

UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

UFR des sciences

Ecole doctorale des Génomes aux organismes

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Par

Sabine FRANCOIS

**Etude de la capacité plastique des Cellules Souches
Mésenchymateuses humaines (CSM) après irradiation du
tissu receveur : approche thérapeutique de l'atteinte multi-
organe radio-induite**

Soutenance le 27 janvier 2006

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Bernard MIGNOTTE
Monsieur le Professeur Michel AROCK
Monsieur le Professeur Pierre CHARBORD
Monsieur le Professeur Luc DOUAY
Monsieur le Docteur Dominique THIERRY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

« Le vrai peut quelquefois n'être pas vraisemblable »

Nicolas Boileau, 1636-1711

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la responsabilité de Dominique Thierry dans le laboratoire de Thérapie Cellulaire et de Radioprotection accidentelle (LTCRA) à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), de Fontenay-aux-roses et de l'hôpital St Antoine à Paris. Je remercie vivement Dominique Thierry qui a dirigé cette thèse, pour la confiance qu'il m'a témoigné et ses conseils.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Norbert-Claude GORIN qui a su se rendre disponible pour me conseiller et qui me fait, aujourd'hui, l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Messieurs les Professeurs Michel AROCK et Pierre CHARBORD d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie du temps qu'ils m'ont consacré et de leurs questions et remarques qui ont amélioré mon manuscrit et affiné ma réflexion.

Je remercie également le Professeur Bernard MIGNOTTE d'avoir bien voulu évaluer cette thèse en participant au jury en tant qu'examineur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Alain CHAPEL qui a su guider ce travail avec enthousiasme et compétence. Merci pour les nombreux conseils dont tu m'as fait profiter, merci pour ta pédagogie, la confiance que tu as eu dans mon travail et tes encouragements permanents. Merci encore de m'avoir donné l'opportunité d'exposer nos travaux dans de nombreux congrès. En tant que ta première thésarde, j'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi sur un sujet si prometteur pour lequel même de l'autre côté de l'Atlantique ils ont trouvé nos travaux fortement intéressants (en souvenir de la Nouvelle Orléans).

Je remercie également Monsieur le Docteur Patrick GOURMELON, Madame Jocelyne AIGUEPERSE, Monsieur Philippe VOISIN de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et de m'avoir donné les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Je leur prie de croire en ma sincère reconnaissance.

Je remercie infiniment Mme Bénédicte ALLENET, Mme Noelle MATHIEU, Mme Johanna STEPHANI-FRICK, Mme Sandrine BOUCHET et Mlle Christelle MAZURIER, de m'avoir fait profiter de leur rigueur scientifique, leurs conseils et leurs soutiens.

Je n'oublie pas Monsieur Jean-Marc BERTHO, Mme Pascale MONTI et Mme Christelle DEMARQUAY pour m'avoir aidé par leurs réflexions scientifiques constructives apportées tout au long de ces travaux au cours de nos réunions de travail.

Je souhaite remercier, tout particulièrement trois personnes qui ont formé le microenvironnement de ma thèse. Merci X 10⁶ (ce n'est pas la concentration d'une greffe) à Mlle Amandine SACHE, Monsieur Moubarak MOUISEDDINE et Mme Alexandra LEPAUL qui m'ont offert leurs compétences et leurs soutiens et qui de part leur motivation m'ont aidé à achever de nombreux travaux et ce toujours dans la joie durant ses trois années.

Merci également à Mlle Muriel ISOIR et Mme Marie LEPESANT pour notre soutien mutuel entre thésardes et nos séjours aux journées des thèses.

Je remercie également Morad, Agnès, Sandra, Mâamar, Olivier, Frédérique, Fabien, Valérie et tous mes collègues du SRBE pour leurs conseils, leurs encouragements et pour tous les moments passés ensemble.

Je n'oublie pas Magali et Williams qui sont mes amis précieux et qui affrontent depuis de longues années mes déboires informatiques et autres...

Un grand merci à Cyril, qui m'a soutenu et supporté avec un calme olympien. Je te remercie très sincèrement pour toute l'attention et la patience que tu as eu envers moi ces derniers mois.

Enfin, je remercie de tout mon cœur mes parents, mes grands parents et Jacques qui ont su me transmettre leur persévérance et leur passion du travail. Merci d'avoir cru en moi à chaque seconde et de m'avoir épaulé, supporté et redressé dans les moments difficiles. Merci de m'offrir la chance de réaliser mes projets dans les meilleures conditions. Je remercie la cigogne qui m'a déposé près de vous ce 25 décembre 1976.

RESUME :	1
Valorisation du travail :	2
GLOSSAIRE	3
Liste des Figures	5
Liste des Tableaux	6
INTRODUCTION	9
1. Les cellules souches de l'organisme adulte	10
1.1. L'homéostasie tissulaire et les cellules souches	10
1.2. La moelle osseuse	13
2. Les cellules souches mésenchymateuses	15
2.1. Les différentes origines tissulaires des CSM	15
2.2. Le caractère souche des CSM de la moelle osseuse	15
2.2.1. Auto renouvellement et prolifération des CSM.....	15
2.2.2. Capacité de différenciation <i>in vitro</i> des CSM.....	16
2.3. Caractérisation des CSM de la moelle osseuse	19
2.3.1. Phénotype des CSM	19
2.3.2. Hétérogénéité des CSM : sous-populations de CSM humaines.....	20
2.3.3. Les CSM sont des réservoirs de cytokines	21
2.3.4. La télomérase est inactive dans les CSM isolées de MO.....	22
3. Fonctionnalité des cellules souches mésenchymateuses	23
3.1. Fonctionnalité <i>in vitro</i> des CSM.....	23
3.1.1. CSM et soutien de l'hématopoïèse	23
3.1.2. Effet immunomodulateur des CSM.....	24
3.2. Greffe de CSM dans des modèles animaux et essais cliniques	24
3.2.1. CSM et soutien de l'hématopoïèse <i>in vivo</i>	24
3.2.1.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux	24
3.2.1.2. Essais cliniques	25
3.2.2. Effet immunomodulateur des CSM <i>in vivo</i>	26
3.2.2.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux	26
3.2.2.2. Essais cliniques	26
3.2.3. CSM et la réparation tissulaire <i>in vivo</i>	27
3.2.3.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux	27
3.2.3.2. Essais cliniques	31
4. Réponse biologique des tissus irradiés	32
4.1. Réponse aux dommages à l'ADN	32
4.2. Irradiation de tissu sain	33
4.2.1. De la mort cellulaire à la déplétion tissulaire radio-induite	33
4.2.2. Les irradiations accidentelles sévères	35
4.2.2.1. Le syndrome d'irradiation aiguë (SIA)	35
4.2.2.2. Le syndrome gastro-intestinal.....	37
4.2.2.3. Le syndrome hématopoïétique.....	38
4.2.2.4. Les brûlures radio-induites	40
4.2.2.5. L'atteinte vasculaire radio-induite	41
4.2.2.6. Le syndrome cérébro-vasculaire	42
4.3. Irradiation thérapeutique dans le traitement des cancers et effets tardifs....	42
But de l'étude	45
MATERIELS ET METHODES	48

