

CELLULES-SOUCHES DANS LES MALADIES RÉNALES ET VASCULAIRES

H. HALLER, F. BAHLMANN, K. DE GROOT et D. FLISER*

Ces dernières années, beaucoup de progrès ont été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de l'atteinte microvasculaire, considérée comme un élément essentiel dans un certain nombre de maladies rénales. La glomérulosclérose progressive ainsi que la perte des capillaires péri-tubulaires ont été montrées comme étant très proches des lésions de fibrose tubulo-interstitielle induites par l'ischémie. Il est aujourd'hui admis que l'intégrité de l'endothélium formant les capillaires glomérulaires mais aussi les capillaires péri-tubulaires est essentielle pour la préservation de la fonction rénale. Des études expérimentales ont révélé que des facteurs de croissance pro-angiogéniques comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) jouent un rôle central dans le maintien des structures rénales ainsi que de la fonction rénale. L'intégrité de l'endothélium vasculaire semble également sous le contrôle de cellules-souches. Les cellules-souches sont considérées désormais comme une nouvelle option thérapeutique extrêmement intéressante pour toute une variété de pathologies en médecine cardiovasculaire tels que l'infarctus myocardique, l'insuffisance cardiaque et la maladie vasculaire périphérique. Des résultats très encourageants, venant des études expérimentales ainsi que des modèles animaux, ont conduit à un certain nombre d'études cliniques, concernant essentiellement le traitement de patients ayant un infarctus myocardique ou une insuffisance cardiaque [1-4]. Dans ces études, des cellules mononucléées dérivées de la moelle osseuse de patients ont été cultivées *ex vivo*, puis réinjectées par voie intraveineuse ou intracoronaire. La majorité de ces petites études ont essentiellement exploré la faisabilité et l'absence d'effets secondaires liés à cette approche expérimentale. Dans la première étude randomisée et contrôlée effectuée par le Département de Médecine Interne de l'Université de Hanovre, plusieurs paramètres de la fonction myocardique ont été étudiés chez des patients recevant par voie intracoronaire des cellules souches, après un infarctus myocardique aigu [5]. Ces études préliminaires sont prometteuses et vont certainement encourager la communauté scientifique dans le domaine de la

* Abteilung für Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover.

médecine cardiovasculaire pour lancer des études à large échelle. Cependant, en dehors de l'indication de l'insuffisance myocardique aiguë, l'utilisation de cellules-souches pourrait être appliquée dans la prévention de la progression de la maladie athéromateuse chronique et des syndromes qui en découlent. L'utilisation des cellules-souches circulantes paraît même plus intéressante que l'utilisation des cellules dérivant de la moelle osseuse car ces dernières pourraient, sur le plan théorique, être stimulées, in vivo et de façon permanente, grâce à une intervention pharmacologique.

CELLULES-SOUCHES ENDOTHÉLIALES

Les cellules-souches endothéliales sont ces dernières années au centre de la recherche cardiovasculaire car elles sont considérées comme responsables de la réparation endothéliale et vasculaire [6, 7]. Ce point a été étudié en détail dans des études expérimentales utilisant différents modèles animaux de lésions cardiovasculaires et de réparation de l'endothélium [8-10]. Les cellules-souches endothéliales circulantes peuvent atteindre ou coloniser des sites de néovascularisation active [11, 12]. En réalité, ces cellules semblent orchestrer la re-endothélisation des parois vasculaires endommagées, en sécrétant des quantités importantes de cytokines qui attirent et contrôlent les cellules qui sont indispensables dans le processus de la réparation endothéliale [13, 14]. Des informations provenant d'études humaines semblent encore plus intéressantes : chez des patients ayant une maladie coronaire, le nombre de cellules-souches endothéliales est significativement corrélé au nombre de facteurs de risques cardiovasculaires et cette corrélation existe également chez des sujets sains, sans athérosclérose manifeste [15, 16]. Dans la population générale, le nombre de cellules-souches endothéliales est également corrélé de façon significative au degré de dysfonction endothéliale [16]. Pour finir, dans certaines situations à haut risque cardiovasculaires telles que le diabète sucré, le nombre et la fonction des cellules-souches endothéliales semblent diminuées [17].

