent interdits.

C. Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes participent au renouvellement d'un organe ou un tissu, en remplaçant les cellules mortes. D'une part, à l'état quiescent, en se multipliant à l'identique, elles constituent un réservoir de cellules souches. D'autre part, elles peuvent se différencier, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer.

1. Localisation

Certaines de ces cellules souches sont situées au sein même des organes (cellules souches résidentes), par exemple les cellules des cryptes qui contribuent au renouvellement de l'épithélium intestinal. D'autres pourraient être circulantes, se localisant à distance du tissu à réparer, comme les cellules souches mésenchymateuses, situées au sein de la moelle osseuse, qui semblent participer à la régénération de différents organes (cellules souches circulantes). [19, 30]

Les cellules souches adultes résidentes suivantes ont été identifiées avec certitude chez l'homme : cellules souches nerveuses [17, 27], hématopoïétiques [46], épidermiques [47], intestinales [9], osseuses [7], pancréatiques [14], hépato-biliaires [14], rénales [38], musculaires lisses et musculaires squelettiques [45].

Certains auteurs pensent même actuellement que des cellules souches seraient présentes dans tous les organes de l'adulte, et que leurs « niches » n'auraient pas été identifiées. [1, 57]

2. Recrutement

D'une part, les cellules souches participent au renouvellement physiologique des organes (« turn over ») ; les cellules souches de trois tissus (sang, peau, intestin) fonctionnent en permanence, pour renouveler régulièrement l'ensemble des cellules différenciées qui ne se divisent plus et ont une durée de vie limitée. Ce processus serait présent dans tous les organes, dans une certaine mesure.

D'autre part, lors de lésion spécifique d'organe, les cellules souches présentes ou circulantes seraient recrutées et activées préférentiellement.

3. Potentiel de différenciation

Certaines cellules souches adultes sont unipotentes, c'est-à-dire qu'elles n'engendrent qu'un seul type de cellules différenciées. Ces cellules, dites précurseurs, sont issues des divisions des cellules souches, mais se sont déjà engagées dans une voie de différenciation et ont acquis un certain degré de spécialisation, par exemple les hépatocytes, les kératinocytes ou les myoblastes.

D'autres cellules souches adultes sont dites multipotentes : elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques, qui produisent toutes les cellules sanguines. C'est aussi le cas des cellules souches nerveuses, qui produisent les neurones, mais aussi les cellules accessoires du système nerveux (astrocytes, oligodendrocytes). Enfin, les cellules souches mésenchymateuses, localisées dans la moelle osseuse, produisent des cellules osseuses, cartilagineuses, musculaires, stromales adipocytaires et peut-être nerveuses. [14, 42, 52, 58].

4. Mise en culture et capacité de prolifération *in vitro*

Certaines cellules souches adultes se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur potentiel de différenciation : les cellules souches nerveuses, épidermiques ou mésenchymateuses, appartiennent à cette catégorie. D'autres n'ont pas ce pouvoir, soit parce qu'elles perdent leur potentiel de différenciation en se divisant (cellules souches hématopoïétiques), soit qu'elles prolifèrent très peu *in vitro* (cellules souches musculaires). Ce comportement *in vitro* n'est pas prédictif de leur potentiel prolifératif *in vivo* mais est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique.

5. La moelle osseuse : source de cellules souches

La moelle osseuse est l'un des principaux réservoirs de cellules souches. En effet, celle-ci contient des cellules souches résidentes à l'origine du renouvellement du tissu osseux et cartilagineux, mais aussi des cellules souches qui peuvent être circulantes, les cellules hématopoïétiques, et les cellules mésenchymateuses.

D. Exemples d'application de la thérapie cellulaire

Les applications de la thérapie cellulaire dépendent de l'organe ciblé. D'une part, elles sont liées à sa complexité structurale : plus l'architecture de l'organe est complexe, plus la réparation par thérapie cellulaire semble difficile à mettre en œuvre. D'autre part, plus les lésions de l'organe sont massives et étendues, plus il sera difficile de recoloniser les territoires abîmés.

Ainsi, la thérapie cellulaire est utilisée pour « réparer » les tissus suivants :

- Sang

Les premières greffes de moelle osseuse ont été réalisées en 1958, à l'institut Curie (France), sur cinq personnes irradiées suite à l'accident nucléaire de Vinca à Belgrade.

Depuis plusieurs dizaines d'années, elles sont pratiquées couramment pour le traitement de maladies sanguines comme les anémies ou les leucémies. Ainsi, le receveur malade, reçoit à partir d'un donneur sain la moelle osseuse contenant les cellules souches hématopoïétiques qui vont produire, chez le receveur, des cellules sanguines normales pendant la vie de l'individu transplanté. [47]

- Peau

Afin de réparer l'épiderme et le derme superficiel, on réalise, depuis 1980, des greffes de peau, après la multiplication en culture de cellules souches épidermiques prélevées sur une portion de peau saine du malade. [6]

- Os

En orthopédie, dans les cas de fractures avec perte de substance importante, des greffes d'os spongieux sont réalisées afin d'apporter les cellules capables de produire des cellules osseuses (ostéoblastes). Dans certains cas, des biomatériaux artificiels ainsi que des cellules souches mésenchymateuses à potentiel ostéogène (isolées à partir de la moelle osseuse du patient) peuvent être implantées. [12]

Des découvertes récentes ont remis en cause certains concepts. En effet, certains organes, considérés jusqu'alors comme post-mitotiques (sans capacité de régénération), possèdent en réalité des cellules souches qui participent au « turn over » physiologique de l'organe. [14]

- Cerveau

L'implantation de neurones foetaux permettrait d'améliorer la symptomatologie des malades atteints des maladies de Parkinson ou de Huntington. [3]

- Pancréas

Il existe de rares exemples de greffes de pancréas ou de cellules sécrétrices d'insuline dans des diabètes instables, mais la généralisation de ce type de greffe n'est pas envisageable actuellement. [49]

- Cœur

La cardiomyoplastie cellulaire repose sur l'apport de cellules diverses (cardiomyocytes foetaux, cellules musculaires lisses ou squelettiques...), pour améliorer les performances contractiles du cœur, dans le cadre du traitement de la cardiomyopathie dilatée et de l'infarctus du myocarde [35, 40, 56-57]. Les études en cardiologie sont déjà très avancées et ont donné lieu à plusieurs essais cliniques de grande taille dont les résultats sont attendus avec le plus grand intérêt.

A l'heure actuelle, en néphrologie, les chercheurs tentent d'appliquer la thérapie cellulaire à la réparation du tissu rénal.

IV. LA THERAPIE CELLULAIRE EN NEPHROLOGIE

Des études récentes (2001-2004), peu nombreuses, se sont intéressées au potentiel de différenciation des cellules souches adultes en cellules rénales. (*figure 7*)

Deux axes de recherche ont été suivis :

- Recherche expérimentale sur modèles animaux : la plupart de ces études ont été effectuées sur des rongeurs, avec des cellules souches adultes. Après irradiation, les rongeurs reçoivent une greffe hétérologue de cellules souches, par injection dans une veine périphérique.

- Recherche clinique : dans le cadre de la transplantation rénale chez l'homme, deux études ont évalué le potentiel d'intégration de cellules « extra-rénales » (cellules du receveur) dans les reins transplantés (tissu du donneur).

A. Modèles animaux

Il s'agit, sur ces modèles, de transplantation de moelle osseuse d'une souris donneuse vers une souris receveuse. La problématique est de reconnaître les cellules injectées pour étudier leur devenir chez le receveur. Différentes options méthodologiques ont été adoptées par les équipes de chercheurs, utilisant des modèles transgéniques ou se basant sur la reconnaissance du chromosome Y, après injection de cellules mâles à des souris femelles. Pour permettre la prise de greffe des cellules injectées, les auteurs ont eu recours à des thérapies immunosuppressives (irradiation des souris receveuses).

Ces études ont été menées sur des modèles animaux sains, pour explorer la faisabilité de la thérapie cellulaire sur le rein, puis sur des animaux malades, pour évaluer, dans une certaine mesure, le potentiel thérapeutique des cellules souches.

1. Animaux sains

Dans l'étude de Imasawa et al. [23], les cellules greffées, marquées par une protéine fluorescente, la GFP, sont retrouvées dans l'interstitium rénal en nombre croissant, jusqu'à 24 semaines après la greffe. Elles se stabilisent alors à 12% des cellules rénales. Ces cellules expriment à leur surface les marqueurs spécifiques des cellules mésangiales glomérulaires et, remises en culture, expriment les fonctions spécifiques des cellules mésangiales (contraction en réponse à une stimulation angiotensine).

Dans l'étude de Poulson et al. [44], se basant sur la reconnaissance du chromosome Y, les souris sont sacrifiées de 7 à 13 semaines après la greffe. Les cellules souches greffées sont retrouvées dans le rein sous la forme de cellules épithéliales tubulaires pour la majeure partie, et de cellules glomérulaires. Ces cellules marquées représentent 3-8% des cellules totales du rein.

Ces résultats suggèrent que le rein se régénère physiologiquement à partir des cellules souches circulantes, issues de la moelle osseuse. Ces cellules souches de la moelle osseuse pourraient se différencier en cellules tubulaires (cellules épithéliales) ou en cellules glomérulaires (podocytes ou cellules mésangiales).

2. Animaux malades

D'autres études ont été effectuées de manière comparative sur des modèles animaux sains et malades :

Les études de Lin et al. [34] et de Kale et al. [26] se sont intéressées au potentiel d'intégration de cellules souches dans le rein, lors de lésion d'ischémie reperfusion, réalisée chez la souris par clampage de l'artère rénale durant 15 à 30 minutes.

Dans les deux cas, les cellules souches marquées ont été retrouvées principalement dans les tubules proximaux de la médullaire externe des reins ayant subi la lésion d'ischémie reperfusion ; 20% (Kale et al.) à 80% (Lin et al.) de ces tubules contiennent au moins une cellule marquée. De rares cellules marquées ont été retrouvées dans les reins contralatéraux sains. Ces résultats révèlent un adressage spécifique des cellules souches vers l'organe lésé et plus spécifiquement les zones en souffrance lors de l'ischémie (segments S3 des néphrons). Ces cellules expriment à leur surface des marqueurs spécifiques rénaux. De plus, le dosage de l'urémie et la créatininémie plasmatiques dans l'étude de Kale et al. révèle une baisse significative de l'urémie des souris greffées par rapport aux souris témoins, laissant supposer un effet bénéfique de la greffe cellulaire.

Selon le même protocole, Ito et al. [25] ont induit, chez des rats, une glomérulonéphrite immune avec l'anticorps anti-Thy1, entraînant une protéinurie et une mésangiolyse sévère. Chez les rats témoins non glomérulonéphritiques, les cellules marquées ont principalement été retrouvées dans l'interstitium, peu de cellules marquées étaient présentes dans les glomérules. Chez les rats malades, les cellules marquées contribuaient à l'hypercellularité glomérulaire, sous forme de cellules mésangiales.

Imasawa et al. ont montré, dans leur étude sur des souches de souris atteintes de néphropathie à IgA [22], que la greffe de cellules souches de la moelle osseuse saine permet d'atténuer les dépôts mésangiaux de C3 et d'IgA, ainsi que la glomérulosclérose chez les souris malades. Des cellules marquées ont été mises en évidence dans les glomérules des souris greffées. En effet, les souris irradiées n'ont plus de moelle osseuse (déplétion complète) : les cellules souches transplantées permettent non seulement de créer une nouvelle immunité, en recolonisant la moelle osseuse du receveur, mais aussi participent au remodelage glomérulaire du rein.

Enfin dans une étude récente [37], Morigi et al. ont travaillé sur un modèle murin d'insuffisance rénale aiguë induite par le cysplatine, agent anticancéreux. L'équipe a révélé que la greffe de cellules souches mésenchymateuses aux souris malades permettait, en partie, la réparation des tubules rénaux et améliorait la fonction rénale. Au contraire, la greffe de cellules souches hématopoïétiques ne montre pas d'effet bénéfique pour les reins des animaux malades.

B. Chez les patients transplantés

Deux études [36, 44] se sont intéressées aux reins d'hommes transplantés avec des reins de femmes. Les biopsies réalisées ont mis en évidence la présence de cellules souches marquées (chromosome Y) au sein du parenchyme rénal. Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques de cellules rénales différenciées (cellules épithéliales tubulaires) ou ont la morphologie des podocytes. Ces résultats suggèrent que des cellules non identifiées, dites « extra-rénales » colonisent le tissu rénal greffé, sous forme de cellules rénales fonctionnelles.

Toutes ces études laissent penser que, chez les rongeurs comme chez l'homme, des cellules souches extra-rénales peuvent intégrer le rein et se différencier en cellules rénales fonctionnelles (cellules épithéliales tubulaires, podocytes ou cellules mésangiales). Une lésion rénale augmenterait le recrutement de ces cellules extra-rénales et orienterait leur différenciation préférentiellement vers les zones lésées.

Notre étude, développée dans la seconde partie de cette thèse, a débuté il y a deux ans, lors de la publication des premiers articles sur le sujet (2001-2002), afin d'approfondir les connaissances sur les applications de la thérapie cellulaire en néphrologie.

Figure 7 : Tableau de comparaison des études expérimentales réalisées en 2001-2004, sur l'application de la thérapie cellulaire en néphrologie. (pages 34,35)

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses.
CSMO : Cellules Souches de la Moelle Osseuse.
I-R : Ischémie - Reperfusion.

Auteur et titre de l'article	Poulsom <i>et al.</i> (2001) <i>Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration</i> [43]	Imasawa <i>et al.</i> (2001) <i>The potential of bone marrow derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells</i> [23]	Ito <i>et al.</i> (2001) <i>Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling</i> [25]	Imasawa <i>et al.</i> (2002) <i>Stem cells in renal biology : bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy</i> [22]
Objectifs	Montrer que des cellules « extra-rénales » peuvent contribuer au renouvellement et à la réparation du tissu rénal, chez l'homme et chez la souris.	Montrer que les cellules souches de la moelle osseuse peuvent se différencier en cellules mésangiales rénales.	Montrer que les CSMO participent au renouvellement des cellules glomérulaires, lors de glomérulonéphrite.	Montrer qu'une transplantation de moelle osseuse de souris normales à des souris atteintes de néphropathie à IgA peut atténuer les lésions glomérulaires de ces dernières.
Modèle	Souris femelles irradiées ayant reçu une greffe de moelle osseuse de souris mâles. Biopsies de reins d'homme transplantés avec des reins de femme.	Souris de souche B6 irradiées et transplantées avec la moelle osseuse de souris transgéniques pour la protéine GFP.	Rats sauvages irradiés et transplantés avec la moelle osseuse de rats EGFP.	Souris atteintes de néphropathie à IgA (souris HIG A) irradiées, puis transplantées avec la moelle osseuse de souris de souche B6. Souris témoin HIG A, transplantées avec la moelle osseuse de souris HIG A.
Marqueur	Chromosome Y	Protéine fluorescente GFP	Protéine fluorescente EGFP marquant les CSMO transplantées.	Cellules des souris B6.
Cellules sources utilisées et voie d'injection	CSMO injectées dans la veine de la queue de souris. Cellules « extra-rénales » du receveur pour les hommes.	CSMO, injectées dans la veine de la queue de souris.	CSMO, injectées dans la veine de la queue de rats.	CSMO, injectées dans une veine périphérique.
Lésion	Pas de lésion chez la souris. Ischémie transitoire lors de la transplantation rénale chez l'homme.	Pas de lésion.	Induction d'une glomérulonéphrite (mésangiolyse) par injection d'anticorps anti-Thy1, 21 jours après la greffe de moelle osseuse.	Lésions glomérulaires (dépôts mésangiaux d'IgA et C3, sclérose glomérulaire).
Résultats	Dans les deux cas, des cellules marquées ont été retrouvées dans le rein, essentiellement sous la forme de cellules épithéliales tubulaires, mais aussi, en moins grand nombre, sous la forme de cellules glomérulaires. Chez les souris, les cellules de la moelle osseuse représentent 3-8% du parenchyme rénal, ce qui serait le <i>turn over</i> physiologique de l'organe. Chez l'homme, 24 % des tubules contiennent le chromosome Y.	Les cellules marquées ont été retrouvées dans le mésangium rénal. Celles-ci expriment à leur surface la desmine, et se contractent en réponse à une stimulation à l'angiotensine II. Le nombre de cellules marquées retrouvées augmente en fonction du temps (de 2 à 24 semaines après la greffe).	Chez les animaux malades, 11 à 12% des cellules glomérulaires sont marquées. Le nombre de ces cellules augmente au cours de l'évolution de la mésangiolyse puis se stabilise à 7-8%. Ces cellules sont identifiées comme appartenant au groupe des cellules mésangiales.	Les lésions de glomérulosclérose sont significativement moins importantes chez les souris B6 → HIG A que chez les souris HIG A → HIG A. L'albuminurie est également moins importante. Le taux circulant d'immunoglobulines est moins élevé chez les souris transplantées avec les CSMO des souris B6.
Conclusion	La moelle osseuse contribue au <i>turn over</i> physiologique du rein et à sa réparation après lésion.	Les cellules dérivées de la moelle osseuse peuvent intégrer le rein et se différencier en cellules mésangiales glomérulaires.	Les cellules de la moelle osseuse peuvent se différencier en cellules mésangiales.	Les cellules de la moelle osseuse transplantée remplacent les cellules immunitaires des receveurs, mais aussi participent à la régénération des cellules glomérulaires de ces derniers.