5.	Obtention des CSM à partir de MO humaine	48
5.1.	Isolement des cellules mononuclées de la MO humaine	48
5.2.	Mise en culture des CSM humaines	48
5.3.	Analyse phénotypique des CSM humaines isolées de MO.....	49
5.4.	Etude du potentiel de différenciation multiple des CSM	50
6.	Les trois configurations d'irradiations et greffe de CSM dans le modèle murin	
NOD/SCID.....	51
6.1.	Le modèle murin NOD/SCID	51
6.2.	Mise au point des Trois configurations d'irradiation	52
6.2.2.	Irradiations localisées	53
6.2.2.1.	Irradiation abdominale	53
6.2.2.2.	Irradiation de la patte droite postérieure.....	54
6.3.	Greffe des CSM dans le modèle murin NOD/SCID	54
6.4.	Prélèvements des tissus.....	54
7.	Etude des paramètres physiologiques du modèle murin NOD/SCID.....	55
7.1.	Etude du taux plasmatique des paramètres biochimiques du sang	55
7.1.1.	Dosage plasmatique de l'urée.....	56
7.1.2.	Dosage plasmatique de la créatinine	57
7.1.3.	Dosage plasmatique des transaminases ASAT/ALAT	58
7.2.	Etude des taux sériques des protéines pro-inflammatoires	58
8.	Biodistribution et différenciation <i>in vivo</i> des CSM	59
8.1.	Extraction d'ADN et ARN.....	59
8.1.2.	Extraction d'ADN	60
8.1.3.	Extraction des ARN totaux à la synthèse d'ADNc	61
8.2.	Mise en évidence de l'ADN humain dans les tissus murins par PCR quantitative	61
8.3.	Etude de l'expression des gènes humains SH2, SH3 et alpha-SMA dans les CSM humaines <i>in vivo</i> par RT-PCR.....	62
8.4.	Les contrôles.....	64
9.	Etude histologique	64
9.1.	Marquage trichromique HES	65
9.2.	Marquage immunohistochimique TUNEL.....	66
9.3.	Marquage immunohistochimique Ki 67 murin.....	66
9.4.	Marquage immunohistochimique de la bêta-2-microglobuline humaine	67
9.5.	Marquage immunohistochimique PCNA	68
10.	Analyse statistique	68
RESULTATS	70
11.	Caractérisation des CSM isolées et amplifiées à partir de MO	70
11.1.	Capacité de différenciation <i>in vitro</i> des CSM.....	70
11.2.	Phénotype des CSM cultivées à partir de MO humaine.....	71
12.	Mise en évidence des atteintes tissulaires radio-induites dans le modèle murin	
NOD/SCID.....	73
12.1.	Atteintes radio-induites après une ICE	74
12.1.1.	Suivi du poids après ICE	74
12.1.2.	Etude histologique des atteintes tissulaires après ICE	

12.1.3.	Dosage plasmatique de l'urée, de la créatinine et des transaminases après ICE	76
12.2.	Atteintes radio-induites après une IA	79
12.2.1.	Suivi du poids après IA.....	79
12.2.2.	Etude histologique des atteintes tissulaires après IA.....	80
12.2.2.1.	Mesure de la taille des villosités intestinales	80
12.2.2.2.	Quantification de l'apoptose et de la prolifération cellulaire intestinale.....	81
12.2.3.	Dosage plasmatique de l'urée, de la créatinine et des transaminases après IA	83
12.3.	Etude de l'évolution des lésions de la patte irradiée après IP.....	85
12.3.1.	Observations microscopiques de la peau des pattes irradiées	86
13.	Etude de la biodistribution des CSM dans les tissus irradiés	88
13.1.	Etude de la biodistribution des CSM après ICE à 3,2Gy	89
13.1.1.	Cinétique d'implantation des CSM de J3 à J120	89
13.1.1.1.	Implantation précoce des CSM après ICE	89
13.1.1.2.	Distribution à long terme des CSM après ICE	91
13.1.2.	Etude quantitative de l'implantation des CSM à J15 post-ICE	95
13.1.2.1.	Etude quantitative de l'implantation des CSM sans irradiation	95
13.1.2.2.	Etude quantitative de l'implantation des CSM à 15 post-ICE	96
13.2.	Etude de la biodistribution des CSM après IA à 8Gy	98
13.2.1.	Cinétique d'implantation des CSM de J3 à J60	99
13.2.2.	Etude quantitative de l'implantation des CSM à J15 post-IA.....	101
13.2.3.	Etude comparative des taux d'implantation des CSM à J15 entre ICE et IA	103
13.3.	Etude de la biodistribution des CSM après IP	104
13.3.1.	Etude qualitative de l'implantation des CSM en fonction de la dose reçue	104
13.3.2.	Etude quantitative de l'implantation des CSM en fonction de la dose reçue	107
13.3.2.1.	Dans les organes de la zone irradiée	107
13.3.2.2.	Dans les organes n'appartenant pas à la zone la plus irradiée	108
14.	Etude du comportement des CSM dans les tissus irradiés	109
14.1.	Localisation <i>in situ</i> des CSM par marquage immunohistochimique de la bêta-2-microglobuline humaine	109
14.2.	Etude de la différenciation <i>in vivo</i> des CSM par RT-PCR.....	114
14.3.	Mise en évidence de l'état prolifératif des CSM implantées	115
15.	Impact d'une greffe de CSM sur les atteintes radio-induite.....	116
15.1.	Effets d'une greffe de CSM sur les paramètres biochimiques du sang.....	116
15.1.1.	Rappels des paramètres biochimiques du sang.....	116
15.1.2.	Biochimie du sang dans le cas d'une greffe de CSM après ICE	117
15.1.3.	Biochimie du sang dans le cas d'une greffe de CSM après IA	119
15.2.	Effets d'une greffe de CSM sur l'homéostasie intestinale après IA	121
15.2.1.	Effet d'une greffe de CSM sur la taille des villosités intestinales.....	121
15.2.2.	Effet d'une greffe de CSM sur l'apoptose intestinale	122
15.2.3.	Effet d'une greffe de CSM sur la prolifération cellulaire intestinale ..	124
15.3.	Effets d'une greffe de CSM sur la sécrétion de cytokines, chemokines et MMPs 48h post irradiations	125
15.3.1.	Effet d'une greffe de CSM sur les taux sériques de cytokines	125
15.3.2.	Effet d'une greffe de CSM sur les taux sériques de chemokines	127
15.3.3.	Effet d'une greffe de CSM sur les taux sériques de métalloprotéinases	

15.3.4. Conclusions	135
DISCUSSION	137
16. La greffe de CSM comme stratégie thérapeutique pour le traitement des atteintes tissulaires radio-induites	137
17. Implantation des CSM dans les tissus irradiés.	138
18. Les trois Voies d'action des CSM dans un organisme irradié	147
19. perspectives d'études de la migration des CSM vers les organes lésés	148
ARTICLE	150
DISCUSSION	162
ANNEXES	176
BIBLIOGRAPHIE.....	195

RESUME :

Les Cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent une multi-potentialité et des propriétés de régulation immunologique et inflammatoire. La thérapie cellulaire basée sur leur greffe semble une approche particulièrement prometteuse à l'heure actuelle. Mes travaux ont porté sur la mise en évidence de la recolonisation des tissus murins irradiés par les CSM dérivées de moelle osseuse humaine. J'ai développé au cours de ma thèse des modèles d'irradiations corps entier et localisées sur le modèle murin NOD/SCID et optimisé la greffe de CSM dans ces modèles. Cette étude a permis de mettre en évidence que la migration des CSM dépend de la configuration, de la dose et du temps post-irradiation. L'injection intraveineuse de CSM humaines a permis leur implantation dans un grand nombre d'organes irradiés et de rétablir l'homéostasie intestinale 3 jours post-IA. La biodistribution des CSM après irradiation suggère une migration dose-dépendante préférentielle des CSM vers les organes de la zone surexposée. L'implantation des CSM autour des axes péri-vasculaires et dans des unités fonctionnelles ainsi que la diminution de l'expression de certains gènes spécifiques des CSM, suggèrent une modulation phénotypique de ces cellules implantées. La thérapie cellulaire basée sur la greffe de CSM semble une approche prometteuse pour le traitement des irradiations accidentelles et même des effets tardifs liés à la radiothérapie.

ABSTRACT :

The therapeutic potential of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (hMSC) has recently been brought into the spotlight of many fields of research. One possible application of the approach is the repair of injured tissues arising from side effects of radiation treatments and accidents. The first challenge in cell therapy is to assess the quality of the cell and the ability to retain their differentiation potential during the expansion process. Efficient delivery to the sites of intended action is also necessary. We addressed both questions using hMSC cultured and then infused to Non Obese Diabetes/Severe Combined Immunodeficiency (NOD/SCID) mice submitted to total body irradiation. Further, we tested the impact of additional local irradiation superimposed to total body irradiation (TBI), as a model of accidental irradiation. Our results showed that the hMSC used for transplant have been expanded without significant loss in their differentiation capacities. After transplantation into adult unconditioned mice, hMSC not only migrate in bone marrow but also into other tissues. Total body irradiation increased hMSC implantation in bone marrow and muscle and further led to engraftment in brain, heart, and liver. Local irradiation, in addition to TBI, increased both specific homing of injected cells to the injured tissues and to other tissues outside the local irradiation field. MSC may participate to restoration of intestinal homeostasis 3 days post-abdominal irradiation. This study suggests that using the potential of hMSCs to home to various organs in response to tissue injuries could be a promising strategy to repair the radiation induced damages

Valorisation du travail :

Publications :

A. Chapel, O. DEAS, M. Bensidhoum, **S. Francois**, M. Mouiseddine, P. Poncet, A Durbach, J. Airguese, P. gourmelon, NC Gorin, F. Hirsh, D. Thierry. **In vivo gene targeting of IL-3 into immature hematopoietic cells through CD117 receptor mediated antibody gene delivery**. Genet Vaccines Ther: 2004 oct 27;2(1):16; pmid: 15509303.