Les cellules-souches endothéliales dérivent des cellules-souches hématopoïétiques CD34+, qui se différencient, à travers des voies différentes, en érythrocytes, thrombocytes, diverses lignées de leucocytes ainsi qu'en cellules endothéliales. Ces cellules-souches mononucléées peuvent être analysées dans le sang périphérique des patients en cytométrie de flux, utilisant divers marqueurs de surface des cellules-souches tels que le CD34 et le CD133, mais aussi grâce à leurs caractéristiques morphologiques [18]. Contrairement aux cellules-souches hématopoïétiques, les cellules-souches endothéliales sont difficiles à mettre en évidence en cytométrie de flux en raison essentiellement de leur petit nombre dans la circulation périphérique, rendant complexe leur identification et leur subdivision. Grâce à leur adhésion sur différents milieux de culture, les cellules-souches endothéliales peuvent cependant être isolées des autres fractions cellulaires mononucléées sanguines puis secondairement, identifiées en culture cellulaire grâce à des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales [6, 7]. En théorie, leur nombre peut être multiplié in vitro afin d'en obtenir un usage thérapeutique [2].

CELLULES-SOUCHES ENDOTHÉLIALES CHEZ DES PATIENTS AYANT UNE MALADIE RÉNALE

Le patient insuffisant rénal est caractérisé par une morbidité cardiovasculaire extrêmement élevée, et la maladie athéromateuse (infarctus myocardique et accident vasculaire cérébral) est la première cause de décès dans cette population [19]. Plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires sont impliqués dans cette incidence accrue de maladie vasculaire chez le patient insuffisant rénal. Néanmoins, une des hypothèses avancées est qu'un défaut dans la réparation endothéliale pourrait être la conséquence d'une diminution quantitative ou qualitative des cellules-souches endothéliales. Nous avons récemment pu démontrer que le nombre de cellules-souches endothéliales circulantes est significativement réduit chez des patients présentant une IRC avancée, après comparaison avec une population-témoin, appariée pour l'âge et le sexe [20]. Une observation similaire a été rapportée chez des patients hémodialysés [21]. La corrélation significative entre le nombre de cellules-souches hématopoïétiques CD34+ et le nombre de cellules-souches endothéliales chez les patients insuffisants rénaux suggère un problème de différenciation des cellules précurseurs en cellules-souches endothéliales, ou un problème de mobilisation des cellules-souches endothéliales à partir de la moelle osseuse dans un contexte d'urémie. Cette hypothèse est également suggérée par l'observation d'un effet inhibiteur du sérum de patient urémique sur la capacité de différenciation de cellules-souches endothéliales *in vitro* [20]. De façon similaire, leur capacité à migrer et à former des structures tubulaires et vasculaires *in vitro* semble également réduite dans ces conditions. Un facteur important contribuant au déficit de cellules-souches endothéliales chez des patients en insuffisance rénale avancée pourrait être la carence en érythropoïétine (EPO), puisque le taux plasmatique d'EPO semble indépendamment corrélé au nombre de cellules-souches endothéliales circulantes chez ces mêmes patients. En conclusion, le problème de différenciation des cellules-souches endothéliales chez le patient insuffisant rénal pourrait être à l'origine d'une dysfonction des mécanismes de réparation vasculaire, ce qui est compatible avec les données connues sur la dysfonction de la cellule endothéliale chez le patient urémique [22].

POUVONS-NOUS MODULER LE NOMBRE DE CELLULES-SOUCHES ENDOTHÉLIALES ?