Auteur et titre de l'article	LIN F et al. (2003) <i>Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice</i> [34]	KALE S et al. (2003) <i>Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule</i> [26]	MORIGI B et al. (2004) [37] <i>Mesenchymal stem cells are Renotopic, Helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure</i>	OLIVER JA et al. (2004) <i>The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells</i> [38]
Objectifs	Montrer que les CSH peuvent contribuer à la régénération des cellules de l'épithélium tubulaire rénal, après une lésion d'ischémie reperfusion rénale.	Montrer que les CSMO sont mobilisées après ischémie rénale transitoire, et qu'elles s'intègrent spécifiquement dans les zones lésées du tubule rénal.	Montrer que l'injection de CSM ou de CSH peut améliorer la fonction rénale et participer à la régénération des tubules lésés suite à l'injection de cysplatine.	Prouver l'existence de cellules souches rénales.
Modèle	Souris femelles sauvages irradiées, puis transplantées avec des CSH de souris mâles Rosa 26, après ischémie reperfusion d'un rein (survie 4 semaines après greffe).	Souris C57BL/6J irradiées, puis transplantées avec des CSMO de souris Rosa26 transgéniques. (survie 3 à 12 semaines après la greffe).	Rats et souris de trois jours, ayant reçu des pulses de BrdU pendant 3,5 jours. Sacrifice et étude des reins 2 mois plus tard.	
Marqueur	βgalactosidase, exprimée par les CSH des souris sauvages Rosa 26 et Chromosome Y.	Gène Lac Z bactérien exprimé par les cellules des souris Rosa26.	BrdU, marqueur du noyau des cellules en division.	
Cellules souches utilisées	CSH, injectées dans la veine de la queue des souris, juste après l'I/R rénale.	CSMO, injectées dans le sinus rétro-orbitaire des souris juste après l'I-R rénale.	CSH ou CSM, injectées dans une veine périphérique.	Cellules souches rénales.
Lésion	Ischémie unilatérale transitoire d'un rein, par clampage de l'artère rénale (15 minutes).	Ischémie unilatérale transitoire d'un rein, par clampage de l'artère rénale (30 minutes).	Lésions tubulaires suite à l'insuffisance rénale aiguë provoquée par l'injection de cysplatine (augmentation significative de l'urée plasmatique 4 jours après l'injection).	Pas de lésion chez le premier groupe. Ischémie rénale transitoire dans un deuxième groupe puis sacrifice 3 semaines plus tard.
Résultats	Les cellules marquées ont été identifiées principalement dans les tubules proximaux rénaux (médullaire externe). Elles expriment à leur surface des marqueurs spécifiques des cellules rénales. Environ 8 % des cellules rénales sont marquées. Environ 80 % des tubules proximaux des reins ischémisés contiennent au moins une cellule marquée. Chez les souris témoins, aucune cellule marquée n'a été retrouvée dans les tubules. Dans les reins controlatéraux, de rares cellules marquées ont été retrouvées.	Environ 20% des tubules de la médullaire externe contiennent des cellules marquées. L'injection des CSMO diminue le degré d'insuffisance rénale aiguë, les souris témoins ayant une urémie plus élevée après l'ischémie que les souris greffées.	L'injection des CSM un jour après l'injection de cysplatine améliore la fonction rénale par rapport aux souris témoins (urée plasmatique significativement inférieure à J4). De nombreuses CSM marquées sont retrouvées dans les tubules. Chez le groupe greffé avec des CSH, l'urée plasmatique est restée à un taux comparable à celle des souris témoins. De rares CSH marquées ont été retrouvées au niveau des tubules lésés.	Les cellules marquées sont retrouvées principalement dans la papille. Mises en culture, ces cellules forment des agrégats, expriment des marqueurs de cellules épithéliales ou mésangiales et sont pluripotentes. Lors d'I-R rénale, le signal de marquage disparaît de la papille du rein ischémié. (le signal reste identique dans le rein sain). Cependant, il n'y a pas de signe d'apoptose dans cette zone du rein. Les cellules en division semblent avoir migré vers les zones en souffrance.
Conclusion	Les CSH, sélectionnées en culture, participent à la régénération de l'épithélium tubulaire rénal, chez la souris, après lésion d'I-R. L'intégration de ces cellules aux tubules rénaux semble être favorisée par la lésion rénale.	Chez la souris, les CSMO se différencient en cellules épithéliales tubulaires, après I-R rénale. Ces cellules constituent même la majorité des cellules à l'origine de la régénération du segment S3 du tubule rénal.	Les CSM injectées contribuent à la régénération des tubules rénaux et améliorent la fonction rénale. L'injection des CSH n'a pas eu d'incidence.	La niche des cellules souches rénales se trouve dans la papille rénale.

DEUXIEME PARTIE
TRAVAIL PERSONNEL

BUT DE L'ETUDE

Le but de l'étude a été d'évaluer le potentiel d'intégration dans le rein, de cellules souches mésenchymateuses amplifiées en culture, après transplantation autologue *via* l'artère rénale, sur un modèle ovin d'ischémie reperfusion.

Cette étude a été réalisée sur deux groupes d'animaux : un groupe de brebis témoin et un groupe de brebis malades.

Elle a comporté les étapes suivantes :

- Mise au point d'une technique de sélection, de multiplication de cellules souches mésenchymateuses de brebis.
- Mise au point d'une technique de marquage de ces cellules souches mésenchymateuses.
- Création d'un modèle ovin d'ischémie reperfusion.
- Etude du devenir et de l'intégration, dans le rein, des cellules souches mésenchymateuses injectées dans l'artère rénale ; localisation par révélation de marqueurs cellulaires pré-intégrés aux cellules injectées, identification de leur différenciation par révélation de marqueurs de surface spécifiques des cellules rénales, étude du recrutement préférentiel de ces cellules en fonction des lésions et du délai de réalisation de la greffe.

PROTOCOLE

L'ensemble du travail expérimental sur animal a été mené au centre d'expérimentation et de recherche appliquée IMM RECHERCHE, Institut Mutualiste Montsouris, à Paris. Les expérimentations ont été réalisées en accord avec le « Guide for the care and the use of Laboratory Animals » et le protocole de ce travail de recherche a été validé par le comité d'éthique de la Fondation de l'Avenir.

Le travail de recherche a été réalisé sous la direction du Dr. Kathleen LABORDE, et subventionné par une bourse de la Fondation de l'Avenir.

Mon stage d'un an au sein de l'IMM Recherche m'a permis de contribuer à ce protocole de recherche, mené par le Dr Luc BEHR. J'ai intégré le programme de recherche au début d'une nouvelle étape du projet. En effet, dans l'étude précédente, Luc BEHR avait démontré le potentiel d'intégration dans le rein des cellules souches mésenchymateuses, et leurs facultés de différenciation [5]. Une dernière question restait alors à élucider : quel est le délai optimal de réalisation de la greffe cellulaire après la lésion ? Un dernier groupe de brebis avec greffe cellulaire immédiatement après la lésion a alors complété l'étude. Ainsi, j'ai pu participer aux interventions chirurgicales de ponction de moelle osseuse et de cathétérisme interventionnel sur ce dernier groupe, nommé groupe II. J'ai également collaboré avec le Dr Mehrak HEKMATI pour les travaux *in vitro* de culture cellulaire avant la greffe des CSM, et pour l'analyse immunohistochimique des prélèvements anatomopathologiques.

I. MATERIEL ET METHODE

L'étude comprenait plusieurs étapes sur chaque animal :

- Tout d'abord, un prélèvement de moelle osseuse a été réalisé afin de mettre en culture, d'isoler et d'amplifier des cellules souches mésenchymateuses en quantité suffisante.
- Les animaux témoins sont sains alors que les animaux « malades » ont subi une ischémie reperfusion d'un seul rein.
- Les cellules souches mésenchymateuses ont alors été injectées dans le rein ischémié ou dans un seul rein pour le groupe témoin, avec un délai de réalisation de la greffe après la lésion variable en fonction des groupes.
- Après une durée de survie variable en fonction des groupes, les animaux ont été sacrifiés et leurs reins prélevés pour analyse.

A. Matériel

1. Les animaux

1.1 Caractéristiques des brebis

Dix huit brebis de race PréAlpes du Sud, âgées ont été utilisées dans cette étude. L'ensemble des expérimentations a été réalisé avec un souci permanent du bien-être des animaux.

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. Enfin, un numéro de travail leur a été attribué à l'entrée dans l'élevage du laboratoire.

1.2 Conditions d'élevage des brebis

Les animaux sont issus d'élevage de station de reproduction de l'INRA, élevage garanti indemne de toute maladie légalement réputée contagieuse. 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 traitement anti-parasitaire a été systématiquement effectué, par injection d'ivermectine IVOMEC® 400 µg par voie sous-cutanée.

Avant l'entrée en protocole et entre les périodes opératoires, les brebis ont été hébergées en bergerie paillée et pâture restrictive, à la ferme expérimentale de Bligny. Elles étaient nourries avec foin et granulés, et disposaient d'eau à volonté.

De façon à acclimater les animaux aux locaux et à limiter le stress lié au transport, les animaux ont été amenés au laboratoire 48 heures avant l'intervention chirurgicale. Ils ont également été gardés 48 heures en surveillance postopératoire.

Les animaux ont été placés dans des cages de neuf mètres carrés sur caillebotis, par groupe de deux ou trois. Un cycle diurne nocturne de 12 heures / 12 heures est appliqué. Un aliment complet en granulés ainsi que de l'eau à volonté leur ont été proposés.

1.3 Répartition des groupes, chronologie des actes chirurgicaux et des prélèvements biologiques (*figure 7*)

Dix-huit brebis d'âge moyen 2.8 ans (DS=0.7) et de poids moyen 60kg (DS=6.8) ont été alotées en trois groupes différents par tirage au sort (groupe I, II, III). Le groupe III a été scindé en deux sous-groupes IIIa et IIIb.

Groupe I (témoin) : 3 brebis témoins âgées de 2.7 ans en moyenne (DS=1.2) pour un poids moyen de 63.7 kg (DS=5.0) qui ont subi le protocole suivant :

J0 : ponction de moelle osseuse.

J15 : greffe des CSM par voie intra-artérielle dans l'artère d'un seul rein.

J35 : prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

Groupe II (greffe immédiatement après la lésion, survie courte) : 5 brebis âgées de 3.2 ans en moyenne (DS=0.8), pour un poids moyen de 61.2 kg (DS=8.5) qui ont subi le protocole suivant :

J0 : ponction de moelle osseuse.

J15 : réalisation d'une ischémie rénale unilatérale transitoire de 45 minutes puis greffe des CSM par voie intra-artérielle dans l'artère du rein ischémié 30 minutes plus tard.

J35 : angiographie de contrôle puis prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

Groupe IIIa (greffe 15 jours après la lésion, survie courte) : 5 brebis âgées de 2.6 ans en moyenne (DS=0.5) pour un poids moyen de 54.5 kg (DS=6.0) qui ont subi le protocole suivant :

J0 : ponction de moelle osseuse et réalisation simultanément d'une ischémie rénale unilatérale transitoire de 45 minutes.

J15 : greffe des CSM par voie intra-artérielle dans l'artère du rein ischémié

J35 : angiographie de contrôle puis prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

Groupe IIIb (greffe 15 jours après la lésion, survie longue) : 5 brebis témoins âgées de 2.6 ans en moyenne (DS=0.5) pour un poids moyen de 62.4 kg (DS=4.6) qui ont subi le protocole suivant :

J0 : ponction de moelle osseuse et réalisation simultanément d'une ischémie rénale unilatérale transitoire de 45 minutes.

J15 : greffe des CSM par voie intra-artérielle dans l'artère du rein ischémié.

J55 : angiographie de contrôle puis prélèvement des reins pour analyse anatomopathologique.

Prélèvements sanguins : Le protocole a été identique pour tous les animaux.

- Lors du prélèvement de moelle osseuse, une prise de sang a été réalisée pour dosage de l'urée et la créatinine plasmatique.

- Deux prises de sang ont été réalisées dans la veine rénale du rein ischémié, avant et après l'obstruction de l'artère rénale, pour dosage de l'activité rénine plasmatique (ARP).

- Lors de la greffe des CSM puis au moment du sacrifice, une prise de sang veineuse périphérique a été réalisée pour dosage de l'urée et de la créatinine plasmatique.

2. Les cellules

Les cellules greffées sont des cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées et amplifiées en culture, à partir de la moelle osseuse de l'animal adulte. Le protocole est décrit dans le paragraphe ci-dessous.

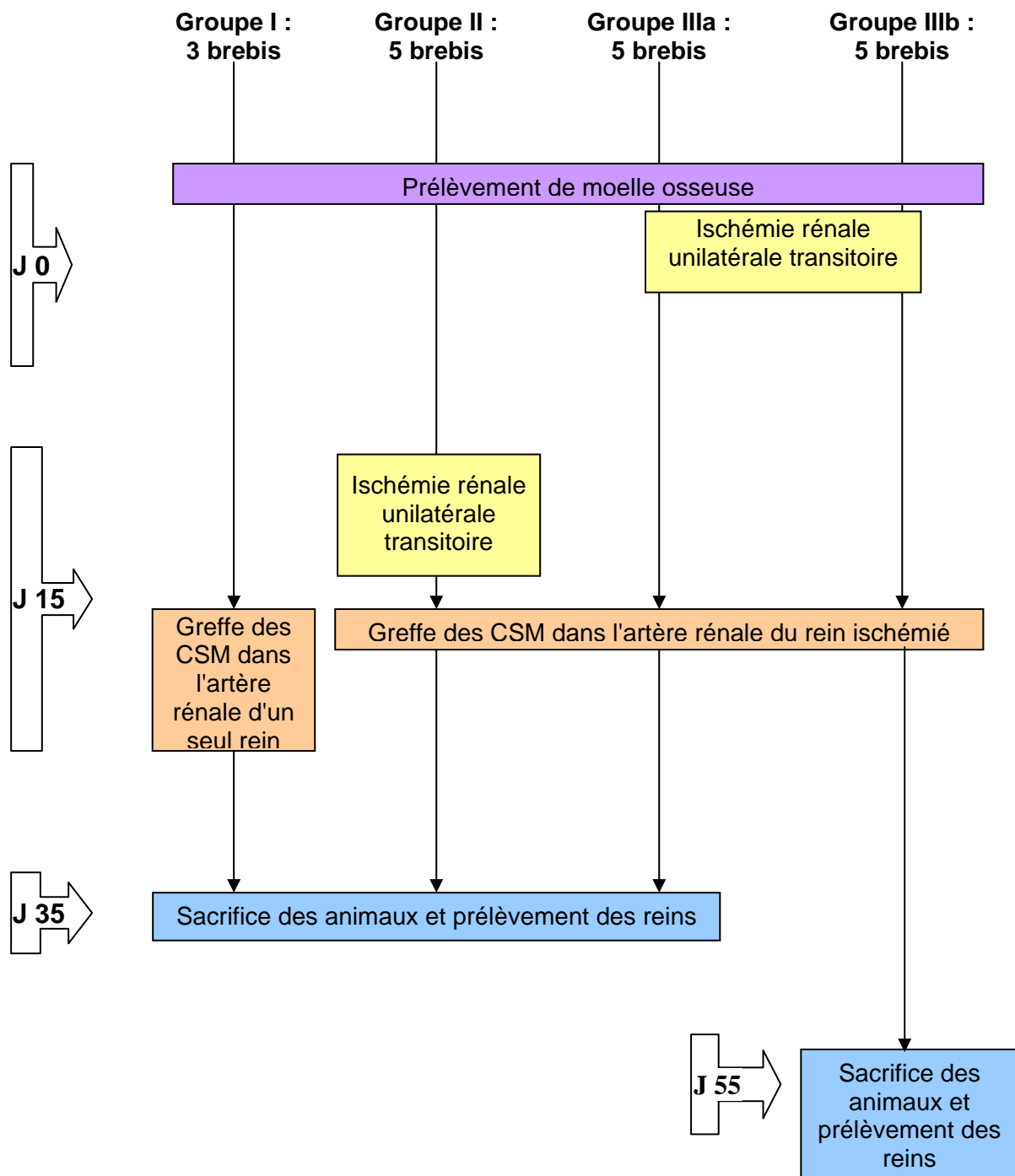


Figure 8 : Répartition des groupes et chronologie des actes chirurgicaux.