M. BENSIDHOUM, A. Chapel, **S. Francois**, C. Demarquay, C. Mazurier, L. Fouillard, S. Bouchet, JM Bertho, P. Gourmelon, J. Aigueperse, P. Charbord, NC Gorin, D Thierry, M. Lopez. **Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment**. Blood 2004 May 1; 103 (9): 3313-9 pmid 14715641

A. SEMONT, **S. FRANÇOIS**, M. MOUISEDINE, A. FRANÇOIS, A. SACHE, J. FRICK, D. THIERRY, A. CHAPEL
Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. Revue: Advances in experimental medicine and biology in press

S. FRANÇOIS, M. BENSIDHOUM, M. MOUISEDINE, C. MAZURIER, B. ALLENET, A. SEMONT, J. FRICK, A. SACHE, S. BOUCHET, D. THIERRY, P. GOURMELON, N-C GORIN, A. CHAPEL **Local irradiation induces not only homing of human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution following irradiation damages**. Stem cells in press, pmid 16339642

Presentations orales:

S. FRANÇOIS, M. BENSIDHOUM, M. MOUISEDINE, C. MAZURIER, S. BOUCHET, J. FRICK, C. DEMARQUAY, L. FOUILLARD, M. LOPEZ, D. THIERRY, N. GORIN, A. CHAPEL **Human Mesenchymal Stem Cells home specifically to the radiation injured tissues in a NOD/SCID mouse model**. ISEH Paris 5-8 juillet 2003 Présentation orale 120 session 1.

FRANÇOIS S., BENSIDHOUM M, MOUISEDINE M, MAZURIER C, BOUCHET S, FRICK J., C. DEMARQUAY C, BERTHO JM, THIERRY D, LOPEZ M, CHAPEL A. **Etude de l'implantation des CSM dans le modèle murin NOD/SCID irradié corps entier ou localement**. SFBCT Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire Paris, Val de Grâce, 24-27 septembre 2003 présentation orale septembre 2003 présentation orale.

A. SEMONT, **S. Francois**, M. MOUISEDINE, B. ALLENET, N. MATHIEU, J. FRICK, D. THIERRY, A. CHAPEL : **Multiple human Mesenchymal stem cell engraftment and specie homing to injured tissues**. 2nd international conference on tissues engineering CRETE (GRECE) 2005. Présentation Orale

S. Francois, M. Mouiseddine, B. Allenet, A. Semont, N. Mathieu, D. Thierry, A. Chape. **Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) engraft to multiple organs and home at injured sites after local irradiation** : The 34th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology. Présentation orale Leicester, UK 2005

Posters :

S. FRANÇOIS, M. BENSIDHOUM, JM BERTHO, M. MOUISEDINE, C. MAZURIER, S. BOUCHET, J. FRICK, CHRISTELLE DEMARQUAY, F. TROMPIER, D. THIERRY, A. CHAPEL **Régénération tissulaire des lésions radio-induites par les Cellules Souches Mésochymateuses (CSM) Humaines dans le modèle de souris NOD/SCID**. CIRFA Batz sur mer 30 juin -4 juillet 2003 Poster.

S. FRANÇOIS, M. MOUISEDINE, M. BENSIDHOUM, J. FRICK, S. BOUCHET, C. MAZURIER, D. THIERRY, M. LOPEZ, A. CHAPEL. **Phenotypical variations of human Mesenchymal Stem Cell after implantation into injured tissues in a NOD/SCID mouse model**. 10th Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy 7-10 Mai 2004. Poster

S. FRANÇOIS, M. BENSIDHOUM, M. MOUISEDINE, C. MAZURIER, S. BOUCHET, J. FRICK, P. RICHARD, L. FOUILLARD, M. LOPEZ, N.C. GORIN, D. THIERRY, P. CHARBORD, A. CHAPEL **Mesenchymal stem cells expanded from stro+ cells are multipotential progenitors that home to multiple mesoderm and non-mesoderm-derived tissues and take part in the formation of the hematopoietic niche**. 4th Annual Conference on Annual Conference on Mesenchymal and NonHematopoietic Stem Cells. October 14-16. 2004 New Orleans.

S. FRANÇOIS, M. MOUISEDINE, A. SEMONT, B. ALLENET, N. MATHIEU, J. FRICK, D. THIERRY, A. CHAPEL. **Human mesenchymal stem cell (hMSC) home specifically to radiation injured tissues in a NOD/SCID mouse model**. 34 th annual scientific meeting of the international society for experimental hematology. Glasgow. 2005 Poster

S. FRANÇOIS, M. MOUISEDINE, A. SEMONT, B. ALLENET, N. MATHIEU, J. FRICK, D. THIERRY, A. CHAPEL. **Traitements des irradiés accidentels ; apport de la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches adultes**. SFRP Nantes 2005 Poster.

GLOSSAIRE

ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
ALAT	<i>ALanine Amino Transférase</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ASAT	<i>ASpartate Amino Transférase</i>
ARNm	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
CD 45	<i>LCA, Ly5</i>
CD 73	<i>Ecto-5'-nucléotidase</i>
CD 105	<i>Endogline, SH2</i>
CFU-F	<i>Colony Forming Unit-Fibroblast</i>
CMH.	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
CSM	<i>Cellules Souches Mésoenchymateuses</i>
CSH	<i>Cellules Souches Hématopoïétiques</i>
DL	<i>Dose létale</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Flt-3	<i>Fetal liver tyrosine kinase 3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage colony stimulatif factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM-X	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IA	<i>Irradiation abdominale</i>
ICE	<i>Irradiation corps entier</i>
IFN-g	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL-X	<i>Interleukine</i>
IP	<i>Irradiation de la patte droite postérieure</i>
LTC-IC	<i>Long term culture initiating cells</i>
MAPCS	<i>Multipotent Adult progenitor cells</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protéin-1</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha, CCL3</i>
MO	<i>Moelle Osseuse</i>
MMPs	<i>Métalloprotéinases</i>
NO	<i>Monoxyde d'azote</i>
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficient</i>
OPN	<i>Ostéopontine</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RANTES	CCL5
RI	Rayonnements ionnisants
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
VCAM-X	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>

Liste des Figures

Figure 1 : Localisation anatomique des différentes cellules souches dans l'organisme humain adulte.

Figure 2 : Anatomie de la moelle osseuse.

Figure 3 : Filiation des différentes populations cellulaires dans la MO.

Figure 4: Cinétique des dommages radio-induits

Figure 5 : Schéma du Déséquilibre homéostatique dû aux rayonnements ionisants

Figure 6 : le syndrome gastro intestinal - la mort intestinale

Figure 7 : Exemple d'aplasie radio induite

Figure 8 : Différenciation in vitro des CSM isolées et amplifiées à partir de MO humaine

Figure 9 : Analyse par FACS d'un échantillon de CSM au second passage

Figure 10 : Courbe de survie des souris NOD/SCID après une ICE de 3 à 4Gy

Figure 11 : Suivi du poids des souris NOD/SCID après une ICE à 3.2 Gy

Figure 12 : Marquages trichromiques HES de la rate et de la moelle osseuse après irradiation corps entiers

Figure 13 : Effet d'une irradiation corps entier sur les taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques

Figure 14 : Suivi du poids des souris NOD/SCID après une IA de 8 Gy

Figure 15: Effet d'une irradiation abdominale sur la taille des villosités du jéjunum

Figure 16 : Marquage immunohistologique (TUNEL) et quantification des cellules apoptotiques.

Figure 17 : Marquage immunohistologique de la protéine Ki67 murine et quantification des cellules proliférantes

Figure 18 : Effet d'une irradiation abdominale sur le taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques

Figure 19 : Evaluations macroscopiques des lésions de la patte droite postérieure irradiée à 25 Gy

Figure 20 : Marquages trichromiques HES des peaux des pattes postérieures 6 semaines post-IP

Figure 21 : Faible pourcentage d'implantation des CSM 15 jours post-ICE à 3,2 Gy.

Figure 22: Forte implantation des CSM 15 jours post-ICE à 3.2 Gy

Figure 23 : Faible taux d'implantation des CSM humaines 15 jours post-IA à 8Gy.