Des études récentes ont montré que nous pouvions modifier le nombre de cellules-souches endothéliales fonctionnellement actives dans le sang périphérique en augmentant soit leur prolifération, soit leur libération par la moelle osseuse, ce qui bien sûr ouvre la voie à de multiples interventions thérapeutiques potentielles. Des études expérimentales mais aussi certains travaux en pathologie humaine ont révélé que le nombre de cellules-souches endothéliales circulantes peut être majoré par l'administration de statines [23, 24] ou d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (données personnelles non publiées). Par ailleurs, il a été démontré que l'érythropoïétine humaine recombinante ainsi que son analogue, la darbépoïétine, sont des agents stimulants puissants pour la prolifération et

l'activation des cellules-souches endothéliales, ce qui a suscité un vif intérêt dans la communauté néphrologique [25-27]. Des doses d'érythropoïétine bien moins importantes que celles utilisées dans le traitement de l'anémie chez le patient insuffisant rénal semblent être à l'origine d'une stimulation importante et persistante du recrutement de cellules-souches endothéliales, dans les modèles *in vitro* mais aussi *in vivo*. L'érythropoïétine humaine recombinante améliore la fonction cellulaire (par exemple, l'activité de formation de structures tubulaires) mais active également des cascades enzymatiques telles que celles de l'Akt tyrosine kinase, au sein des cellules-souches endothéliales [25, 27]. La mise en œuvre de cette voie enzymatique semble rendre les cellules endothéliales plus résistantes à des situations d'ischémie, comme cela a été récemment démontré pour des cellules mésenchymateuses transfectées avec le gène Akt1 [28].

La stimulation, des cellules-souches endothéliales par l'administration des statines et/ou d'une érythropoïétine recombinante (ou de ses analogues) pourrait donc être une stratégie thérapeutique prometteuse en médecine cardiovasculaire, dans le but de prévenir les séquelles de la maladie athéromateuse. Cette approche pourrait être d'autant plus utile chez les patients urémiques, à haut risque cardiovasculaire, et cela dès les premiers stades de l'insuffisance rénale.

EPO ET PRÉVENTION DES LÉSIONS RÉNALES

Nous avons ainsi testé l'hypothèse que l'EPO préserve le rein, tant sur le plan histologique que fonctionnel, grâce à son intervention sur l'endothélium vasculaire, en utilisant un modèle de réduction néphronique chez le rat (néphrectomie de 5/6^e). Dans ce modèle, on observe des lésions sévères de l'endothélium micro- et macrovasculaire rénal, conduisant à une sclérose vasculaire et glomérulaire progressive accompagnée de lésions tubulo-interstitielles fibreuses d'origine ischémique, évoluant vers l'insuffisance rénale terminale. Nous avons choisi l'utilisation de darbépoïétine alpha de façon chronique et à petites doses, puisque nous avons récemment démontré que ce produit stimule les cellules-souches endothéliales dérivant de la moelle osseuse, et cela même à des doses qui ne permettent pas d'augmenter l'hématocrite. La survie des rats après néphrectomie des 5/6^e était significativement améliorée dans le groupe traité par darbépoïétine par rapport au groupe témoin. La concentration plasmatique de créatinine ainsi que la protéinurie des rats contrôles ont augmenté significativement pendant la période d'observation, et cela de façon significativement plus importante dans le groupe non traité par la darbépoïétine. Cet effet était observé malgré l'absence de différence notable dans les taux d'hématocrite entre les deux groupes, pendant toute la période d'observation. L'analyse histologique chez les animaux témoins montrait des lésions vasculaires et glomérulaires sévères (prolifération des gros vaisseaux en bulbes d'oignons, glomérulosclérose avec hyalinose et nécrose fibrinoïde des artéioles afférentes adjacentes). Par ailleurs, une raréfaction des capillaires péri-tubulaires était notée et ces lésions vasculaires étaient accompagnées de fibrose tubulo-interstitielle notable. Ces aspects typiques histologiques étaient atténués de façon significative après traitement par la darbépoïétine et le score composite mesurant l'impact histologique chronique était significativement réduit chez les animaux recevant la darbépoïétine.