Groupe I : groupe témoin.

Groupe II : greffe cellulaire immédiatement après la lésion, survie courte (20 jours).

Groupe IIIa : greffe cellulaire 15 jours après la lésion, survie courte (20 jours).

Groupe IIIb : greffe cellulaire 15 jours après la lésion, survie longue (40 jours).

B. Méthode

1. Prélèvement de moelle osseuse

Le prélèvement de moelle osseuse a été la première étape du protocole, réalisé afin de mettre en culture et de sélectionner les CSM.

1.1 Anesthésie

Pour toutes les interventions, les animaux ont été anesthésiés de la même façon pour s'affranchir des variations dues à l'anesthésie.

Les brebis sont mises à jeun 24 heures avant l'intervention.

Dix minutes avant l'induction, les brebis ont reçu une prémédication avec du midazolam (HYPNOVEL[®], 2mg/kg IV).

L'induction a été réalisée par injection intraveineuse de Thiopenthal sodique (10mg/kg NESDONAL[®]).

Les animaux ont ensuite été intubés et placés sous anesthésie gazeuse en respiration contrôlée par 1.5 à 2 % d'ISOFLURANE[®] dans 100% d'oxygène.

Une sonde gastrique a été placée à demeure durant l'intervention afin d'éviter la météorisation et les fausses déglutitions au réveil.

La surveillance anesthésique comportait un électrocardiogramme, la mesure de pression artérielle invasive, et la capnométrie.

Dans un souci du bien être animal et parce que l'évaluation de la douleur est difficile à réaliser, les animaux ont été systématiquement traités à la morphine (MORPHINE MERAM[®], 2mg/kg IM).

Une antibioprophylaxie a été réalisée pour tous les animaux, à chaque intervention, par l'injection de céfalexine (RILEXINE[®], 15mg/kg IV) en début d'intervention et répétée toutes les deux heures en peropératoire si nécessaire.

1.2 Technique de ponction de moelle osseuse

Les ponctions de moelle osseuse ont été réalisées, sur animal anesthésié, en quatre sites différents :

- les deux tubercules majeurs huméraux,
- et les deux tubérosités tibiales.

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. Des lavages successifs à l'aide de désinfectants à base de polyvinylpyrrolidone iodée ont été réalisés pour obtenir l'asepsie chirurgicale.

Un trocart de Mallarmé de 16 gauges a été introduit par voie percutanée jusque dans la cavité médullaire en regard des sites de ponction. Une fois en place, le mandrin a été retiré et une seringue de 10 ml à luer-lock a permis le recueil de la moelle.

La seringue était préalablement remplie avec 1.5 ml d'héparine (HEPARINE CHOAY®) afin d'éviter le piégeage des cellules par la formation de caillot lors de l'aspiration de la moelle osseuse.

Le volume prélevé a été de 2 à 5 ml de moelle par site de ponction. Le prélèvement a ensuite été homogénéisé en agitant la seringue.

L'aspirât a été transféré dans un flasque de 75 cm² contenant 30 ml de milieu de culture complet (DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO®) et placé à l'étuve.

Ainsi, quatre flasques ont été mis en culture.

2. Culture et amplification cellulaire

La technique de culture et de caractérisation a été couramment décrite dans la littérature [7, 24, 56] et nous avons suivi ces méthodes.

2.1 Produits utilisés

- 1- DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax-1, sodium pyruvate, pyroxidine, 4500 mg/L glucose, GIBCO®.
- 2- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7,2/0,1M, GIBCO®.
- 3- Trypsine (1X), GIBCO®.
- 4- Sérum de Veau Fœtal (SVF), GIBCO®.
- 5- Pénicilline/Streptomycine, GIBCO®.
- 6- Milieu de culture des CSM (DMEM complété) : DMEM 79 + SVF 20% + Péni/Strepto 1%.

2.2 Technique

Les quatre flasques contenant la moelle osseuse ont été placés pendant trois jours à l'étuve (température : 37°C, atmosphère humide, saturation en CO₂ : 5%).

Les cellules souches mésenchymateuses sont caractérisées par leurs propriétés d'adhérence au support de culture, tandis que les autres familles de cellules restent en suspension dans le milieu. Ainsi, le délai de trois jours a permis aux CSM de se fixer au fond du flasque.

Une observation quotidienne au microscope optique inversé (Olympus®, LH50A) a permis de suivre l'adhérence et la prolifération cellulaire.

Changement de milieu

Un changement de milieu a été nécessaire pour la survie et l'amplification des cellules.

Trois jours après le prélèvement, le surnageant a été retiré des flasques par aspiration. Puis les cellules souches mésenchymateuses ont été lavées trois fois de suite avec 10 ml de milieu complet DMEMc. Au microscope, les CSM adhérentes apparaissaient sous forme allongée au fond du flasque. Elles étaient, 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.

Les flacons ont ensuite été replacés dans l'incubateur (CO₂ à 5%, atmosphère humide, 37°C).

Repiquage

Lorsque les cellules ont atteint plus de 70 % de confluence (formation d'un tapis cellulaire), un repiquage a été effectué. Il a permis d'augmenter la surface de culture cellulaire et ainsi d'atteindre le nombre de cellules nécessaire à la greffe.

De même, le surnageant des flacons a été retiré par aspiration. Cinq à dix ml de trypsine ont été ajoutés dans chaque flacon, puis ces derniers ont été replacés dans l'incubateur pendant 5 à 10 minutes. Pour accélérer le décollement cellulaire, les flasques ont été frappés contre la paillasse, ajoutant ainsi un effet mécanique à la digestion enzymatique.

Une observation au microscope a permis de vérifier l'état des cellules, puis la digestion enzymatique a été stoppée par l'ajout de sérum de veau fœtal, (dans 10ml de milieu complet DMEMc).

Les cellules, obtenues à partir d'un flasque, ont alors été mises en suspension à l'aide d'une pipette, réparties dans quatre flasques de culture et replacées à l'étuve.

Deux à trois repiquages ont été nécessaires pour obtenir environ 100 millions de CSM.

Préparation des CSM pour la greffe

Le jour de la greffe, les cellules sont remises en suspension comme décrit ci-dessus.

Un comptage à l'aide de la cellule de Malassez a permis de déterminer approximativement le nombre de CSM obtenu avant la greffe cellulaire.

3. Marquage cellulaire

Les CSM doivent être marquées avant la greffe autologue dans l'artère rénale, afin de permettre leur visualisation et ainsi d'étudier leur devenir dans le rein.

Choix des marqueurs

Les marqueurs utilisés ont été les suivants :

- cmDiI (Chlorométhylbenzamido-dérivée du DiI, marqueur carbocyanique lipophile), marqueur fluorescent rouge des membranes (Cell tracker, Molecular Probes®)
- BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine), marqueur de l'ADN révélé par immuno-histochimie (Roche®).

Marquage des cellules au cmDiI :

Les cellules ont été lavées dans 30 ml de PBS, puis remises en suspension dans 10 ml de PBS.

500 µl de cmDiI à (1mg/ml) a été ajouté pendant 5 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à +4°C. Enfin, les cellules ont été lavées dans du PBS et centrifugées (3 fois) afin d'éliminer l'excès de marqueur.

Marquage des cellules au BrdU :

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

Contrôle du marquage avant greffe cellulaire

Avant la greffe, les cellules ont été déposées sur une lame, afin de vérifier la qualité du marquage (qualité colorimétrique et pourcentage de cellules marquées).

Dans les cas du cmDiI, marqueur fluorescent, la vérification du marquage a été réalisée par observation de l'intensité de fluorescence au microscope à fluorescence (Leica DM IL®). En effet, les cellules marquées apparaissent en fluorescence rose, tandis que seul le spectre des cellules non marquées est visible.

Pour le BrdU, une révélation immunohistochimique a été nécessaire afin de vérifier l'intensité de marquage.

Dans les deux cas, 10 champs au grossissement x400 ont été observés pour déterminer le pourcentage de marquage pour chacun des marqueurs.

4. Modèle expérimental d'ischémie rénale

L'ischémie rénale a été réalisée de façon unilatérale, durant 45 minutes. Elle était réversible et transitoire.

L'animal a été anesthésié et placé 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 base de polyvinylpyrrolidone iodée (BETADINE®).

Un cathéter percutané (Set d'introduction percutané du cathéter, diamètre 7f/2,3 mm, longueur 11 cm, Input Medtronic®, AVE Medtronic®) a été placé dans l'artère et un second a été introduit dans la veine fémorale.

L'animal a alors reçu un traitement anticoagulant (0,5 mg/kg IV Héparine Choay®).

Toute la procédure a été réalisée sous contrôle radioscopique (Stenoscope®, General Electric®).

Un cathéter guide de 6F (Jodkins Right (JR 4) Vistabritetip®, Cordis®) a été introduit jusque dans l'artère rénale. Un contrôle angiographique, avec injection de 5 ml de produit de contraste radio opaque (Telebrix®) a permis d'effectuer une artériographie rénale, et ainsi de détecter d'éventuelles anomalies rénales préexistantes. (*figure 9*)

Un guide (diamètre 0,014'', longueur 190 cm, sparta/core 14 guide wire Guidant®) a ensuite été introduit dans le cathéter guide artériel jusque dans les ramifications de l'artère rénale au sein du parenchyme.

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 Medtronic®) a alors été chargé sur le guide. (*figure 10*)

Le ballon a été placé proximale dans l'artère rénale et gonflé à l'aide d'un mélange équivolumique de Telebrix® et de soluté physiologique (NaCl 0,9%). 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 ainsi été interrompu pendant 45 minutes, puis le ballonnet a été retiré. Un contrôle angiographique a permis de s'assurer du retour du flux sanguin dans l'artère rénale.

Un cathéter guide (Jodkins Right (JR4), Vistabritetip®, Cordis®) thermoformé par l'opérateur a été placé dans la veine du rein ischémié afin de prélever du sang pour le dosage de l'activité rénine plasmatique.

Les cathéters et introducteurs ont alors été retirés. Un point de compression artériel et veineux a été appliqué pendant 10 minutes sur les zones de ponction afin d'éviter les hémorragies postopératoires.

5. Technique d'injection des CSM dans l'artère rénale

L'animal a été anesthésié et placé 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 base de polyvinylpyrolidone iodée (BETADINE®).

Un cathéter percutané (Set d'introduction percutané du cathéter, diamètre 7f/2,3 mm, longueur 11 cm, Input Medtronic® AVE Medtronic®) a été placé par voie percutanée dans l'artère rénale.

L'animal a reçu un traitement anticoagulant à la posologie de 0,5 mg/kg d'héparine (Héparine Choay®) par injection intraveineuse.

Sous contrôle radioscopique, un cathéter guide (diamètre 6F/2,0 mm, 100cm, type Jodkins Right 4, JR 4 Vistabritetip® CORDIS®) a été introduit dans l'artère rénale. Un contrôle angiographique avec injection de 3 ml de produit de contraste radio opaque Telebrix® a permis de confirmer la perméabilité de l'artère rénale.

Le cathéter guide a été rincé avec 20 ml de NaCl 0,9% pour éliminer les dépôts de produit de contraste.

Les CSM marquées au BrdU et au cmDiI ont été mises en suspension dans 10 ml de PBS. L'homogénéisât cellulaire a alors été prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml et d'une aiguille de 18GA, puis injecté en respectant un temps d'injection de 2 minutes.

Le cathéter guide a alors été rincé avec du NaCl 0,9% pour le laver de son volume mort et ainsi terminer l'injection cellulaire. Puis ce dernier a été retiré ainsi que l'introducteur. Un point de compression artérielle a été appliqué pendant 10 minutes sur la zone de ponction afin d'éviter une hémorragie post-opératoire.

Les animaux n'ont subi aucun traitement particulier en post-opératoire.

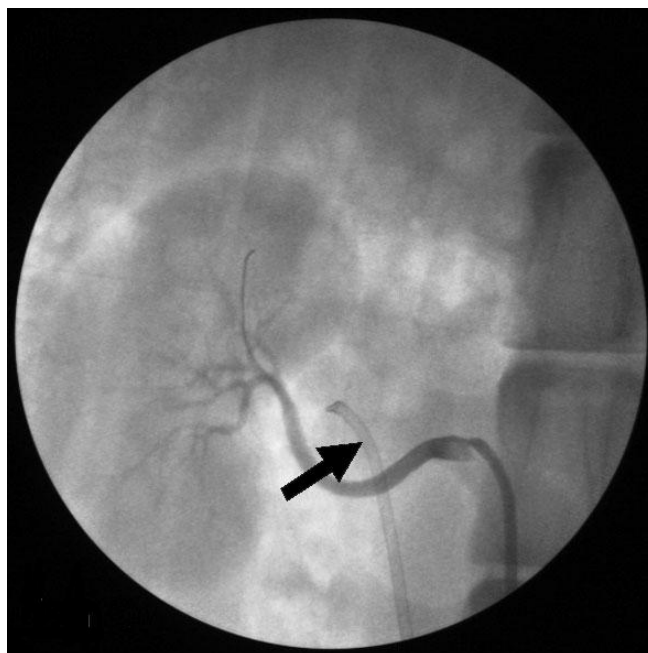


Figure 9 : Artériographie rénale réalisée, pour chaque brebis, avant l'ischémie rénale transitoire.

Mise en place du cathéter guide dans la veine rénale (flèche noire) afin d'effectuer la prise de sang pour déterminer l'activité rénine plasmatique avant et après l'occlusion de l'artère rénale. (Cliché cinéangiographique : L. Behr, IMM Recherche)

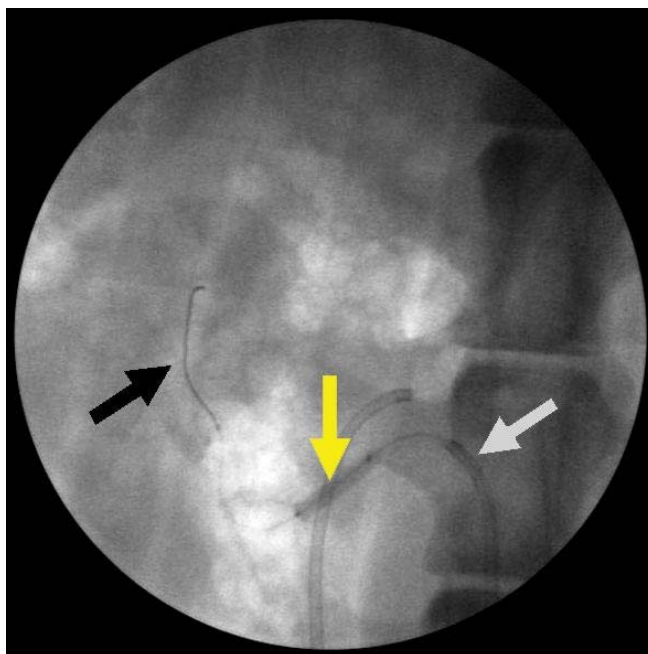


Figure 10 : Mise en place du ballonnet dans l'artère rénale d'une brebis.