Figure 24: Taux élevé d'implantation des CSM (supérieur à 0,1%) 15 jours post-IA à 8 Gy

Figure 25 : Comparaison du taux d'implantation des CSM entre ICE et IA dans les organes de la sphère abdominale

Figure 26 : Marquage immunohistochemique des cellules humaines autour des vaisseaux

Figure 27: Marquage immunohistochemique des cellules humaines dans le rein, le cerveau, la rate, le foie et l'estomac

Figure 28 : Marquage immunohistochemique des cellules humaines dans le jéjunum 3 jours post-IA

Figure 29 : Variation du taux d'expression des marqueurs spécifiques des CSM après implantation.

Figure 30 : Marquage immunohistochemique des CSM en prolifération 30 jours post-ICE

Figure 31 : Dosage plasmatique 7 jours post-ICE à 3,2 Gy

Figure 32: Dosage plasmatique 3 jours post-IA à 8 Gy

Figure 33: Effet d'une greffe de CSM sur la taille des villosités intestinales après irradiation abdominale

Figure 34 : Effet d'une greffe de CSM sur l'apoptose intestinale après irradiation abdominale

Figure 35 : effet d'une greffe de CSM sur la prolifération intestinale après irradiation abdominale

Figure 36: Effet d'une greffe sur les taux sérique d'IL-1 α 48 heures post-irradiation

Figure 37: Dosage sérique de TARC 48 heures post-irradiation

Figure 38 : Dosage sérique de RANTES 48 heures post-irradiation

Figure 39 : Dosage sérique de MCP-1 48 heures post-irradiation

Figure 40 : Dosage sérique de MMP9 48 heures post-irradiation

Figure 41 : Effet d'une greffe de CSM sur le taux sérique de MMP2 après irradiation.

Liste des Tableaux

Tableau I : Les cellules souches humaines

Tableau II : Potentiel de différenciation *in vitro* des CSM isolées à partir de MO, stimuli moléculaires et marqueurs cellulaires

Tableau III : les marqueurs de surface des CSM

Tableau IV : Les différents ARNm des cytokines et récepteur des CSM

Tableau V: Pourcentage de cellules SH2+, SH3+ et CD45 + dans les CSM cultivées

Tableau VI : Pourcentage de souris positives pour la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J3 à J15 post-irradiation

Tableau VII : Pourcentage de souris positives pour la présence la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J30 à J120 post-irradiation ICE.

Tableau VIII : Pourcentage de souris positives pour la α -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR 14 jours après injection des animaux shams

Tableau IX: Pourcentage de souris positives pour la α -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J3 à J60 post-IA

Tableau X : Pourcentage de souris NOD/SCID positives pour le gène de la β -globine humaine détecté par PCR dans le muscle et le fémur de la patte irradiée

Tableau XI : Pourcentage de souris NOD/SCID positives pour le gène de la β -globine humaine détecté par PCR dans les organes n'appartenant pas à la zone irradiée par des IP de 15, 20 et 25 Gy

Tableau XII: Pourcentage de cellules positives pour la α -globine humaine détectées par PCR dans le quadriceps et le fémur de la patte droite irradiée à 15, 20 et 25 Gy.

Tableau XIII: Pourcentage de cellules humaines positives pour le gène de la α -globine humaine détecté par PCR dans les organes n'appartenant à la zone surexposée après une IP à 25 Gy.

Tableau XIV: Biochimie du sang du modèle murin NOD/SCID
Tableau XV : Dosage sérique des interleukines

Tableau XVI : Effet modulateur d'une greffe de CSM sur le taux de cytokines, chemokines et MMPs circulantes:

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cellules des tissus des organismes supérieurs se renouvellent à partir des compartiments des cellules souches. En cas de déplétion cellulaire excessive au sein de ces compartiments, l'organisme est dans l'incapacité de maintenir son homéostasie tissulaire. Par thérapie cellulaire, on entend un ensemble de nouvelles techniques ou technologies permettant le remplacement ou la régénération des cellules non fonctionnelles par des cellules saines et fonctionnelles. Parmi les cellules utilisées en clinique humaine, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont permis d'obtenir des résultats encourageants lors de plusieurs essais. Cependant, de nombreuses questions concernant la distribution des CSM dans les tissus, leur devenir et leurs mécanismes d'actions restent irrésolus.

Le travail présenté dans cette thèse concerne l'utilisation potentielle des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) pour le traitement des atteintes tissulaires radio-induites. Ce domaine recouvre le traitement des victimes d'accidents d'irradiation (et potentiellement d'acte de terrorisme nucléaire), mais aussi l'amélioration des protocoles de radiothérapie par la diminution de l'impact sur les tissus sains du traitement visant les cellules tumorales. Pour cette étude, un modèle animal d'irradiation et de greffe xénogénique a été développé et exploité. L'interaction des CSM humaines avec les tissus lésés a été mise en évidence et quantifiée en fonction du temps. L'impact de la thérapie cellulaire sur la reprise fonctionnelle de l'organisme irradié a également été étudié.

La réparation tissulaire ainsi proposée ouvre un vaste champ de recherche et d'application en clinique humaine. Cette approche repose sur la capacité à obtenir, amplifier, manipuler et greffer des cellules souches ou issues directement de celles-ci.

1. Les cellules souches de l'organisme adulte

1.1. L'homéostasie tissulaire et les cellules souches

La prolifération, la migration, la différenciation, sont les principaux processus cellulaires qui permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire au sein de l'organisme adulte. La prolifération cellulaire est impliquée dans la production et l'augmentation du nombre de cellules, la différenciation permet le maintien des fonctions de la plupart des lignées cellulaires et la migration consiste au déplacement des nouvelles cellules produites vers ou dans les tissus en renouvellement. Ces trois processus cellulaires permettent le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu (Young *et al.* 2004) (Muschler *et al.* 2004). Il faut distinguer deux catégories de tissus : ceux qui sont renouvelés en permanence par des cellules souches, et ceux qui contiennent des cellules souches "de réserve", qui ne sont pas actives spontanément. Les cellules de certains organes se renouvellent en permanence pendant la vie : le tissu sanguin, l'épiderme, l'intestin (et dans une moindre mesure : l'os et l'épithélium respiratoire). Ce renouvellement est la preuve physiologique de l'existence de cellules souches actives. Les cellules souches adultes remplissent cette fonction, d'une part en se multipliant à l'identique (l'auto-renouvellement) évitant le tarissement du réservoir de cellules souches, en proliférant pour produire des progéniteurs et en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques de diverses lignées cellulaires (la multipotentialité) (Verfaillie *et al.* 2002; Horwitz *et al.* 2003).. Les cellules souches hématopoïétiques et intestinales ont longtemps été considérées comme l'archétype des cellules souches d'un organe. Les organismes humains adultes contiennent plusieurs autres types de cellules souches incluant les cellules souches neuronales, épithéliales, mésenchymateuses (Minguell *et al.* 2001). Le Tableau I présente les principales cellules souches adultes (CS) connues. Il faut distinguer les voies de différenciation permettant

l'homéostasie des organes, des voies de différenciation obtenues expérimentalement (en italique) in vitro ou observé in vivo (relevant peut-être d'une fusion cellulaire). Il faut noter que l'isolement de CS au niveau du système digestif, de la moelle épinière, de la cornée, de la rétine, du foie, du pancréas et de la pulpe dentaire a également été décrit. La localisation anatomique des CS décrites dans le Tableau I est représentée dans la Figure 1.