CELLULES-SOUCHES INTRATISSULAIRES ET RÉGÉNÉRATION RÉNALE – L'EXPÉRIENCE DE LA RAIE

Chez les mammifères, la formation du néphron est finie à la naissance ou peu après. La prolifération cellulaire intrarénale se réduit généralement au simple renouvellement des cellules tubulaires épithéliales, par prolifération, ainsi qu'à un processus angiogénique intrarénal [29, 30]. Ce potentiel régénératif limité explique les capacités réduites de réponse à une agression rénale. Les glomérules lésés ne se régèrent pas et la destruction glomérulaire est la cause majeure de la réduction néphronique. Les néphrons restants répondent par une compensation glomérulaire et une croissance tubulaire. Néanmoins, la perte néphronique n'est pas compensée par la génération de nouveaux néphrons (« néonéphrogenèse ») chez les mammifères. À l'inverse, les vertébrés inférieurs ont des possibilités bien supérieures à celles des mammifères à cet égard. Les poissons à squelette osseux (téléostes) peuvent développer de nouveaux néphrons, comme cela a été montré dans une étude [31]. La formation de nouveaux néphrons était rapportée dans les reins de poissons rouges après administration de substances néphrotoxiques [32]. Par ailleurs, la présence de tissus néphrogéniques a été décrite chez les poissons cartilagineux (élastombranchés) et notamment, chez la raie [33]. Etant donné la similitude entre les reins des élastombranchés et les reins des mammifères, l'étude de ces animaux pourrait nous servir de modèle pour la régénération rénale. Nous avons donc étudié la néphrogenèse dans les reins de raie et testé l'hypothèse que ce processus est stimulé par la réduction de la taille des reins.

La zone néphrogénique chez la raie adulte ressemble au rein métanéphrique embryonnaire et contient des cellules parenchymateuses de type cellules-souches, une ébauche du système collecteur ainsi qu'un début de formation de système artériel. Quatre stades de développement néphronique ont été analysés et définis : stade I : agrégation de cellules mésenchymateuses ; stade II : formation de structures tubulaires avec épithélium polyédrique ; stade III : ségrégation des segments du néphron ; stade IV : néphron fonctionnel. Nous avons analysé ces différents stades en étudiant l'histologie rénale après une néphrectomie partielle. Il semble évident que de nouveaux néphrons se développent chez ces animaux ayant subi une néphrectomie partielle. Cette prolifération était fortement stimulée dans la zone néphrogénique du rein partiellement réséqué, mais aussi dans le rein controlatéral, après une période de 10 semaines.

Dans cette expérience, nous avons caractérisé une zone néphrogénique dans le rein adulte de la raie. Cette zone néphrogénique représente une niche à l'intérieur du rein où les cellules-souches intratissulaires semblent résider. Ce tissu répond à une réduction partielle de la masse rénale par la formation de nouveaux néphrons. Le processus morphogénique que nous appelons « néonéphrogenèse » est un mécanisme important pour la croissance rénale mais aussi pour la réparation des reins lésés dans ces organismes. Les analyses morphologiques démontrent qu'une zone de tissu rénal embryonnaire persiste chez la raie adulte.

Nous avons donc démontré que des cellules mésenchymateuses capables de néphrogenèse établissent un contact avec les ébauches de tubes collecteurs et qu'une interaction intervient entre ces deux structures cellulaires. L'origine exacte des cellules-souches intratissulaires chez l'animal adulte reste cependant encore incertaine. Ces cellules-souches [34] pourraient dériver d'une réserve de cellules-souches embryonnaires à l'intérieur même du rein des poissons élastombranchés.

Nous suggérons que ces cellules-souches sont les précurseurs des cellules mésenchymateuses visibles au stade I de la formation du néphron mais qu'elles contribuent également au développement du néphron proximal dans le stade II de la formation rénale. Nous suggérons par ailleurs que le mésenchyme produit ces cellules capables d'auto-renouvellement pour une néphrogenèse permanente. Deux types cellulaires sont des candidats possibles pour les cellules-souches rénales : des cellules mésenchymateuses unipolaires, ou des cellules indifférenciées lymphoïdes, de petite ou de moyenne taille. Des expériences récentes chez la souris ainsi que des données provenant des reins transplantés en pathologie humaine suggèrent que l'épithélium tubulaire est capable d'incorporer des cellules d'origine médullaire et éventuellement contribuer à la réparation tissulaire rénale [35].

Remerciements

Nous remercions vivement Alexandre Karras, d'avoir bien voulu se charger de la traduction de ce texte.