Le ballonnet (flèche jaune) est monté sur un guide métallique de 0.014'' (flèche noire) et dans un cathéter guide de 7F (flèche grise). Le ballonnet est resté gonflé pendant 45 minutes. (Cliché cinéangiographique : L. Behr, IMM Recherche)

6. Sacrifice des animaux et prélèvement des reins

Les brebis ont été anesthésiées.

Une artériographie de contrôle a permis de vérifier la perméabilité de l'artère rénale.

Les animaux ont été sacrifiés par injection de Pentobarbital sodique (Doléthal®) à la dose de 60mg/kg en intraveineuse.

Les reins ont alors été prélevés par laparotomie sous-lombaire.

7. Etude des reins prélevés

7.1 Evaluation macroscopique

Après le prélèvement, les deux reins sont pesés, puis nous avons évalué les lésions externes à l'œil nu. Enfin, une coupe sagittale est réalisée, pour évaluer les lésions internes à l'œil nu.

7.2 Evaluation microscopique

Chaque rein a été découpé en fragments d'environ 3 cm³.

Une série de fragments a été fixée dans du formol / PBS à 4% pendant 24 heures 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.

7.2.1 Evaluation microscopique des lésions d'ischémie rénale

Différentes colorations tissulaires ont été réalisées, pour les coupes des deux reins de chaque animal :

- Hématoxiline, Eosine, Safran (HES) : coloration classique en anatomopathologie pour une visualisation aisée des structures rénales.
- Trichrome Masson : met en évidence la fibrose tissulaire.
- PAS : met en évidence la hyalinose (stade précoce de la fibrose).

Les lésions rénales ont été évaluées par une méthode semi-quantitative. Vingt lames ont été examinées au microscope optique au grossissement X 400, pour chaque rein. Nous avons recherché les lésions suivantes : infiltration de cellules inflammatoires, dépôt de collagène, lésions tubulaires et remaniements glomérulaires. Le grade 0 signifiait l'absence de lésions, les grades 1, 2, 3 et 4 correspondaient respectivement à un remaniement de 1-10, 11-25, 26-50 et 51-100% des champs visualisés.

7.2.2 Repérage : évaluation microscopique de l'ensemencement du parenchyme rénal par les CSM injectées

Révélation du cmDiI, évaluation sur coupes congelées :

Des coupes congelées de 5 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome puis observées au microscope à fluorescence (Leica DM IL[®]) pour révéler la fluorescence du cmDiI contenu dans les cellules greffées. Les lames ont été soumises à une fluorescence verte (longueur d'onde 570nm) qui a fait apparaître le cmDiI en rouge.

Révélation du BrdU, évaluation sur coupes en paraffine ou congelées (5 µm) :

Le BrdU contenu dans les cellules greffées a été révélé en immunohistochimie, soit en phosphatase alcaline (coloration rouge), soit en peroxydase (coloration brune) (Méthode automatisée de Ventana Medical System Inc[®]). Puis les lames ont été observées au microscope.

Méthode de comptage :

Afin d'évaluer le potentiel d'intégration des cellules, un comptage est effectué par deux opérateurs en observant 10 champs par lame, au grossissement X 100, sur trois lames de chaque animal sur coupes congelées et en paraffine.

On évalue ainsi le nombre de glomérules et de tubules contenant des cellules marquées. La moyenne de ces comptages permet de déterminer quel pourcentage des différentes structures est ensemencé par les CSM.

7.2.3 Technique de double marquage

Un double marquage en immunohistochimie ou en immunofluorescence a été nécessaire pour déterminer le phénotype de la cellule marquée (BrdU ou cmDiI).

Les marqueurs utilisés sont les suivants :

- Podocine (cadeau de l'unité Inserm U423, France), marqueur spécifique des podocytes.
- Pancytokératine, (Dako[®], France) marqueur spécifique des cellules épithéliales du glomérule.
- DBA (*Dolichos Biforus* Agglutinin, Vector Laboratories[®], USA), marqueur des tubules distaux et des tubes collecteurs.
- CD68 (Dakocytomation[®], Danemark), marqueur des macrophages.

Les doubles marquages ont été réalisés sur les coupes congelées (5µm), fixées dans de l'acétone pendant 10 minutes. Seuls les travaux avec la pancytokératine ont été réalisés sur les coupes en paraffine.

BrdU / Podocine :

Les lames ont été rincées au PBS.

La podocine diluée au 1/500^e a été déposée sur les coupes, durant une heure, à température ambiante, puis une deuxième réaction (phosphatase alcaline) à l'aide du kit Cytomation Envision Double Stain System Dako[®] a permis la révélation de la podocine en rouge.

Les lames ont été traitées au HCl (3 min) et à la protéase (0.025% dans PBS), puis ont été laissées à incuber avec l'anticorps anti BrdU (1/10) durant 1 heure. Enfin la réaction de la peroxydase a permis la révélation du BrdU en brun.

BrdU / DBA :

La même procédure a été suivie, avec en premier lieu, l'exposition au DBA conjugué à la fluorescéine (dilution 1/10)-fluorescence verte-, puis, en second lieu, l'incubation avec l'anticorps anti-BrdU révélé à l'aide d'un second anticorps Alexa fluor 405 IgG –fluorescence bleue- (Molecular Probes[®], Pays-Bas), dilution 1/100.

Pancytokératine / BrdU :

Les expériences ont été réalisées sur des coupes en paraffine, selon la méthode automatisée de Ventana[®]. Les anticorps utilisés sont des anticorps anti-pancytokératine de souris (révélés en brun), dilution 1/50, une heure à température ambiante, et des anticorps anti-BrdU de souris (révélés en rouge), dilution 1/10, une heure à température ambiante.

CD68 / BrdU :

Les lames ont été exposées à l'anticorps CD68, dilution 1/100, une heure à température ambiante, puis au second anticorps Alexa fluor 405 IgG (Molecular Probes[®], Pays-Bas), dilution 1/100 (fluorescence bleue).

Enfin, l'anticorps anti-BrdU (1/10) a été déposé sur les lames puis révélé en fluorescence verte (BrdU labelling et detection kit, Roche[®]).

8. Traitement des prélèvements sanguins

8.1 Dosage de l'urée et la créatinine plasmatique

Des prélèvements sanguins par ponction de la veine jugulaire ont été réalisés sur chaque animal en vue du dosage de l'urée et la créatinine plasmatique.

Ces prélèvements ont été réalisés à J0 avant l'occlusion de l'artère rénale, à J15 au moment de la greffe cellulaire et au moment du sacrifice.

8.2 Dosage 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 (ischémie rénale) 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 sont 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. Ce dosage a été réalisé en routine au laboratoire par une méthode RIA.

9. Méthode statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard (DS). La comparaison des résultats des différents groupes a été réalisée en utilisant l'analyse de la variance ANOVA, logiciel « STAT VIEW » sur Macintosh[®].

Le seuil de significativité a été fixé inférieur à 5 % ($p < 0,05$).

II. RESULTATS

A. Modèle d'ischémie rénale

1. Résultats des dosages d'urée et de créatinine plasmatique

Pour tous les animaux, les dosages d'urée et de créatinine ont été réalisés à J0, à J15 et au moment du sacrifice.

Ces résultats sont restés dans l'intervalle physiologique. Les moyennes et déviations standards sont exposées dans la *figure 11*. La différence n'est pas significative entre les groupes témoin et malades.

2. Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique (ARP)

Pour les animaux des groupes II et III, l'ARP a été évaluée juste avant et après l'occlusion de l'artère rénale, par prélèvement sanguin dans la veine rénale.

L'occlusion de l'artère rénale a provoqué une augmentation systématique et significative de l'ARP ($p < 0.005$) (*figure 12*).

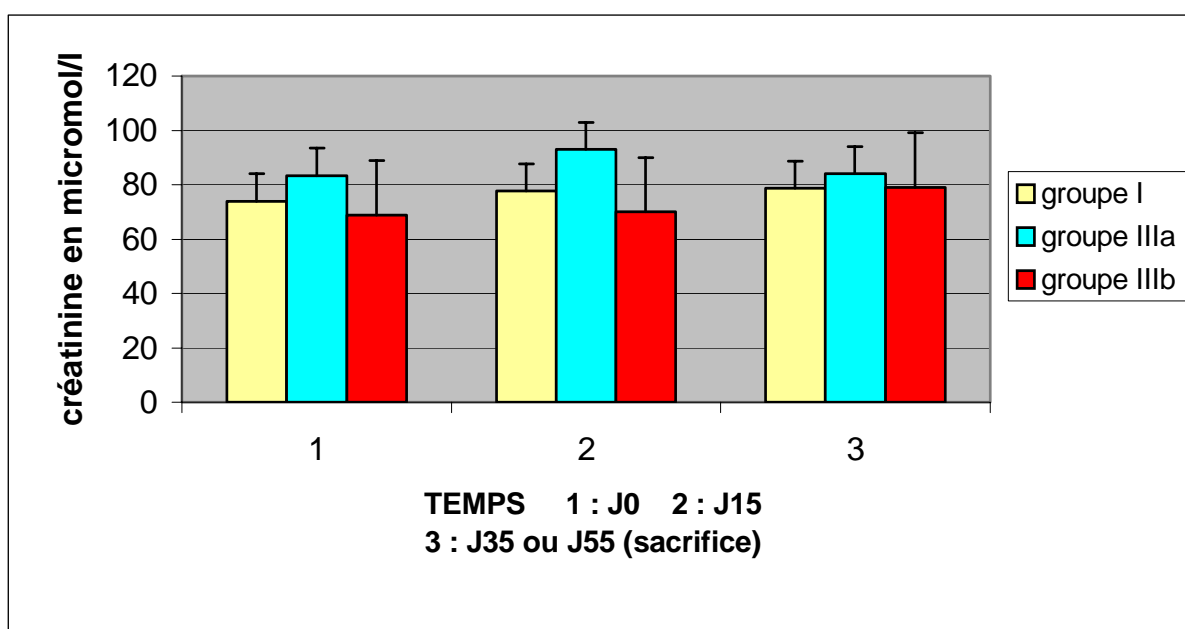
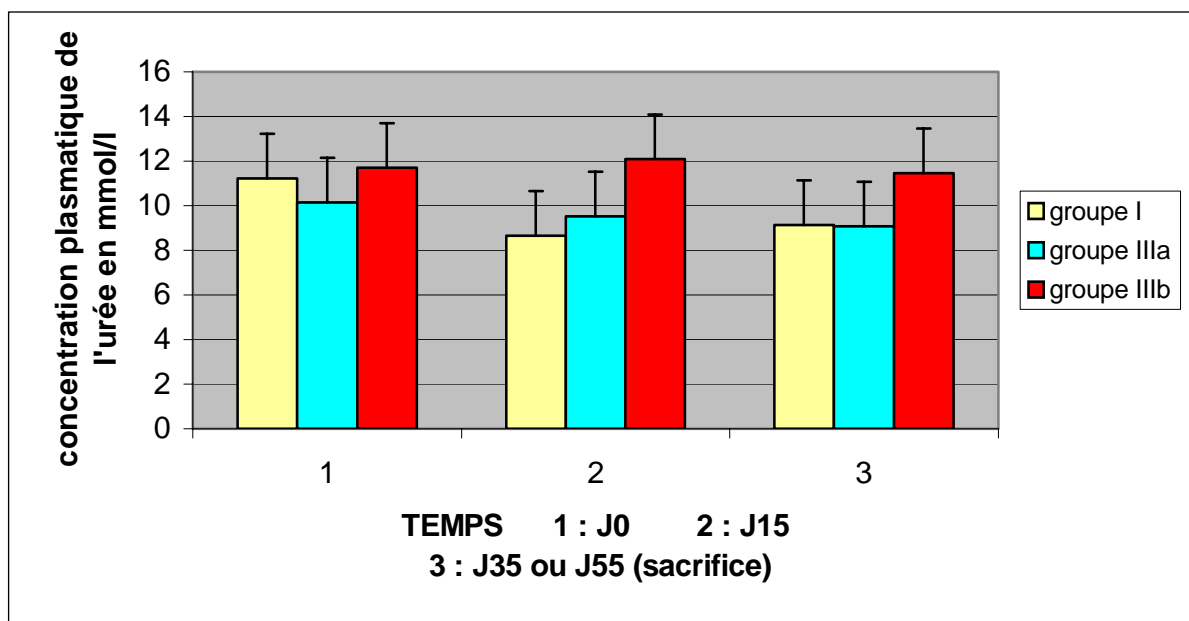


Figure 11 : Résultats du dosage de l'urée et de la créatinine plasmatique des brebis des groupes I, IIIa et IIIb, à JO, J15 et lors du sacrifice.

Groupe I : 3 brebis, groupe témoin.

Groupe II : 5 brebis, greffe cellulaire immédiatement après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIa : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIb : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie longue (40 jours).

Les résultats étant restés dans l'intervalle physiologique pour le groupe témoin (I) comme pour les groupes malades (IIIa et IIIb), les dosages n'ont pas été effectués pour le groupe II.

La différence n'est pas significative entre les groupes.

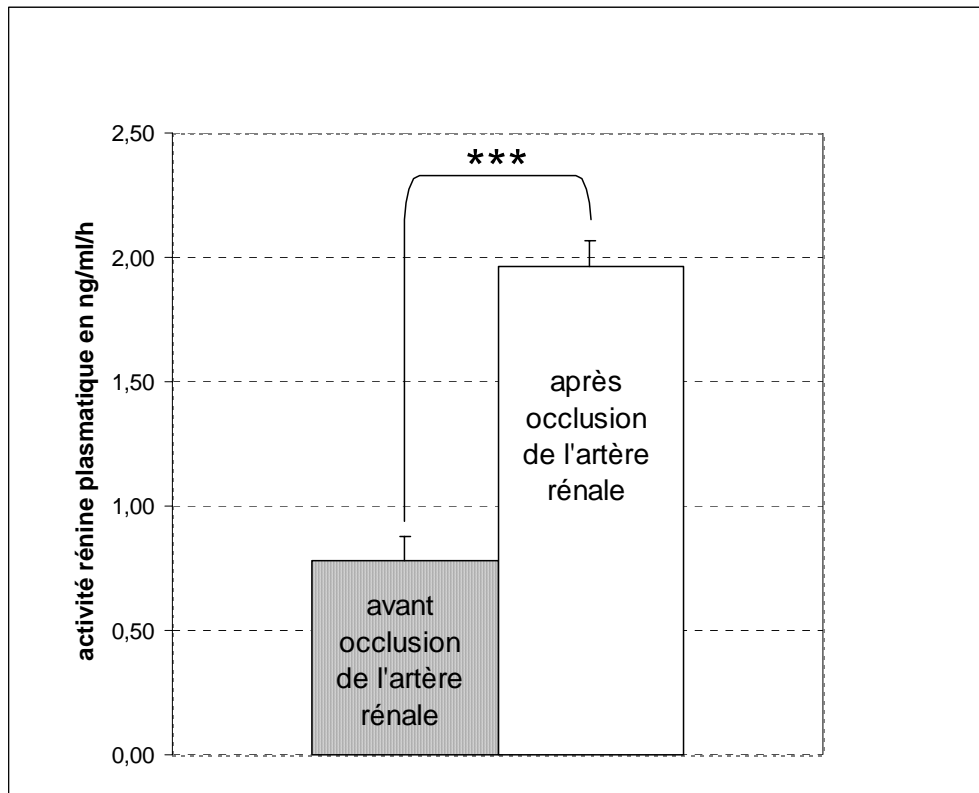


Figure 12 : Résultats du dosage de l'activité rénine plasmatique dans la veine rénale des reins ischémiés pour les groupes II et III, avant et après l'occlusion de l'artère rénale.

Groupe II : 5 brebis, greffe cellulaire immédiatement après la lésion, survie courte.