Tableau I : Les cellules souches adultes humaines

Cellule souche	Source tissulaire	Cellules produites	Références
Hématopoïétiques	Moelle osseuse	Cellules sanguines, endothéliales, hépatiques et musculaires	(Fukushima <i>et al.</i> 1995; Lansdorp <i>et al.</i> 1995; Gussoni <i>et al.</i> 1999; Petersen <i>et al.</i> 1999)
Neuronales	Cerveau	Neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules sanguines	(McKay <i>et al.</i> 1997; Murphy <i>et al.</i> 1997; Armstrong <i>et al.</i> 2000)
Epithéliales	Intestin et épiderme	Toutes les cellules des cryptes de l'épithélium, et des couches épidermiques	(Bach <i>et al.</i> 2000; Lowell <i>et al.</i> 2000; Wright <i>et al.</i> 2000)
Mésenchymateuses	Moelle osseuse	Os, Cartilage, Tissu adipeux, cellules stromales, tendon, muscle, cellules stromales et cellules neuronales	(Caplan <i>et al.</i> 1994; Kuznetsov <i>et al.</i> 1997; Prockop <i>et al.</i> 1997; Kopen <i>et al.</i> 1999)
Embryonnaires	Blastocytes	Toutes les lignées cellulaires sauf trophoblaste	(Shamblott <i>et al.</i> 1998; Thomson <i>et al.</i> 1998)

Liste des différentes cellules souches dans l'organisme humain adulte (Lakshmiopathy et al 2005)

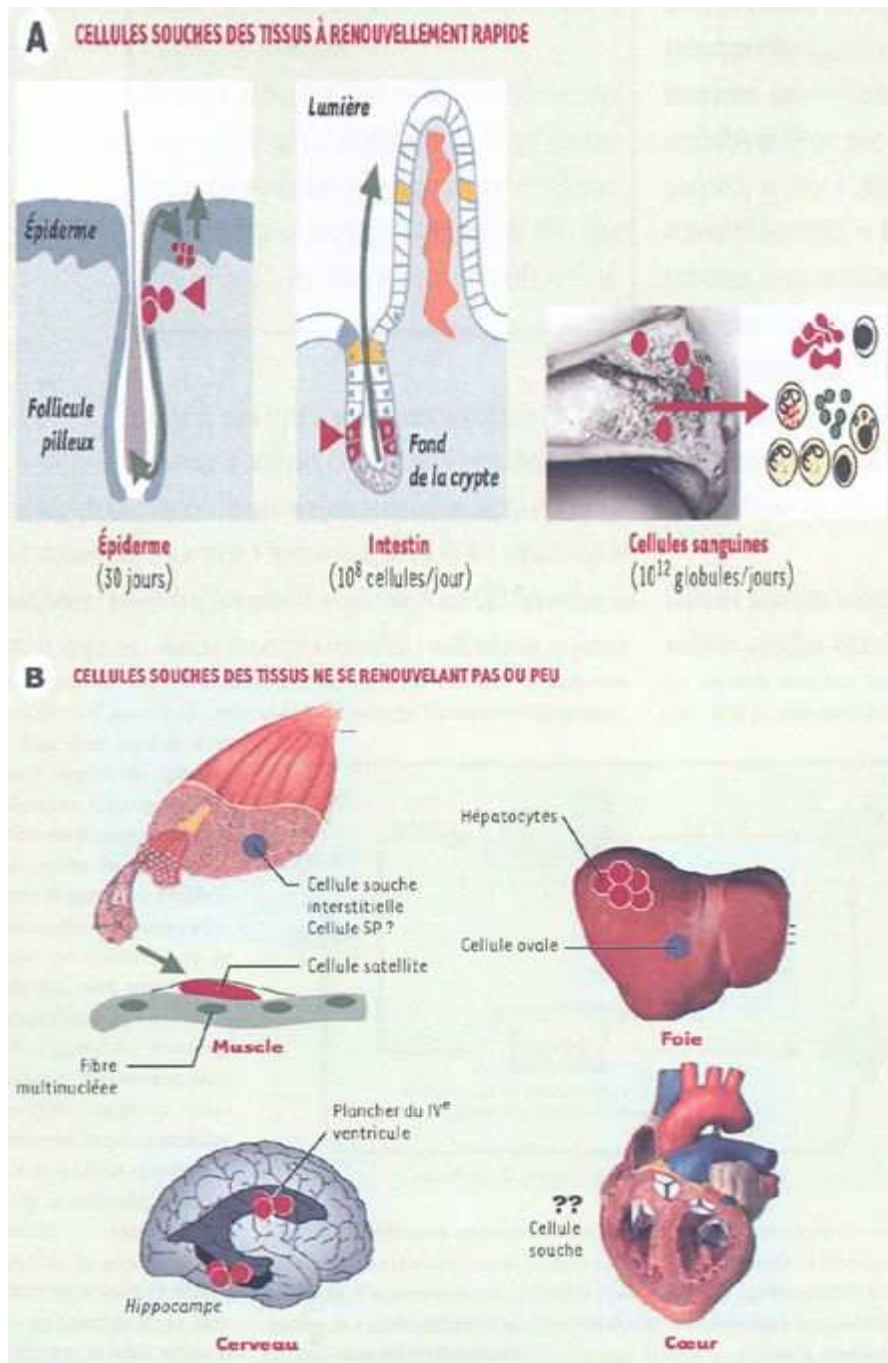


Figure 1 : Localisation anatomique des différentes cellules souches dans l'organisme humain adulte d'après Coulombel L 2003

A : Trois tissus ont un renouvellement rapide (1-2 mois) : les cellules souches y fonctionnent ainsi en permanence pour renouveler les cellules de la peau (et du système pileux), des villosités intestinales et du système hématopoïétique. Dans la peau et la crypte intestinale, les cellules souches ont été localisées de façon précise (pointes de flèches rouges), les flèches vertes indiquent les directions de la migration des cellules vers la surface épidermique et la lumière intestinale.

B : Dans les tissus quiescents, à faible renouvellement, des cellules souches sont présentes, leur localisation est également précise, mais leur fonction est moins bien définie. On en distingue deux types dans le muscle (les cellules satellites, pouvant être distinctes des cellules interstitielles SP) ainsi que dans le foie (les cellules ovales et les hépatocytes ont une fonction de cellule souche). Dans le cerveau, les cellules souches ont été localisées dans le plancher du IV^e ventricule et dans le gyrus denté de l'hippocampe. Au niveau cardiaque les cellules souches n'ont pas été identifiées

1.2. La moelle osseuse

Les études de thérapie cellulaire ont été initiées à partir de l'expérience apportée par les greffes en hématologie (Rowe *et al* 1997; Gorin *et al* 2002). La moelle osseuse (MO) est encore l'organe le plus étudié en tant que source de cellules pour la thérapie cellulaire. Elle contient plusieurs types de cellules souches principalement, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) donnant naissance aux différents lignages des cellules sanguines, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) assurant la fonction de soutien stromal et un type rare de cellules totipotentes, les MAPCS (Multipotent Adult progenitor cells) (Figure 2) (Van Damme *et al.* 2002). Les MAPCS ont été décrites comme étant les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse humaine (Verfaillie *et al* 2005). La Figure 3 représente une filiation possible pour les différentes populations de cellules présentes dans la moelle osseuse (Coulombel *et al* 2003). Il est actuellement difficile de déterminer si les MAPCS sont fonctionnelles *in vivo* à l'état « basal » car elles sont obtenues par des techniques de cultures longues et complexes.

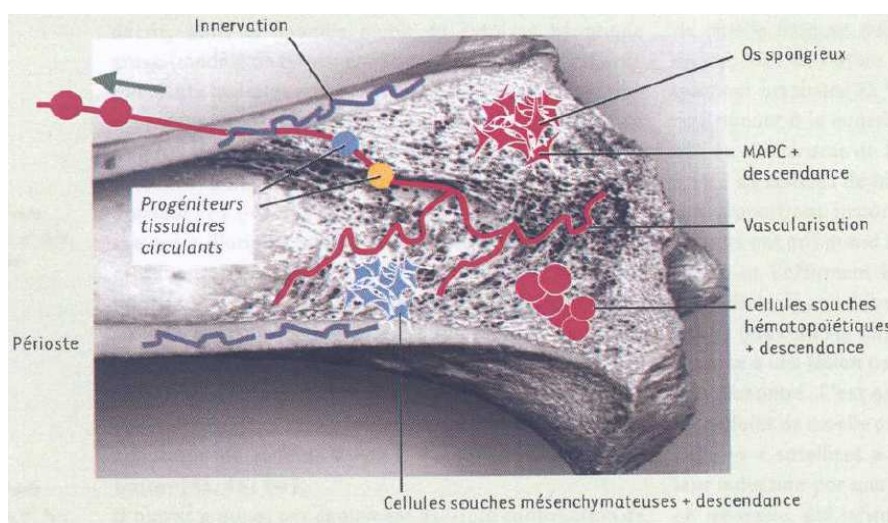


Figure 2 : Anatomie de la moelle osseuse d'après L. Coulombel 2003

Le tissu médullaire présent dans la cavité des os longs est très vascularisé (vaisseaux présentés en rouge), de nombreuses populations cellulaires, dont des cellules souches, y circulent en permanence et contaminent inévitablement tout prélèvement médullaire. Dans le parenchyme extra vasculaire, on trouve au moins trois populations de cellules souches, les MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cell), les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont extrêmement minoritaires par rapport à leur descendance, représentée par les progéniteurs et les précurseurs.