BIBLIOGRAPHIE

1. STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, **106**, 1913-1918.
2. ASSMUS B, SCHANCHINGER V, TEUPE C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, **106**, 3009-3017.
3. PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 2003, **107**, 2294-2302.
4. TSE HF, KWONG YL, CHAN JK et al. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 2003, **361**, 47-49.
5. WOLLERT KC, MEYER GP, LOTZ J et al. Randomized controlled clinical trial of intracoronary autologous bone marrow cell transfer post myocardial infarction. *Circulation*, 2003, **108**, 2723 (Abstract).
6. ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, **85**, 221-228.
7. PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, **95**, 952-958.
8. TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**, 434-438.
9. KAWAMOTO A, GWON HC, IWAGURO H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, **103**, 634-637.
10. KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, **7**, 430-436.
11. CROSBY JR, KAMINSKI WE, SCHATTEMAN G et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*, 2000, **87**, 728-730.
12. KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**, 3422-3427.
13. REHMAN J, LI J, ORSCHELL CM et al. Peripheral blood « endothelial progenitor cells » are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, **107**, 1164-1169.

14. URBICH C, HEESCHEN C, AICHER A et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2003, **108**, 2511-2516.
15. VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, **89**, E1-E7.
16. HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, **348**, 593-600.
17. TEPPER OM, GALIANO RD, Capla JM et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, **106**, 2781-2786.
18. SUTHERLAND DR, ANDERSON L, KEENEY M et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*, 1996, **5**, 213-226.
19. DRUEKE TB. Aspects of cardiovascular burden in pre-dialysis patients. *Nephron*, 2000, **85**, S9-S14.
20. DE GROOT K, Bahlmann FH, Sowa J et al. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int (in revision)*.
21. EIZAWA T, MURAKAMI Y, MATSUI K et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin*, 2003, **19**, 627-633.
22. COHEN G, HAAG-WEBER M, HORL WH. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int*, 1997, **62**, S79-S82.
23. LLEVADOT J, MURASAWA S, KUREISHI Y et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, **108**, 399-405.
24. DIMMELER S, AICHER A, VASA M et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, **108**, 391-397.
25. BAHLMANN FH, DE GROOT K, DUCKERT T et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int*, 2003, **64**, 1648-1652.
26. HEESCHEN C, AICHER A, LEHMANN R et al. Erythropoietin is a potent physiological stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003, **102**, 1340-1346.
27. BAHLMANN FH, DE GROOT K, SPANDAU JM et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004, **103**, 921-926.
28. MANGI AA, NOISEUX N, KONG D et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 2003, **9**, 1195-1201.
29. NIGAN SK et al. LIEBERTHAL W. Acute renal failure III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol, Renal Physiology*, 2000, **279**, F3-F11.
30. CARMELIET P, COLLEN D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol*, 1997, **273**, H2091-H2104.
31. HENTSCHEL H. Vergleichend histologisch-histochemische Untersuchungen an den Harnorganen von Stichlingen. Thesis Med., Hannover, 1973.
32. REIMSCHÜSSEL R, BENNETT RO, MAY EB, LIPSKY MM. Renal tubular cell regeneration, cell proliferation and chronic nephrotoxicity in the goldfish *Carassius auratus* following exposure to a single sublethal dose of hexachlorobutadiene. *Diseases of aquatic organisms*, 1990, **8**, 211-224.
33. HENTSCHEL H, STORB U, TECKHAUS L et al. The central vessel of the renal countercurrent bundles of two marine elasmobranchs – dogfish (*Scyliorhinus caniculus*) and skate (*Raja erinacea*) – as revealed by light and electron microscopy with computer-assisted reconstruction. *Anat Embryol*, 1998, **198**, 73-89.
34. ZAPATA AG, TORROBA M, SACEDÓN R et al. Structure of lymphoid organs of elasmobranchs. *J Exp Zool*, 1996, **275**, 125-143.
35. WEISSMAN IL, ANDERSON DJ et al. GAGE F. Stem and progenitor cells : origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiation. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2001, **17**, 387-403.