Groupe III : 10 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion, survie courte (groupe IIIa) et survie longue (groupe IIIb).

L'occlusion de l'artère rénale a provoqué une augmentation significative de l'activité rénine plasmatique chez les groupes ayant subi l'ischémie-reperfusion rénale.

3. Résultats de l'évaluation anatomo-pathologique 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, quelques reins ischémiés ont présenté des foyers d'infarctus sous-capsulaires visibles à l'œil nu.

Le poids des reins ischémiés (moyenne des poids des reins ischémiés = 82 g \pm 28) était systématiquement inférieur à celui des reins sains. (moyenne des poids des reins sains = 92 g \pm 27). Cependant la différence n'est pas significative au seuil de 5%.

L'étude microscopique des lésions induites par l'ischémie reperfusion a confirmé l'atteinte rénale. Les groupes II et III ayant subi l'ischémie rénale unilatérale ont présenté des lésions significatives sur le rein ischémié. L'examen des reins du groupe témoin (I) n'a révélé aucune anomalie.

Pour les reins ischémiés, les lésions observées sont principalement des lésions de nécrose corticale et de nécrose tubulaire aiguë. Ainsi, sont observées, sur certaines coupes, des lésions modérées, avec un aplatissement de l'épithélium tubulaire, des lésions inflammatoires discrètes avec infiltration par des granulocytes neutrophiles. D'autres coupes ont révélé des lésions plus sévères comme des lésions de dégénérescence cellulaire ou de nécrose avec destruction du parenchyme rénal et remplacement par de la fibrose. Des cellules nécrotiques ont alors été observées dans la lumière tubulaire (*figures 13 et 14*).

Nous avons utilisé une méthode d'évaluation des lésions rénales, comme décrit précédemment. L'évaluation a révélé des résultats variables selon les animaux, allant de 0,5 à 2,2, avec une moyenne de 1,2. Les différences ne sont pas significatives entre les groupes.

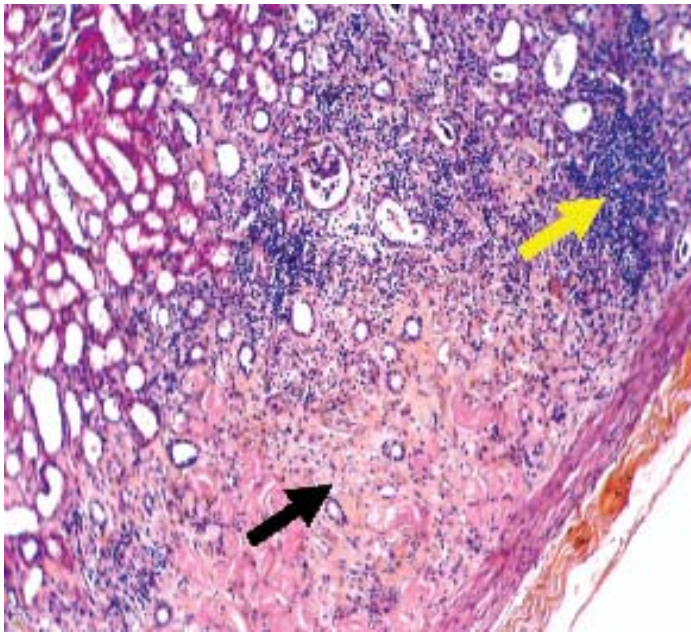


Figure 13 : Lésion d'infarctus rénal majeur en zone sous corticale.

Dépôt de collagène, nécrose cellulaire (flèche noire) et infiltration périphérique de cellules inflammatoires (flèche jaune). (Coloration HES, X100, cliché : L. Behr, IMM Recherche)

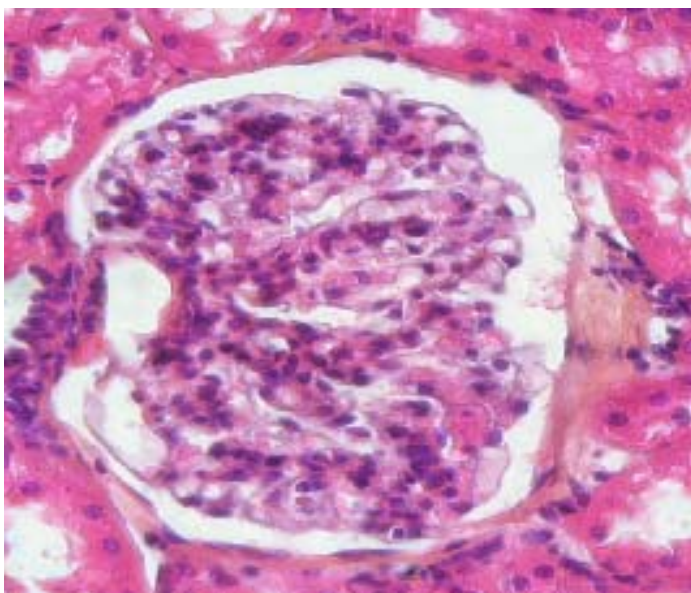


Figure 14: Lésions glomérulaires avec hypercellularité au sein de la touffe glomérulaire.

Un dépôt collagénique sous la capsule de Bowman indique une fibrose rénale débutante. (Coloration trichrome Masson X400, cliché : L. Behr, IMM Recherche)

B. Culture et marquage cellulaire

1. Culture cellulaire

Le temps de culture avant greffe cellulaire a été de 16,9 jours ($\pm 3,7$ jours).

La ponction de moelle osseuse en quatre sites a permis de mettre en culture quatre flasques, de front, et donc d'obtenir le nombre de cellules souhaitées plus rapidement. En outre, la richesse en CSM était variable selon les prélèvements.

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

Le groupe I a été greffé avec 94 millions (± 5) de CSM en moyenne, le groupe II avec 100 millions (± 5) de CSM en moyenne, le groupe IIIa avec 66 millions (± 41) et le groupe IIIb avec 94 millions (± 14). La différence entre les groupes n'est pas significative (*figure 15*).

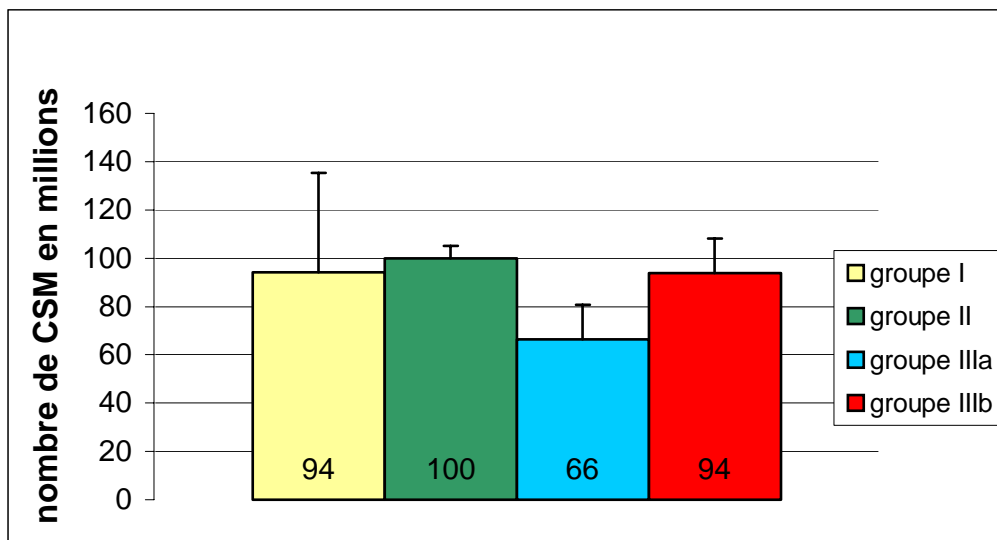


Figure 15 : Nombre moyen de CSM greffées chez les brebis des groupes I, II et III.

Groupe I : 3 brebis, groupe témoin.

Groupe II : 5 brebis, greffe cellulaire immédiatement après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIa : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIb : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie longue (40 jours).

2. Résultats du contrôle de marquage des cellules avant greffe

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

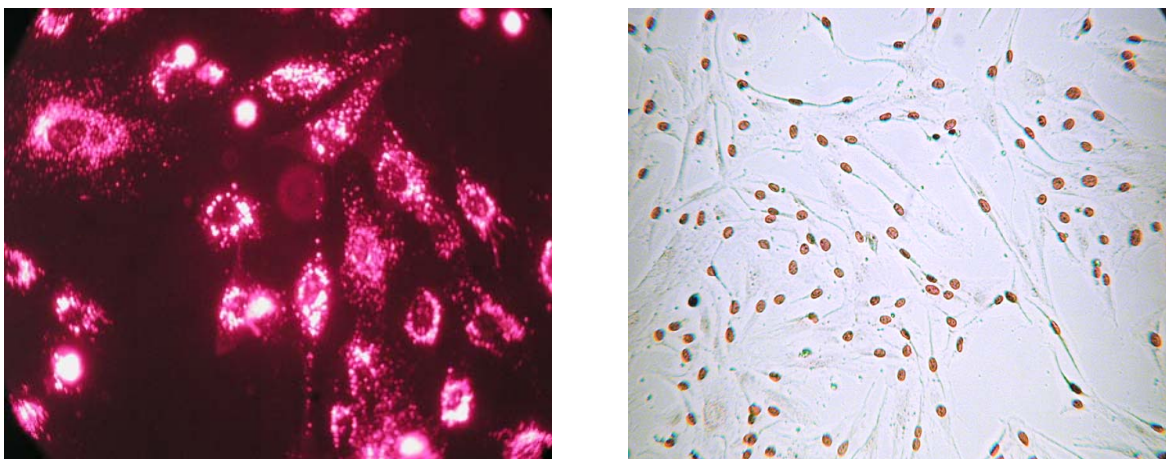


Figure 16 : Contrôle des marquages cmDiI et BrdU après la greffe cellulaire.
(Clichés : L. Behr, IMM Recherche)

A gauche, contrôle du marquage des CSM par le cmDiI un jour après la greffe. Un échantillon des CSM greffées a été déposé sur une lame où les CSM, adhérentes au support, prennent une forme allongée. Le pourcentage de cellules marquées atteint presque 100%. Le cmDiI marque les membranes cellulaires (rose), et non le noyau. Observation au microscope à fluorescence grossissement X400.

A droite, contrôle du marquage des CSM par le BrdU un jour après la greffe. Un échantillon des CSM greffées a été déposé sur une lame. La coloration brune (révélation en peroxydase) des noyaux a été obtenue en immunohistochimie. Observation au microscope grossissement X200.

C. Résultats de la greffe cellulaire

Le marquage par le BrdU et le cmDiI a permis un repérage qualitatif et quantitatif des CSM greffées. Elles ont été retrouvées principalement dans le cortex et la médullaire externe de tous les reins greffés.

Le rein controlatéral non greffé, la rate, les poumons et le foie des brebis ont également été examinés. De rares cellules marquées ont été retrouvées dans les reins controlatéraux non greffés et dans les poumons, mais aucune dans la rate ou le foie.

L'étude des reins greffés révèle que les CSM ont colonisé les tubules et les glomérules (*figures 19, 20, 21*).

1. Ensemencement des glomérules :

Le comptage des glomérules positifs contenant des CSM marquées a permis d'évaluer le pourcentage d'ensemencement de ces derniers (*figure 19*).

Pour le groupe I (témoin), 32% (± 1.3) des glomérules contiennent des CSM marquées.

Pour le groupe II, 47% (± 2.1) des glomérules contiennent des CSM marquées.

Pour le groupe IIIa, 49% (DS= ± 5.8) des glomérules contiennent des CSM marquées.

Pour le groupe IIIb, 56% (DS= ± 3.5) des glomérules contiennent des CSM marquées.

Le pourcentage d'ensemencement des glomérules par les CSM est significativement différent entre les groupes I et II ($p=0.0128$), entre les groupes I et IIIa ($p=0.0121$), et entre les groupes I et IIIb ($p=0.0005$) (*figure 17*).

2. Ensemencement des tubules :

De même, le comptage des tubules positifs contenant des CSM marquées a permis d'évaluer le pourcentage d'ensemencement de ces derniers (*figures 20, 21*).

Pour le groupe II, 8.5% (± 0.5) des tubules sontensemencés tandis que l'on retrouve que de rares tubules positifs (<2% des tubules) dans les groupes I et III. Le pourcentage d'ensemencement des tubules est significativement différent entre le groupe II et les groupes I et III ($p<0.0001$) (*figure 18*).

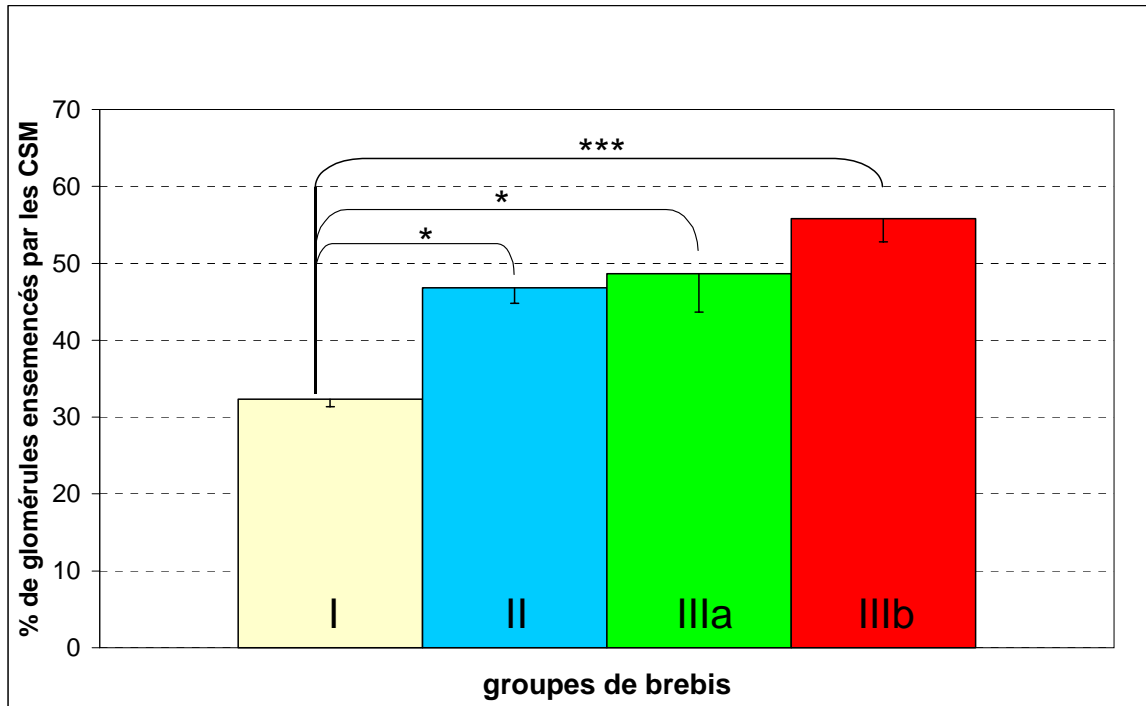


Figure 17 : Pourcentage de glomérules ensemencés par les CSM chez les brebis des groupes I,II et III.