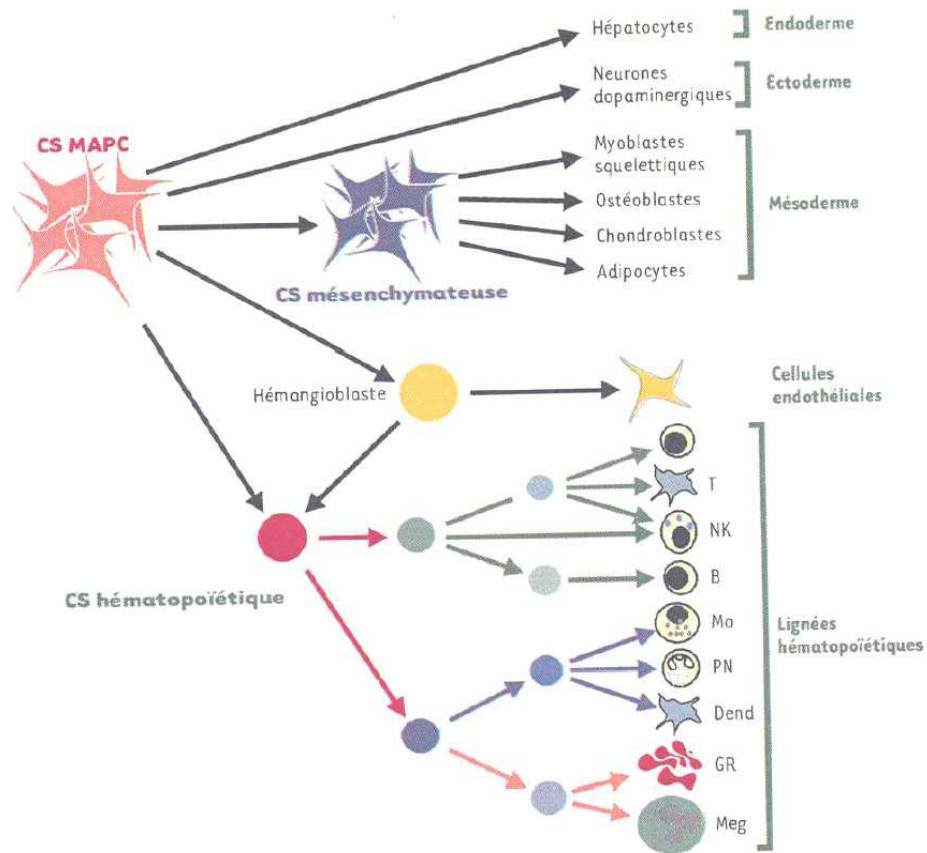


Figure 3 : Filiation des différentes populations cellulaires dans la MO d'après C. Coulombel : Ce schéma fait des MAPC (Multipotent adult progenitor cells) les ancêtres de toutes les population hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse. CS : Cellule Souche ; GR : Globule Rouge ; PN : Polynrophiles ; NK : Natural Killer ; Mo : Monocytes ; Meg : Mégacaryocytes ; T,B : Lymphocytes T et B ; Dend : Cellules dendritiques.

2. Les cellules souches mésenchymateuses

2.1. Les différentes origines tissulaires des CSM

Les Cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte (Pountos *et al.* 2005). C'est en 1976, que pour la première fois, des CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse (MO) (Friedenstein *et al.* 1976). Le terme de cellules souches mésenchymateuses a été donné par Arnold Caplan en 1991, les autres termes tels que CFU-F (Colony Forming Units-Fibroblast) ou "mesenchymal progenitor stroma cells" sont eux utilisés suivant la technique par laquelle elles sont isolées et mises en culture (Caplan *et al.* 2001). Les aspirats de MO sont considérés comme la source la plus riche en CSM et la plus accessible (Tuli *et al.* 2003). Les CSM ont été également isolées à partir de divers tissus incluant le cartilage (Alsalameh *et al.* 2004), le périoste (Cuevas *et al.* 2004), la membrane synoviale (De Bari *et al.* 2001), le liquide synovial (Jones *et al.* 2004), les muscles (Young *et al.* 2001) et les tendons (Salingcarnboriboon *et al.* 2003). Il a été également mis en évidence que le tissu foetal (Hu *et al.* 2003), le placenta, la veine ombilicale (Romanov *et al.* 2003), et le système vasculaire (Abedin *et al.* 2004) contiennent des CSM. Le tissu adipeux pourrait servir d'excellente source de CSM du fait de la quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires liés à la chirurgie (Dicker *et al.* 2005). Il est à noter que les CSM isolées à partir du tissu adipeux ont un potentiel chondrogénique et ostéogénique inférieur à celui des CSM isolées à partir de moelle osseuse (Im *et al.* 2005).

2.2. Le caractère souche des CSM de la moelle osseuse

2.2.1. Auto renouvellement et prolifération des CSM

Bien que limitées dans leur potentiel de prolifération et de différenciation par l'âge de l'individu, les CSM sont des cellules immatures (Colter *et al.* 2001; Fehrer *et al.* 2005) Ces cellules souches représentent 1/10000 à 1/100000 des cellules mononucléées (CMN) totales

de la MO et peuvent proliférer jusqu'à la 40^{ème} génération (Bruder *et al* 1997 ; Pittenger *et al* 1999). Il est possible que les CSM puissent proliférer au-delà de 50 divisions mais ceci semble le résultat d'un ajout de facteurs de croissance tel que le FGF-2 dans le milieu de culture (Bianchi *et al* 2003). La densité cellulaire semble également jouer un rôle dans la capacité d'expansion des CSM *in vitro* (Colter *et al* 2000). Le potentiel d'auto renouvellement des CSM reste une question ouverte. Comme le souligne la revue de Baksh D *et al*, la difficulté de déterminer la capacité d'auto-renouvellement des CSM est en grande partie due au fait des différentes méthodes employées pour les isolées et des différentes approches utilisées pour évaluer ce potentiel (Baksh *et al* 2004).

2.2.2. Capacité de différenciation *in vitro* des CSM

Les cellules souches mésenchymateuses ont pendant longtemps été qualifiées de cellules souches multipotentes. En effet, comme on pensait que leurs progéniteurs ne se différenciaient qu'en tissus mésodermiques. Les CSM n'étaient associées qu'à la mésengénèse qui est la formation des différents tissus mésenchymateux ayant pour origine le feuillet embryonnaire mésodermique, incluant l'os, le cartilage, le muscle lisse, les ligaments, les tendons, le tissu adipeux et stromal (Pittenger *et al* 1999).

Les cellules souches mésenchymateuses adultes sont aussi capables dans des conditions environnementales particulières de se différencier en une grande variété de types cellulaires tels que, les cardiomyocytes (Orlic *et al.* 2001; Toma *et al.* 2002), les fibroblastes (Dicker *et al.* 2005), les myofibroblastes (Buckwalter *et al* 1998; Dicker *et al.* 2005), les péricytes (Direkze *et al.* 2003), les myocytes squelettiques, (Pittenger *et al.* 2002), les cellules rétinienne (Tomita *et al.* 2002), les cellules neuronales (Long *et al.* 2005), les astrocytes (Wislet-Gendebien *et al.* 2005), les hépatocytes et les cellules pancréatiques (Chen *et al.* 2004).

De nombreuses études *in vitro* ont été menées dans le but d'évaluer le potentiel de différenciation des CSM, aussi bien pour élaborer des conditions de culture, déterminer les stimuli à l'origine des diverses voies de différenciation et mettre au point les méthodes

d'identification de chaque type cellulaire différencié. Le Tableau II fournit un résumé des stimuli de différenciations des CSM (Minguell et al. 2001). Il est scindé en deux parties : Tableau IIa correspondant aux premières voies de différenciations décrites et reproduites par de nombreuses équipes et le Tableau IIb correspondant aux différenciations des CSM plus récemment réalisées faisant notamment appel à la présence d'agents déméthylants pouvant potentiellement reprogrammer les cellules *in vitro*.