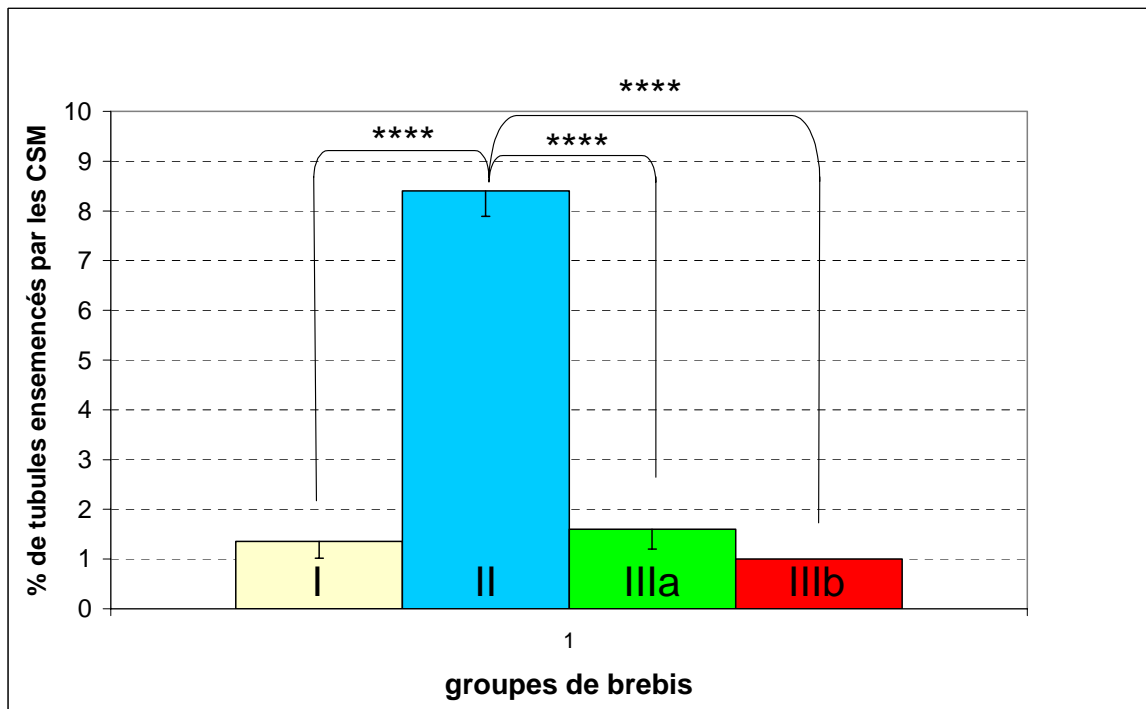


Figure 18: Pourcentage de tubules ensemencés par les CSM chez les brebis des groupes I,II et III.

Groupe I : 3 brebis, groupe témoin.

Groupe II : 5 brebis, greffe cellulaire immédiatement après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIa : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie courte (20 jours).

Groupe IIIb : 5 brebis, greffe cellulaire 15 jours après la lésion , survie longue (40 jours).

3. Etude de la différenciation des CSM par la révélation de marqueurs spécifiques de cellules rénales

La révélation de différents marqueurs spécifiques de cellules rénales associée à l'identification du BrdU ou du cmDiI a permis de déterminer quelle différenciation ont subi les CSM.

Dans les glomérules

Les CSM, principalement localisées en périphérie de la touffe glomérulaire, étaient positives au marquage Podocyne (*figure 24*). Celles-ci exprimeraient donc des marqueurs de surface des podocytes. Ces cellules étaient également positives à la pancytokératine, marqueur de surface des cellules épithéliales (*figure 22*).

Certaines CSM, situées au cœur de la touffe glomérulaire, n'exprimaient pas la podocyne. Leur localisation et de leur morphologie laisse penser qu'il s'agirait de cellules mésangiales.

Dans les tubules

Les CSM présentes dans les tubules ont principalement été retrouvées dans le cortex et la médullaire externe du rein. Elles étaient positives au DBA (*figure 23*) et exprimeraient donc ce marqueur spécifique des tubules distaux et des tubes collecteurs.

Des CSM ont également été retrouvées dans les tubules proximaux (aspect caractéristique de ces cellules avec leur bordure en brosse) (*figure 25*). Cependant le marqueur spécifique de ces tubules (megalin) n'a pas pu être révélé dans cette étude (pas de réaction croisée).

La révélation du CD 68 n'a pas montré de colocalisation entre ce marqueur spécifique des macrophages et les CSM marquées, laissant penser que les CSM n'auraient pas été phagocytées (*figure 26*).

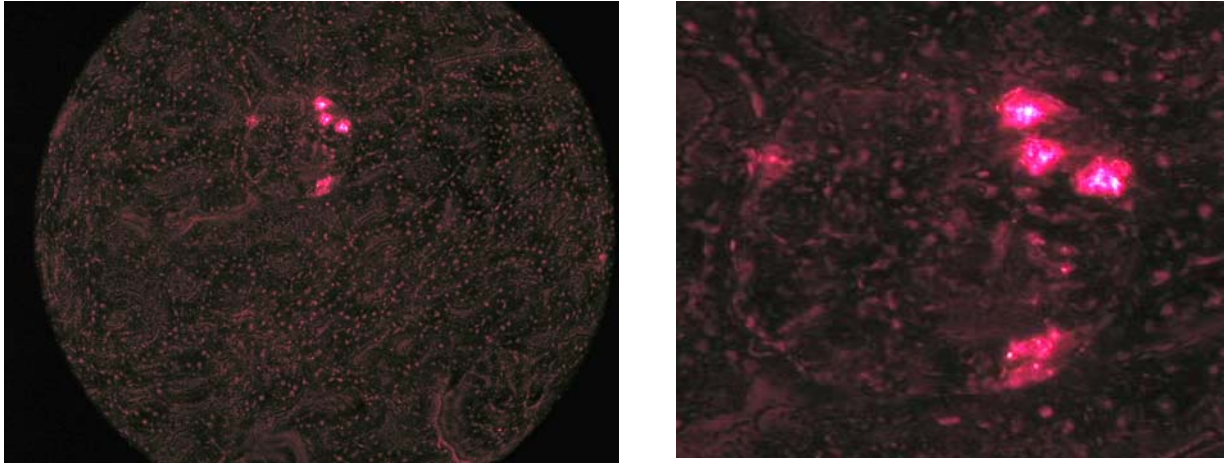


Figure 19 : Glomérule contenant des CSM marquées au cmDiI.

Repérage des CSM marquées au cmDiI pour comptage de l'ensemencement du parenchyme rénal, observation au microscope à fluorescence X400. (Clichés : L. Behr, IMM Recherche).

A gauche, on compte deux glomérules, un seul est positif.

A droite, zoom numérique montrant que le glomérule positif contient 4 CSM marquées.



Figure 20 : Tubule contenant des CSM marquées au cmDiI.

Deux cellules marquées au cmDiI, révélées au microscope à fluorescence (grossissement X400). En faisant varier la luminosité, on découvre que ces cellules sont intégrées dans l'épithélium tubulaire. (Clichés : L.Behr, IMM Recherche).

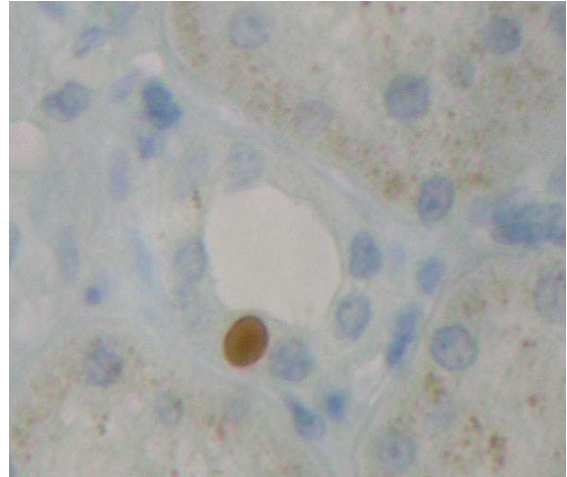
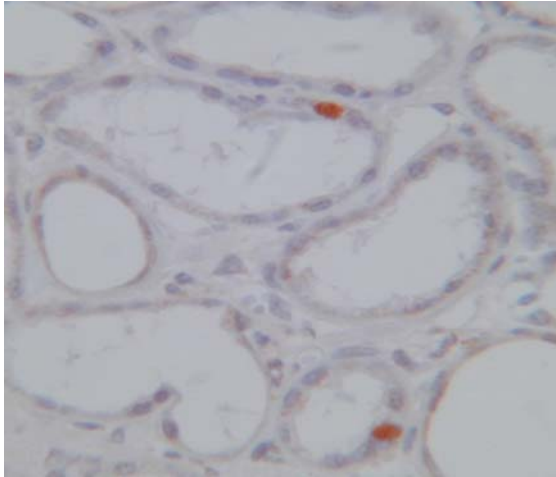


Figure 21 : Tubules contenant des CSM marquées au BrdU.

Sur la photo de droite, deux cellules positives au BrdU (noyau marron) sont retrouvées dans l'épithélium tubulaire. Observation au microscope X400.

Sur la photo de gauche, une cellule positive est retrouvée dans un tubule, certainement un tube collecteur ou un tubule distal. Observation au microscope X400, zoom numérique.

(Clichés : L.Behr, IMM Recherche).

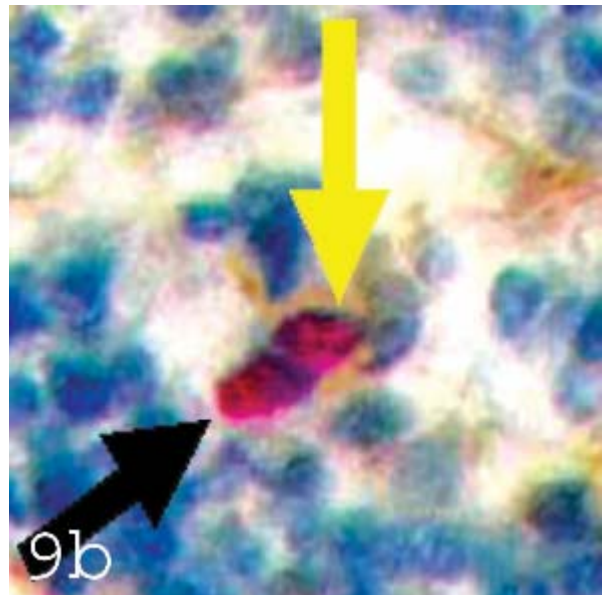
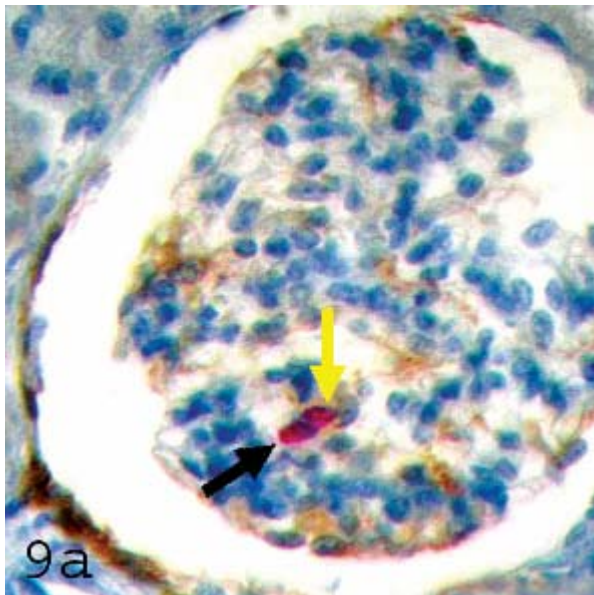


Figure 22 : Double marquage BrdU / Pancytokératine.

Glomérule contenant deux cellules positives (coloration rouge du noyau, révélation du BrdU). La pancytokératine (coloration marron) marque les cellules épithéliales du glomérule. Une cellule marquée exprime la pancytokératine (flèche jaune) et la deuxième non (flèche noire).

(9a : Grossissement x400, 9b : zoom numérique, clichés : L. Behr, IMM Recherche).

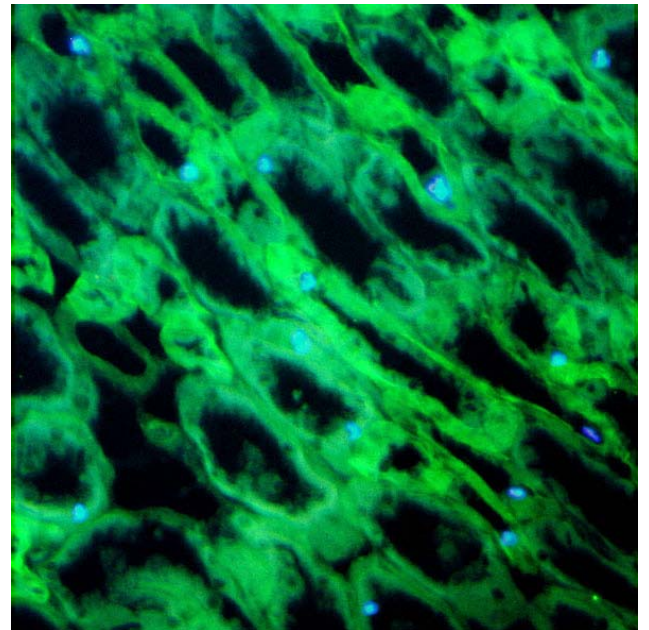
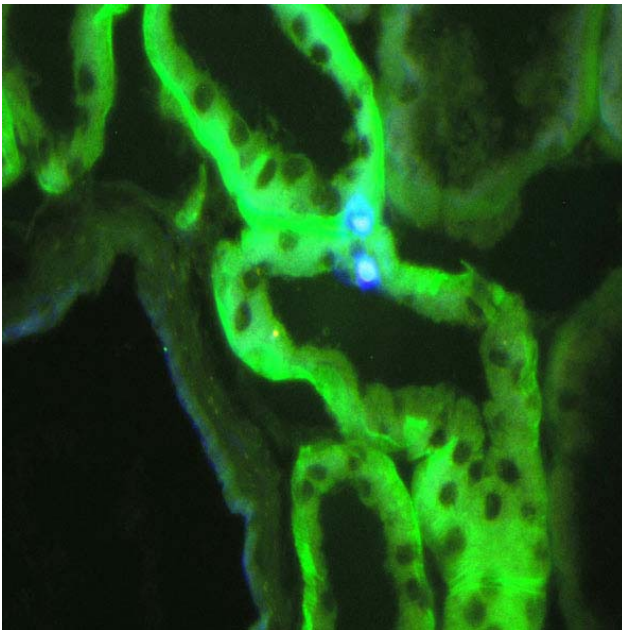
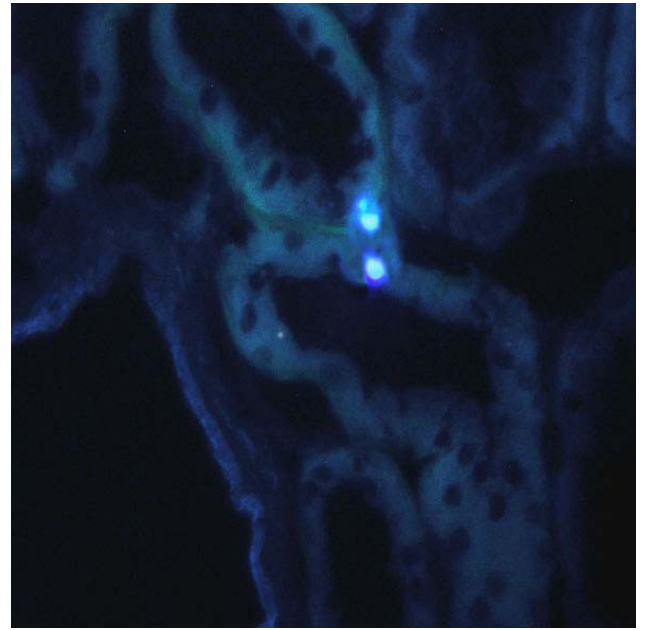
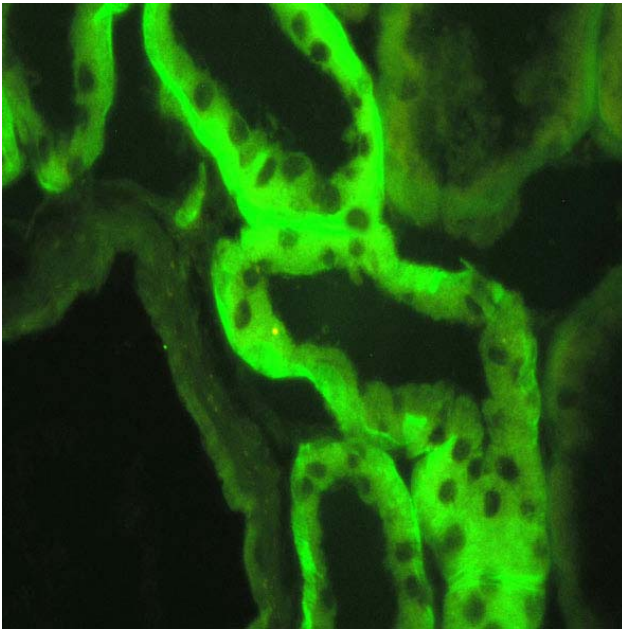


Figure 23 : Double marquage DBA / BrdU.

En haut, Des CSM marquées (BrdU, marqueur du noyau des CSM, révélé en bleu) sont retrouvées dans des tubes collecteurs (DBA, marqueur des tubes collecteur, révélé en vert). (Observation au microscope à fluorescence X400 +zoom numérique).

En bas, à gauche, superposition des deux photos précédentes montrant la localisation des cellules marquées dans l'épithélium tubulaire.

En bas, à droite, vue d'ensemble sans le zoom numérique, montrant l'importance de l'ensemencement tubulaire.

(Clichés : L. Behr, IMM Recherche).

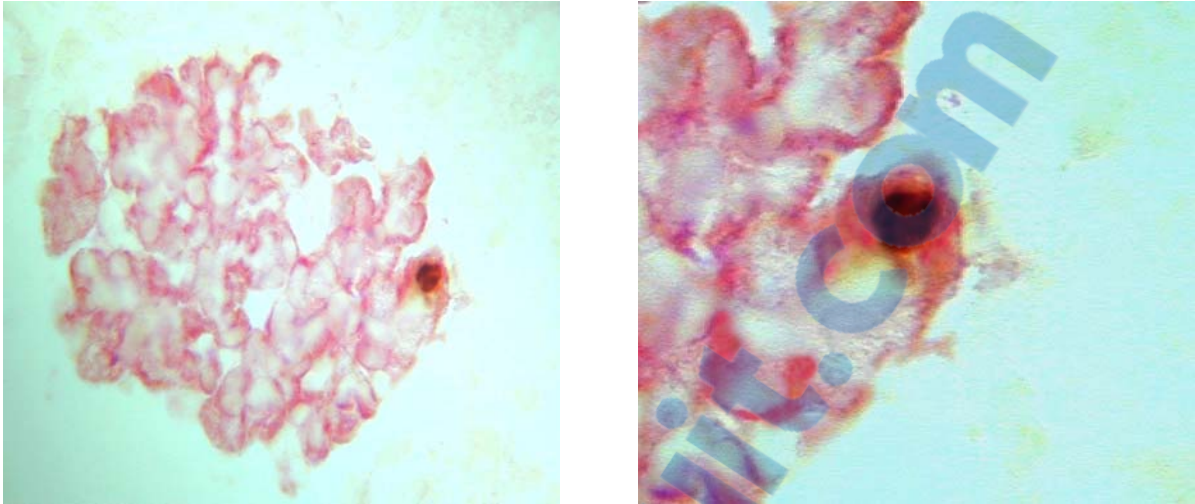


Figure 24 : Double marquage BrdU / Podocyne.

Glomérule contenant une CSM marquée (révélation du BrdU, noyau marron), située à la périphérie de la touffe glomérulaire. Le cytoplasme de cette cellule exprime la podocyne (rouge). C'est un podocyte. (Grossissement X400, clichés : L. Behr, IMM Recherche).

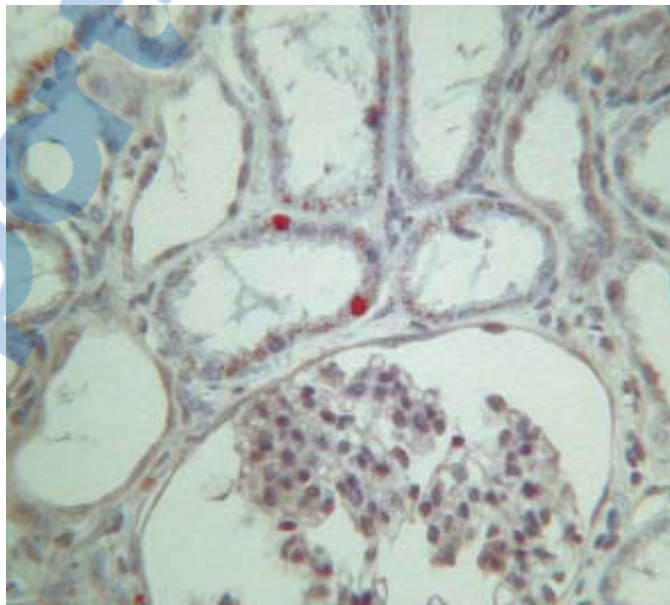


Figure 25 : CSM marquées au BrdU dans un tubule proximal.

Des CSM marquées (BrdU révélé en marron) sont visibles, certainement dans un tubule proximal (bordure en brosse caractéristique). (Grossissement X400, clichés : L. Behr, IMM Recherche).

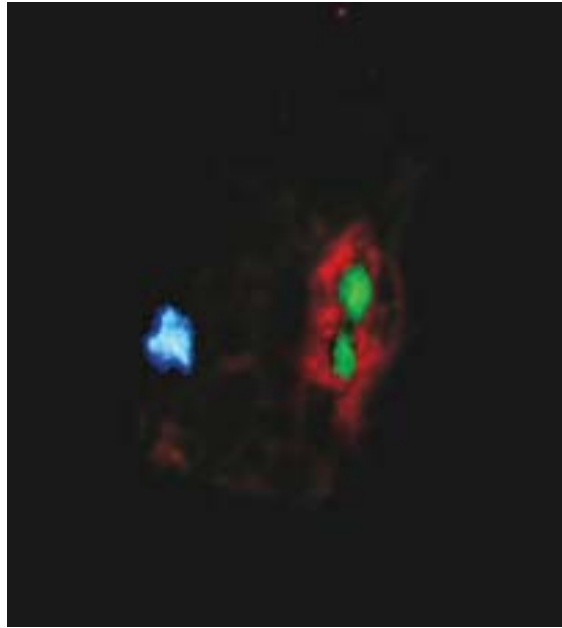


Figure 26 : Triple marquage cmDiI/ BrdU/CD68.

Révélation de CSM marquées (fluorescence rouge cytoplasmique du cmDiI et fluorescence verte nucléaire du BrdU) et d'une cellule positive au CD68, certainement un macrophage.

Nous n'avons jamais retrouvé de colocalisation entre le CD68 et le BrdU ou le cmDiI. On peut donc penser que les CSM n'ont pas été phagocytées.

Image au microscope à fluorescence X400, cliché : L.Behr, IMM Recherche.

III. DISCUSSION

Les points fondamentaux de cette étude sont :

- le choix des **cellules mésenchymateuses** de brebis comme source de cellules souches adultes : sélection, amplification et marquage *in vitro* de manière fiable et reproductible, réalisation d'une **greffe autologue** et innocuité pour le receveur.

- le choix du **modèle ovin d'ischémie reperfusion**, et la voie d'injection **directe** des cellules souches *via* l'artère rénale.

- l'**intégration**, dans le rein, des cellules souches mésenchymateuses injectées, la présence d'une « **fenêtre thérapeutique** », c'est-à-dire un recrutement préférentiel de ces cellules en fonction du délai de la greffe après l'induction de la lésion rénale, et enfin, la **différenciation** subie par les cellules, traduisant, dans une certaine mesure, une régénération fonctionnelle du parenchyme rénal.

A. Les cellules souches mésenchymateuses : intérêt, mise en culture et marquage

Nous avons choisi de greffer les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de l'animal adulte.

Les CSM sont disponibles en grande quantité dans la moelle osseuse des mammifères adultes, tissu facile à prélever. La même technique est utilisée en routine chez l'homme. Mises en culture, ces cellules prolifèrent et il est facile de les isoler, *in vitro*, des autres cellules de la moelle osseuse, du fait de leur propriété d'adhérence au support. Dans notre étude, les conditions de culture nous ont permis d'obtenir environ 100 millions de CSM, en deux semaines de culture, à partir d'un aspirât total de 10 à 12 ml de moelle osseuse. Ces chiffres sont en accord avec la littérature, Pittenger a obtenu 50 à 200 millions de CSM dans les mêmes délais à partir d'un volume équivalent de moelle humaine [42]. Le nombre de cellules injectées correspond également à celui de la littérature [22, 25]. Nous pouvons donc espérer des résultats significatifs.

Ce travail utilise donc une lignée de cellules sélectionnées, les CSM. Les études précédentes ont porté sur différents types de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse. Dans le cas d'une greffe de moelle osseuse complète, l'absence de sélection préalable sur la population cellulaire rend impossible l'identification du lignage cellulaire [23, 25-26, 44]. Dans l'étude de Lin, les cellules souches hématopoïétiques semblent se différencier principalement en cellules tubulaires épithéliales [34]. Enfin dans les études de Poulson et al. et de Mengel et al. sur les biopsies de reins transplantés, on ne peut identifier l'origine des cellules « extra-rénales » [36, 44]. Une étude récente de Morigi et al. laisse penser que les CSM auraient un potentiel d'intégration dans le rein supérieur à celui des cellules souches hématopoïétiques [37].

En outre, lors du développement du rein, le tissu mésodermique donne naissance, après différenciation cellulaire, à la majorité des cellules rénales (plus de 26 types cellulaires différents) [1, 43]. Cette différenciation est induite sous l'action du bourgeon urétéral. De plus, on a montré chez l'adulte, que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse pouvaient se différencier en de nombreux types cellulaires, dont les cellules rénales, *in vivo* et *in vitro* [2, 21, 29]. La différenciation des CSM en cellules épithéliales rénales dans notre étude n'est alors pas surprenante.

La réalisation d'une greffe de CSM **autologue** crée une situation particulièrement favorable puisqu'elle évite le recours au donneur et élimine le risque de rejet, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs. A l'opposé, la plupart des études précédentes ont été réalisées sur des modèles murins irradiés pour permettre l'allogreffe de moelle osseuse [23, 25-26, 34, 37, 44]. L'exposition aux radiations modifie la réponse immunitaire de l'animal receveur, induit des lésions dans de multiples organes (destruction des cellules souches), modifiant la physiologie de ceux-ci donc éventuellement le recrutement des cellules greffées. Si, à l'avenir, la thérapie cellulaire trouve son application en néphrologie, la greffe autologue serait certainement la meilleure option pour les patients.

Afin de tracer le devenir des CSM, nous avons choisi d'utiliser des marqueurs chimiques, le cmDiI et le BrdU.

Le marquage génétique (type GFP, sonde du chromosome Y) reste le traceur de choix car il est transmis à toute la descendance cellulaire avec une spécificité et sensibilité optimales. Néanmoins, la complexité de l'utilisation (transfection virale) et le coût de ce marqueur le rendent difficiles à utiliser dans cette étude.

Le DAPI, utilisé avec succès dans certaines études a été éliminé car présentait *in vitro* un défaut de rémanence du marquage au cours des divisions cellulaires (défaut de sensibilité) et un risque de fuite de fluorescence qui aurait pu entraîner un marquage des cellules résidentes du rein (défaut de spécificité) [10].

Nous avons choisi d'utiliser le cmDiI (marqueur membranaire) et le BrdU (marqueur nucléaire) pour le repérage des cellules greffées. En effet, ils ne sont pas toxiques pour les cellules, ne modifient pas l'ultrastructure des organites et préservent l'intégrité de la cellule. Après test *in vitro* au laboratoire [5], les résultats obtenus avec ces marqueurs nous ont encouragé dans cette voie. 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. 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 à celle 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. L'utilisation des marqueurs pour des études à long terme est donc délicate. Néanmoins, cet inconvénient est secondaire dans notre étude, du fait de la durée de survie des animaux après la greffe.

B. Le modèle ovin d'ischémie reperfusion

Le modèle d'ischémie reperfusion est un modèle d'insuffisance rénale aiguë utilisé à plusieurs reprises dans la littérature pour explorer le potentiel d'intégration des cellules souches au tissu rénal lésé [26, 34, 37]. De plus, la pathogénie de cette affection est bien connue [20, 50].

L'utilisation d'un modèle de grande taille, la brebis, fait suite à des essais menés sur des rongeurs de laboratoire, et permet ainsi d'envisager une éventuelle application à l'homme. Le modèle ovin a, en effet, souvent été utilisé pour l'étude du développement rénal et des affections rénales congénitales (structure et développement proche de l'homme).

La technique mini-invasive d'obstruction de l'artère rénale utilisée dans cette étude préserve l'intégrité du tissu rénal. Il s'agit d'une intervention rapide, non traumatisante pour l'animal et la gestion post-opératoire a été facile. Il n'y a pas eu d'incident au cours de notre étude. Le contrôle angiographique per-opératoire a permis d'estimer la taille de l'artère rénale pour chaque animal, et ainsi d'ajuster la taille du ballon obstruant l'artère rénale, évitant toute lésion artérielle.

Seul un modèle de grande taille permet le développement et l'utilisation de ces techniques de cathétérisme, et ainsi l'injection des cellules souches dans l'artère rénale. Dans la littérature, les cellules sont injectées, chez les rongeurs, dans une voie veineuse périphérique (veine caudale ou rétro-orbitaire). L'injection des CSM dans l'artère rénale permet d'éviter la dilution dans le flux sanguin, le recaptage par les organes filtres (foie, poumons) et ainsi d'espérer un meilleur ensemencement de l'organe. [4]

A l'heure actuelle, en cardiologie, deux voies d'injection pour les cellules souches sont utilisées au cours des essais cliniques ; la voie intramyocardique et la voie intracoronarienne. Dans la précédente étude de l'équipe [5], une injection de cellules avait été effectuée par la voie intraparenchymateuse transcapsulaire après dissection, sur un seul animal, par analogie avec ce qui est réalisé en cardiomyoplastie cellulaire. Néanmoins, cette méthode, s'étant avérée trop néfaste pour le rein, a rapidement été mise de côté. En effet, le rein est un organe de structure complexe par rapport au cœur. La méthode a été traumatisante pour l'organe, entraînant des saignements importants. Le site d'injection a été le siège de réactions inflammatoires importantes et de fibrose cicatricielle locale, entraînant la mort d'un grand nombre de cellules greffées. En outre, injecter des cellules localement n'a pas permis d'atteindre toutes les structures du rein (glomérules, tubes contournés, tubes collecteurs) et la répartition cellulaire de la greffe n'a pas été harmonieuse. Cependant, une étude récente [38] a montré que, chez la souris, les cellules souches injectées sous la capsule rénale ont le pouvoir de migrer dans le parenchyme rénal et de s'intégrer aux différentes structures.

C. Interprétation des résultats de l'étude

Tout d'abord, cet essai démontre que les cellules souches mésenchymateuses injectées dans l'artère rénale intègrent le parenchyme rénal.

Les brebis du groupe I (témoin) n'ont pas subi d'ischémie reperfusion et ont été sacrifiées trois semaines après la greffe. Dans ce groupe, 32% des glomérules ont intégré des CSM. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature [23, 44], et montrent que les CSM participeraient au renouvellement physiologique du rein.

Cependant, dans les études de Poulson et al. et d'Imasawa et al., sur modèles murins, les cellules souches greffées *via* une veine périphérique intègrent les glomérules à un taux inférieur. On peut supposer que, dans notre étude, l'injection des cellules *via* l'artère rénale favorise le recrutement glomérulaire des CSM (filtre). Ainsi, l'intégration des CSM dans les glomérules pourrait résulter d'un phénomène de piégeage des cellules dans les vaisseaux de la touffe glomérulaire. Néanmoins, nous n'avons pas observé, sur nos lames, de cellules regroupées en amas (emboles) au pôle vasculaire du glomérule.

Dans ces études, réalisées sur des modèles animaux irradiés, les cellules greffées semblent également participer au turn-over des tubules. Cependant, l'irradiation du receveur accroît la perméabilité vasculaire et entraîne sans doute des lésions tubulaires, ce qui pourrait expliquer le recrutement plus important des cellules pour la régénération des tubules.