Tableau II : Potentiel de différenciation *in vitro* des CSM isolées à partir de MO, stimuli moléculaires et marqueurs cellulaires

Tableau IIa

Différenciation cellulaire	Stimuli	Identification des marqueurs phénotypique	
		Moléculaires	Cellulaires
Adipocytes	- Dexamethasone + Isobutylmethylxanthine (Nuttall <i>et al.</i> 1997)- Dexamethasone + Isobutylmethylxanthine + indométhacine + Insuline (Pittenger <i>et al.</i> 1999; Conget <i>et al.</i> 2000) - Dexamethasone + Insuline (Muraglia <i>et al.</i> 2000)	PPAR γ 2, C/EBP β , aP2, Adipsine - Leptine, Lipoprotéine Lipase, (Tontonoz <i>et al.</i> 1994; Pittenger <i>et al.</i> 1999; Gori <i>et al.</i> 1999)	Accumulation cytoplasmique de vésicules lipidiques, (Owen <i>et al.</i> 1988)
Chondrocytes	-TGF β -3 + Acide ascorbique (Pittenger <i>et al.</i> 1999)- TGF β -1 + Acide ascorbique (Muraglia <i>et al.</i> 2000), (Lisignoli G <i>et al.</i> 2005)	Cbfa-1, Collagène de type II et IX, Aggrecane ; Lisignoli <i>et al.</i> 2005)- Enrichissement de la matrice en protéoglycane et collagène de type II et IX (Pittenger <i>et al.</i> 1999; Muraglia <i>et al.</i> 2000)
Osteoblastes	- Dexamethasone +b-glycerophosphate + acide ascorbique (Mbalaviele <i>et al.</i> 1999)	- Cbfa-1, MO/ Foie/ Rein, alkaline Phosphatase, Sialoprotéine de l'os, Osteopontine -Osteocalcine - Collagène de type I (Bruder <i>et al.</i> 1997; Gori <i>et al.</i> 1999; Pittenger <i>et al.</i> 1999)	- Formation de matrice minéralisée (Friedenstein <i>et al.</i> 1976)
Support stromal hématopoïétique	- Hydrocortisone + sérum de cheval (Majumdar <i>et al.</i> 1998)- co-culture avec Cellules souches hématopoïétiques (Guo <i>et al.</i> 2000)	Non défini	-Maintient et support de la différenciation des cellules CD 34+ (Majumdar <i>et al.</i> 1998)- Support de l'ostéoclastogénèse - Support de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombocytopoïèse (Cheng <i>et al.</i> 2000)

Tableau IIb

Cellules musculaires lisses	- PDGF-BB (Kinner <i>et al.</i> 2002)	α -SMA, Metavinculine, Calponine, h-Caldesmone, (Galmiche <i>et al.</i> 1993; Kinner <i>et al.</i> 2002; Hegner <i>et al.</i> 2005)	Non défini
Cellules musculaires squelettiques	-5-Azacytidine +Amphotéricine (Wakitani <i>et al.</i> 1995; Xu <i>et al.</i> 2004)	-MyoD, Myf 5 et 6, MEF-2, Myogénine, MRF4 - Myosine (Xu <i>et al.</i> 2004)Dominov JA 1998 pmid 9679156)	Cellules contractiles multinucléées, (Xu <i>et al.</i> 2004)
Tenocytes	- BMP-12 (Lou <i>et al.</i> 1999)	- Collagène de type II -Protéoglycanes (Young <i>et al.</i> 1998) - Glycosaminoglycane (Propriétés de Biomécanique (Young <i>et al.</i> 1998)
Cellules musculaires cardiaques	-b-FGF - 5'azacytidine (Fukuda <i>et al.</i> 2002)	- GATA 4 et 6, Troponine cardiaque I et C, actine sarcomérique, ANP, Myosine(Fukuda <i>et al.</i> 2002) Makino <i>et al.</i> 1999) beta MHC, desmine -Troponine cardiaque T, (Xu <i>et al.</i> 2004)	Non défini
Astrocytes	DMSO + dexaméthasone (Long <i>et al.</i> 2005)	- GFAP, Filament intermédiaires (Long <i>et al.</i> 2005)	Intégration dans le cerveau
Oligodendrocytes et neurones	PDGF, b-FGF, BDNF, Acide linoléique (Long <i>et al.</i> 2005)	- Nestine, bêta tubuline III, NF, Neu N, Tau, Nurr 1, GABA, GALC (Long <i>et al.</i> 2005)	Intégration dans le cerveau

2.3. Caractérisation des CSM de la moelle osseuse

2.3.1. Phénotype des CSM

Les CSM présentent de nombreux antigènes mais la plupart des marqueurs de surface sont peu spécifiques et peuvent être retrouvés à la surface de cellules différenciées. Ces antigènes pourraient seulement être présents sur une cellule souche à un instant particulier ou dans certaines conditions, ce qui est le cas du CD34 sur les CSH (Engelhardt *et al.* 2002). Des analyses par FACS ont permis de déterminer les molécules de surfaces présentes dans les populations de cellules cultivées. Les différents marqueurs de surface des cellules souches mésenchymateuses humaines actuellement connus sont regroupés dans le Tableau III.

Les CSM expriment SH2 (endogline, CD105), SH3 (5' terminal nucleotidase, CD73), Thy-1 (CD90), HLA de classe I et α -Smooth Muscle Actin (α -SMA). Les CSM ont une faible immunogénicité, elles n'expriment pas le HLA de classe II. Cependant, l'expression des molécules du CMH de classe II est inductible, en particulier par l'interféron gamma (Le Blanc *et al.* 2003). Les CSM n'expriment pas CD40 et CD40 ligand (CD154, fas ligand) ni les molécules de costimulation B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (Pittenger *et al.* 2004).

Les premières caractérisations des marqueurs de surface des CSM par cytométrie de flux ont révélé qu'elles expriment des molécules de surface dont les ligands sont présents sur les cellules matures des lignées hématopoïétiques, incluant, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, CD72, LFA-3, CD72 et ALCAM (Majumdar *et al.* 2003). Ceci souligne l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires. Les CSM ne possèdent pas à leur surface les marqueurs hématopoïétiques CD3, CD4, CD11a, CD34 et CD45 (Pittenger *et al.* 2004). Cette propriété permet de distinguer aisément les deux populations à partir d'un échantillon de MO. Les CSM expriment de nombreuses intégrines qui ont un rôle important dans la mobilité cellulaire. La liste des marqueurs de surface des CSM est longue. Les principales protéines étudiées au cours de la caractérisation des CSM sont illustrées dans le Tableau III, mais la liste reste incomplète.

Tableau III : les marqueurs de surface des CSM d'après Pitternnger and Martin Circulation Research 2004.

Les marqueurs de surfaces de CSM	
Marqueurs présents à la surface des CSM humaines	CD13, CD29, CD44, CD49 (Integrines)a,b,c,e,f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD71, CD73 (SH3) , CD90 (Thy-1), CD102, CD105 (SH2) , CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIIR, HLA-A,B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7.
Marqueurs absents de la surface des CSM humaines	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1.

L'ensemble de ces marqueurs de surface a été étudié par FACS pour déterminer ceux qui sont présents à la surface des CSM. Les marqueurs de surface absents et présents sur les CSM sont listés.

2.3.2. Hétérogénéité des CSM : sous-populations de CSM humaines

Actuellement, seul l'antigène Stro-1, qui est présent sur les colonies fibroblastiques (CFU-F) des cellules de moelle osseuse humaine, a été décrit comme marqueur potentiel des précurseurs des sous-populations de CSM et de leur capacité physiologique (Gronthos *et al.* 1994; Dennis *et al.* 2002). La co-greffe de sous-populations de CSM humaines (STRO-1⁻ ou STRO-1⁺) avec des cellules hématopoïétiques CD34⁺ humaines dans le modèle murin NOD/SCID irradié a permis de montrer que la population de CSM STRO-1⁺ a une meilleure capacité d'implantation tissulaire que les CSM STRO-1⁻, et que la sous-population STRO-1⁻ a un meilleur impact sur la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques que les CSM STRO-1⁺ (Bensidhoum *et al.* 2004). Il apparaît également que l'expression de STRO-1 dépend de la maturité des CSM (Tondreau *et al.* 2004).

A partir des observations de différences morphologiques de CSM en culture, il a été mis en évidence par Colter *et al.*, qu'il existait deux sous-populations en culture au premier passage : des CSM matures (mCSM) ayant une morphologie de fibroblastes et d'autres

cellules plus rondes et plus petites appelées les cellules RS (Colter *et al.* 2000). Les proportions de cellules en phase G0/G1 sont différentes pour ces deux sous-populations, 99% pour les cellules RS et 90% pour les cellules mCSM. Ces deux populations de CSM ne possèdent pas les marqueurs CD34, CD45, CD3, CD19, CD33, HLA-DR et CD38 et expriment à leur surface CD90, CD105, C166, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD13. Cependant, l'expression de ces antigènes sur les cellules RS apparaît plus faible que sur les mCSM. Il semble que les CSM adultes représentent une population hétérogène de cellules ayant des morphologies distinctes et des taux différents d'expression d'antigènes de surface. Ces cellules RS semblent être les CSM les plus primitives avec un potentiel de différenciation et de prolifération plus important, leur suggérant un potentiel plus grand pour la prise de greffe à long terme et la différenciation *in vivo* (Colter et al 2001 ; Lee RH *et al* 2005). Bien que des différences puissent initialement exister en début de culture, la population de CSM devient très homogène avec le temps. Elle le reste après un grand nombre de passages.