Ces résultats suggèrent une **participation active des CSM au renouvellement physiologique du rein**. Le mécanisme de passage des CSM de la lumière vasculaire vers l'interstitium rénal n'est pas connu. En cardiologie, il a été démontré, sur des modèles expérimentaux d'infarctus cardiaques, que les CSM injectées dans les artères coronaires étaient capables de s'intégrer au niveau de la lésion. Ces cellules passeraient les barrières tissulaires par diapédèse [55]. Dans le rein, le même phénomène migratoire a été observé récemment par Oliver et al. [38].

L'étude des reins des animaux malades, ayant subi l'ischémie reperfusion, a montré une augmentation significative de l'ensemencement des glomérules, par rapport aux animaux témoins.

Cependant, dans les autres modèles d'ischémie reperfusion [26, 34, 37], les auteurs n'ont pas noté la présence de cellules greffées dans les glomérules. Le syndrome d'ischémie reperfusion entraînant principalement des lésions tubulaires, ce recrutement préférentiel peut paraître surprenant dans notre étude. Néanmoins, des lésions glomérulaires peuvent aussi être présentes lors d'ischémie reperfusion notamment lors de nécrose corticale, ce qui était le cas sur notre modèle animal.

La comparaison des résultats des différents groupes d'animaux malades (II et III) en fonction du délai d'injection des CSM après la lésion rénale révèle **l'existence d'une « fenêtre thérapeutique »**.

Dans notre étude, nous notons une augmentation très significative ($p < 0.0001$) de l'ensemencement des tubules des brebis du groupe II, qui ont été greffées juste après avoir subi l'ischémie reperfusion : 8% des tubules contenaient au moins une cellule marquée, alors que de rares cellules marquées ont été retrouvées dans les tubules des autres groupes. La différence d'ensemencement peut être corrélée à l'évolution dans le temps des lésions du syndrome ischémie reperfusion. Ainsi, le groupe II a été greffé lors de la première phase d'altération du parenchyme rénal (de nécrose tubulaire aiguë), et les cellules greffées ont davantage colonisé les tubules. Dans le groupe III, les CSM ont été greffées quinze jours après l'ischémie reperfusion, certainement trop tard pour participer au phénomène de régénération tubulaire. Des résultats similaires sont rapportés par certains auteurs [26, 34, 37]. On peut donc supposer qu'il existe un temps « optimal » de réalisation de la greffe, corrélé avec la pathogénie de l'insuffisance rénale aiguë.

Ces résultats suggèrent que **les CSM greffées colonisent préférentiellement les zones lésées des reins ischémiés et participent activement à la régénération rénale**. On peut penser que la lésion d'ischémie reperfusion entraîne le relargage, par le rein, de médiateurs spécifiques qui augmentent le recrutement des cellules souches en circulation, par l'organe lésé pour accélérer sa réparation. Ce processus a été évoqué par de nombreux auteurs [25-26, 34, 37], mais le mécanisme précis au niveau rénal n'a pas encore été élucidé. Une étude portant sur le système nerveux central a montré que le Transforming Growth Factor α (TGF α) était impliqué dans la migration des cellules souches nerveuses du cerveau [15]. L'injection de TGF α dans le lobe frontal du cerveau de rats présentant des lésions de substantia nigra, a engendré la migration massive de cellules souches gliales et neuronales vers le site lésé. Cette découverte est un grand espoir pour le traitement de la maladie de Parkinson, et de même, l'identification du facteur activateur des cellules souches du rein serait d'un grand intérêt pour le traitement des maladies rénales.

Après leur intégration au rein, les CSM greffées doivent se différencier en cellules rénales pour participer à la régénération de l'organe. Les résultats des expériences de double marquage ont montré que les cellules souches mésenchymateuses, greffées de manière autologue dans l'artère rénale **peuvent donner naissance à différents types de cellules rénales épithéliales, comme les podocytes ou les cellules tubulaires**. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature et laissent supposer que ces cellules seraient fonctionnelles.

Le mécanisme de différenciation des CSM n'a pas été élucidé. Pour certains auteurs, ces cellules subissent une transdifférenciation [30, 40] : sous l'influence de facteurs locaux, les CSM acquièrent le phénotype de cellules rénales spécifiques. D'autres études ont attribué la capacité de plasticité des cellules de la moelle osseuse à des phénomènes de fusion cellulaire entre les cellules rénales et les cellules injectées [51, 54]. Alvarez-Dolado et al. a démontré *-in vivo* et *in vitro* des fusions cellulaires entre les cellules de la moelle osseuse et les hépatocytes dans le foie, les cellules de Purkinje dans le cerveau, et les cardiomyocytes dans le cœur mais ne l'a pas mis en évidence dans le rein et le poumon [2].

D. Perspectives

Dans notre étude, nous n'avons pas pu déterminer si la différenciation des CSM était due à un mécanisme de transdifférenciation ou de fusion cellulaire. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider ce phénomène, notamment s'il s'agit de différenciation cellulaire en identifiant les facteurs locaux qui orientent le devenir des cellules. A long terme, on pourrait alors espérer orienter spécifiquement la différenciation des cellules pour régénérer des cellules spécifiques du néphron. Une autre alternative pourrait être l'injection de cellules préalablement différenciées *in vitro*, sous réserve que leur potentiel d'intégration *via* l'artère rénale soit identique [21].

Une étude intégrant une évaluation fonctionnelle de la réparation du tissu rénal après thérapie cellulaire serait intéressante, notre modèle d'ischémie reperfusion d'un seul rein ne l'ayant pas permis. Ainsi la réalisation d'une ischémie reperfusion bilatérale engendrerait des variations sensibles des paramètres rénaux et permettrait, après comparaison avec les animaux témoins, l'évaluation de la récupération après la greffe cellulaire.

L'application de la thérapie cellulaire en néphrologie mériterait d'être évaluée sur d'autres modèles de pathologies rénales. Certains auteurs ont effectué des greffes de cellules souches sur des modèles de néphropathies toxiques ou auto-immunes [22, 37], et ont obtenu des résultats prometteurs. De même, dans le cadre de déficit néphronique lors de pathologie rénale congénitale (obstruction du bas appareil urinaire), le développement rénal est interrompu. Il existe des techniques permettant la levée de l'obstacle *in utero*, mais la récupération fonctionnelle rénale est aléatoire. L'injection de cellules souches au fœtus en développement pourrait être un espoir pour restaurer ou améliorer le développement néphronique.

Enfin, l'association de la thérapie cellulaire à la thérapie génique pourrait également contribuer au traitement des néphropathies. On peut imaginer modifier génétiquement les cellules souches en culture afin qu'elles expriment une protéine déficiente dans une population cellulaire rénale chez le patient, permettant le traitement de certaines néphropathies par injection de cellules modifiées par transgénése. Ainsi, Yamagishi et al. ont greffé, à des souris, des cellules souches de la moelle transgéniques (porteuses d'un antagoniste des récepteurs à interleukines 1) dans le but de réduire l'inflammation provoquée par l'obstruction urétérale expérimentale [59].

Pour terminer, citons une étude récente sur les cellules souches rénales (Oliver et al., 2004). Des injections pulsatiles de BrdU, marqueur des noyaux de cellules en division, ont été administrées à des souriceaux. Deux mois plus tard, les souriceaux ont été sacrifiés et leurs reins prélevés pour étude anatomopathologique. Les résultats de cette étude révèlent la présence de cellules marquées principalement au niveau de la papille rénale. Ces cellules ont, *in vitro*, les caractéristiques de cellules souches tissulaires adultes, suggérant que la papille rénale est la « niche » des cellules souches rénales [38]. Ces travaux méritent d'être poursuivis et ouvrent à de nouvelles perspectives.

CONCLUSION

Cette étude expérimentale a permis de mettre au point une technique de sélection et d'amplification des cellules souches mésenchymateuses dont l'intérêt a été démontré par leur origine embryologique et leur potentiel de différenciation dans différentes études.

L'utilisation de ce type de cellules souches adultes pour un essai de thérapie cellulaire en néphrologie permet la réalisation d'une greffe autologue, ne créant pas de réponse immunitaire de rejet chez le receveur.

De plus, cette étude menée sur un modèle de grande taille, la brebis, met en œuvre une technique de chirurgie mini-invasive, qui pourrait alors trouver son application à l'homme.

Enfin cette étude montre, sur un modèle d'insuffisance rénale aiguë, qu'il existe une fenêtre thérapeutique ; en fonction du délai de greffe cellulaire par rapport à l'ischémie reperfusion d'un rein, les cellules ne s'intègrent et ne se différencient pas de la même manière, s'orientant préférentiellement vers les zones lésées. Ainsi, le moment optimal de greffe lors de néphropathie ischémique serait proche de la lésion ; les cellules souches greffées colonisent davantage les tubules, segments du rein les plus abîmés lors d'ischémie rénale.

Néanmoins, la thérapie cellulaire en néphrologie n'en ait qu'à ses débuts, les résultats sont encourageants mais d'autres études sont indispensables avant d'envisager toute application clinique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AL-AWQATI Q, OLIVER JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int.*, 2002, **61**, 387-395.
2. ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFEFFER K *et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003, **425**, 968-973.
3. BACHOUD-LEVI AC, REMY P, NGUYEN JP, BRUGIERES P, LEFAUCHEUR JP, BOURDET C *et al.* Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet*, 2000, **356**, 1975-1979.
4. BARBASH IM, CHOURAQUI P, BARON J, FEINBERG MS, ETZION S, TESSONE A *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 2003, **108**, 863-868.
5. BEHR L. *Evaluation du potentiel des cellules souches mésenchymateuses de la moelle dans la régénération du rein après ischémie. Etude expérimentale chez la brebis adulte.* Thèse Méd. Vet., Alfort, 2003, 62p.
6. BERTHOD F, DAMOUR O. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. *Br. J. Dermatol.*, 1997, **136**, 809-816.
7. BIANCO P, GEHRON ROBEY P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2000, **105**, 1663-1668.
8. BONNET JM, CADORE JL. Physiopathologie de l'insuffisance rénale chronique. *Point Vet.*, 1995, **26(166)**, 1099-1109.
9. BOOTH C, POTTEN CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2000, **105**, 1493-1499.
10. BORENSTEIN N, HEKMATI M, BRUNEVAL P, MONTARRAS D. Unambiguous identification of implanted cells after cellular cardiomyoplasty: a critical issue. *Circulation*, 2004, **109**, 209-210.
11. BRAUN JP. *Exploration biologique des affections rénales du chien.* "Les indispensables de l'animal de compagnie". PMCAC Editions, 1996, 84p.
12. BRUDER SP, JAISWAL N, RICALTON NS, MOSCA JD, KRAUS KH, KADIYALA S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.*, 1998, 247-256.
13. COTARD JP. *Néphrologie et Urologie du chien et du chat.* "Les indispensables de l'Animal de Compagnie". PMCAC Editions, 1993, 63p.
14. COULOMBEL L. Adult stem cells: seing is not being. *Med. Sci.*, 2003, **19**, 683-694.
15. FALLON J, REID S, KINYAMU R, OPOLE I, OPOLE R, BARATTA J *et al.* In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, **97**, 14686-14691.

16. FONTAINE JJ. *Le rein et les glandes endocrines. (fascicule 6). Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Histologie, Embryologie et Anatomie-Pathologique vétérinaires.* 1993, 12p.
17. GAGE FH. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, **287**, 1433-1438.
18. GOUJON I. La transplantation rénale lors d'insuffisance rénale chronique chez le chat. *Point Vet.* 2003, **34(241)**, 12-13.
19. GUPTA S, VERFAILLIE C, CHMIELEWSKI D, KIM Y, ROSENBERG ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1285-1290.
20. HOURMANT M. Le syndrome ischémie-reperfusion rénale. *Nephrologie*, 1999, **20**, 371-375.
21. IMAI E, ITO T. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr. Nephrol.*, 2002, **17**, 790-794.
22. IMASAWA T, UTSUNOMIYA Y. Stem cells in renal biology: bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy. *Exp. Nephrol.*, 2002, **10**, 51-58.
23. IMASAWA T, UTSUNOMIYA Y, KAWAMURA T, ZHONG Y, NAGASAWA R, OKABE M *et al.* The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, **12**, 1401-1409.
24. ITO T. Stem cells of the adult kidney: where are you from? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003, **18**, 641-644.
25. ITO T, SUZUKI A, IMAI E, OKABE M, HORI M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, **12**, 2625-2635.
26. KALE S, KARIHALOO A, CLARK PR, KASHGARIAN M, KRAUSE DS, CANTLEY LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J. Clin. Invest.*, 2003, **112**, 42-49.
27. KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**, 10711-10716.
28. KOUSHANPOUR E, KRIZ W. *Renal Physiology. Principles, structure and function.*, 2nd ed. New York : Springer Verlag, 1986, 390p.
29. KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene. Ther.*, 2002, **9**, 754-758.
30. KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.*, 2001, **105**, 369-377.
31. KRIZ W, BANKIR L. A standard Nomenclature for structures in the kidney. *Eur. J. Physiol.*, 1988, **411**, 113-120.
32. LEGRAIN M, JACOBS C. L'insuffisance rénale chronique, un problème permanent de santé publique. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 1999, **183**, 11-21.
33. LENOIR N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science*, 2000, **287**, 1425-1427.
34. LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ *et al.* Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003, **14**, 1188-1199.
35. MENASCHE P. Cell transplantation in myocardium. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, **75**, 20-28.

36. MENGEL M, JONIGK D, MARWEDEL M, KLEEBERGER W, BREDT M, BOCK O *et al.* Tubular chimerism occurs regularly in renal allografts and is not correlated to outcome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, **15**, 978-986.
37. MORIGI M, IMBERTI B, ZOJA C, CORNA D, TOMASONI S, ABBATE M *et al.* Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, **15**, 1794-1804.
38. OLIVER JA, MAAROUF O, CHEEMA FH, MARTENS TP, AL-AWQATI Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest.*, 2004, **114**, 795-804.
39. ORLIC D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, **996**, 152-157.
40. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM., LI B *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410**, 701-705.
41. PETERSEN BE, TERADA N. Stem cells: a journey into a new frontier. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, **12**, 1773-1780.
42. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**, 143-147.
43. POULSOM R. Does bone marrow contain renal precursor cells? *Nephron. Exp. Nephrol.*, 2003, **93**, e53.
44. POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, RYAN E, WYLES S, NAVARATNARASAH S *et al.* Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.*, 2001, **195**, 229-235.
45. RENAULT V, PIRON-HAMELIN G, FORESTIER C, DIDONNA S, DECARY S, HENTATI F *et al.* Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp. Gerontol.*, 2000, **35**, 711-719.
46. ROBIN C, PFLUMIO F, VAINCHENKER W, COULOMBEL L. Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells. *J. Exp. Med.*, 1999, **189**, 1601-1610.
47. ROCHA V, CHASTANG C, SOUILLET G, PASQUINI R, PLOUVIER E, NAGLER A *et al.* Related cord blood transplants: the Eurocord experience from 78 transplants. Eurocord Transplant group. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, **21 Suppl 3**, S59-62.
48. RONCO P. Facteurs de progression de l'insuffisance rénale chronique et leur prévention. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 1999, **183**, 65-77.
49. RYAN EA, LAKEY JR, PATY BW, IMES S, KORBUTT GS, KNETEMAN N *et al.* Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*, 2002, **51**, 2148-2157.
50. SHERIDAN AM, BONVENTRE JV. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Contrib. Nephrol.*, 2001, 7-21.
51. TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002, **416**, 542-545.
52. TROPEL P, NOEL D, PLATET N, LEGRAND P, BENABID AL, BERGER F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell. Res.*, 2004, **295**, 395-406.
53. VAN DER KOOY D, WEISS S. Why stem cells? *Science*, 2000, **287**, 1439-1441.

54. VASSILOPOULOS G, WANG PR, RUSSELL DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 2003, **422**, 901-904.
55. WANG JS, SHUM-TIM D, CHEDRAWY E, CHIU RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2001, **122**, 699-705.
56. WANG JS, SHUM-TIM D, GALIPEAU J, CHEDRAWY E, ELIOPOULOS N, CHIU RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2000, **120**, 999-1005.
57. WATT FM, HOGAN BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000, **287**, 1427-1430.
58. WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2000, **61**, 364-370.
59. YAMAGISHI H, YOKOO T, IMASAWA T, MITARAI T, KAWAMURA T, UTSUNOMIYA Y. Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 609-616.