Des éventuelles sous-populations de CSM restent encore à être bien identifiées et il est actuellement impossible d'attribuer une fonction biologique précise à une des sous-populations.

2.3.3. Les CSM sont des réservoirs de cytokines

L'étude du transcriptome des CSM a montré que ces cellules expriment les ARNm de plusieurs cytokines telles que les interleukines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15), le monocyte-colony stimulating factor (M-CSF), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), le Flt-3 Ligand (Fms-like Tyrosine kinase 3), le stem cell factor (SCF), le Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et le Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF). En revanche l'étude des ARNm des CSM a révélé que ces cellules n'exprimaient pas les ARNm correspondant à l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, et l'IL-13 (Kim *et al.* 2005). Les interleukines IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11 et IL-12 sont décrites pour avoir un effet pro-inflammatoire. Le Tableau

IV illustre la présence des ARNm des cytokines et des facteurs de croissance qui ont été déterminés par l'analyse du transcriptome des CSM en culture.

Tableau IV : Les différents ARNm des cytokines et récepteurs des CSM d'après Dong Hyun Kim 2005

Production de cytokines et de facteurs de croissance	Il 1α, Il 6, Il 7, Il 8, Il 11, Il12, Il 14, Il 15, Flt 3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, SCF
Récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance	Il 1R, Il 3 R, Il 4R, Il 6R, Il 7R, LIF R, SCF R, G-CSF R, INF γ R, TNF I R, TNF II R, TGF β I R, TGF β II R, b FGF R, PDGF R, EGF R

La présence des ARNm des cytokines et facteurs de croissance ont été déterminés par l'analyse du transcriptome des CSM en culture. Les cytokines et facteurs de croissance ainsi que les récepteurs sont listés

Les CSM possèdent de nombreux ARN messagers de cytokines et de facteurs de croissance qui pourraient se lier à la matrice extracellulaire et participer à la formation d'un microenvironnement adéquat à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Il a été montré que les CSM participent à la prolifération et à la différenciation des cellules hématopoïétiques (Majumdar *et al.* 1998; Minguell *et al.* 2000).

2.3.4. La télomérase est inactive dans les CSM isolées de MO

L'activité télomérase et le maintien des télomères peuvent être associés à l'immortalité de certaines tumeurs et à la division des cellules souches embryonnaires (CSE) (Thomson *et al.* 1998; Wai *et al.* 2004). La plupart des cellules normales somatiques ne possède pas d'activité de la télomérase. Elles sont dites « télomérase négative ». Une faible activité de cette enzyme a été retrouvée dans des cellules souches adultes de la peau et de l'intestin. En revanche *in vitro*, l'activation de la télomérase n'a pas été détectée dans les cellules stromales de la moelle osseuse, au cours de leur expansion il y a bien une diminution de la longueur des télomères (Banfi *et al.* 2002). Mais une expansion à long terme des CSM de MO

peut entraîner une immortalisation spontanée de celles-ci. Il a été récemment mis en évidence que les CSM pouvaient se transformer en cellules cancéreuses *in vivo* (Rubio *et al* 2005 ; Miura *et al* 2005). Un temps court de culture des CSM semble donc nécessaire pour obtenir des cellules transplantables sans avoir le souci d'implanter un greffon potentiellement tumorigène. Cependant, le devenir de l'activité de la télomérase des cellules du greffon dans l'organisme reste à définir.

3. Fonctionnalité des cellules souches mésenchymateuses

3.1. Fonctionnalité *in vitro* des CSM

3.1.1. CSM et soutien de l'hématopoïèse

L'implication des CSM dans le soutien de l'hématopoïèse est connue depuis longtemps et est couramment utilisée en laboratoire, dans des modèles *in vitro* de culture à long terme pour la détection fonctionnelle de cellules hématopoïétiques primitives telles que les LTC-IC (*long term culture initiating cells*) où la présence de cellules stromales est nécessaire (Sutherland *et al.* 1991). On appelle couramment « cellules stromales », les cellules du microenvironnement d'origine non hématopoïétiques c'est-à-dire les myofibroblastes, les adipocytes et les cellules endothéliales. En culture à long terme, les cellules stromales participent à la formation d'un environnement par sécrétions de cytokines et de facteurs extracellulaires où les cellules hématopoïétiques immatures survivent, prolifèrent et se différencient sur plusieurs semaines (Bennaceur-Griscelli *et al.* 2001, Majumdar *et al* 2003) Les CSM ont un effet sur les cellules hématopoïétiques primitives, notamment sur le processus anti-apoptotique et l'induction de la prolifération (Mourcin *et al* 2005). *In vitro* les colonies de culture primaire de CSM humaines sont souvent associées à des colonies hématopoïétiques contenant des mégacaryocytes et ce, en absence de sérum et de cytokines, suggérant que les CSM peuvent également avoir une action sur la différenciation mégacaryocytaire. De plus, les CSM humaines expriment un ARN messenger pour la thrombopoïétine impliquée dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse (Cheng *et al.* 2000). *In vitro*, les cellules CD34+ cultivées en présence de cellules stromales peuvent

s'engager vers la voie érythroïde jusqu'au stade terminal de cellules énucléées (Douay *et al.* 2005). Le Stroma médullaire a un rôle majeur dans le soutien de l'hématopoïèse.

3.1.2. Effet immunomodulateur des CSM

Les CSM médullaires humaines ont une action dose-dépendante suppressive sur la prolifération des lymphocytes T induite par des cellules dendritiques (suppression de 65% sur les CD4⁺ et de 75% sur les CD8⁺). Ce phénomène pourrait être en partie lié à des facteurs solubles, le TGFβ1 et l'*hepatocyte growth factor* (HGF) produits par les CSM (Di Nicola *et al.* 2002). L'effet immunosuppresseur des CSM impliquerait l'IL2 et l'IL10 et ce processus différerait suivant le type de stimulus des cellules T (Rasmusson *et al.* 2005). Une étude récente a montré qu'en présence de CSM les premiers marqueurs d'activation CD25 et CD69 ne sont pas modifiés et que l'IFN-γ est sécrété. L'analyse du cycle cellulaire a montré que les cellules T sont arrêtées en phase G1 en présence de CSM (Glennie *et al.* 2005).

3.2. Greffe de CSM dans des modèles animaux et essais cliniques

3.2.1. CSM et soutien de l'hématopoïèse *in vivo*

3.2.1.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux

Le modèle de transplantation *in utero* chez le mouton a permis de montrer que les cellules stromales de la moelle osseuse sont à la fois transplantables et que leur co-administration avec des CSH augmente le taux de chimérisme hématopoïétique (Almeida-Porada *et al.* 1999). Chez des souris NOD/SCID, la co-transplantation de CSM humaines avec des progéniteurs humains CD34⁺ s'est traduite par une augmentation du nombre de CFU-GM et de CFU-MK (Angelopoulou *et al.* 2003). En revanche, le nombre de cellules CD34⁺ médullaires n'a pas varié. Sur le même modèle murin, le nombre de cellules hématopoïétiques issues du donneur est multiplié par 3 à 4 fois si les cellules CD34⁺ sont administrées en même temps que des CSM. L'amplification est d'autant plus élevée que le

nombre de progéniteurs CD34⁺ administrés est faible (Noort *et al.* 2002). Une co-greffe de cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques après irradiation corps entier d'une cohorte de 9 primates non humains a permis de montrer que les CSM se localisent dans les organes impliqués dans le syndrome-multi-organe comme la moelle osseuse et le tractus digestif (Chapel *et al.* 2003). Plus précisément, il semble que ce soit la sous-population de CSM Stro-1⁻ qui soit préférentiellement utilisée par l'organisme pour le soutien de l'hématopoïèse dans le modèle murin NOD/SCID (Bensidhoum *et al.* 2004). L'ensemble de ces résultats démontre le rôle essentiel de soutien *in vivo* des CSM dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques

3.2.1.2. Essais cliniques

Sur la base de ces considérations et notamment sur les résultats obtenus chez l'animal, quelques protocoles cliniques de greffes de CSM ont vu le jour, visant à exploiter les propriétés de soutien hématopoïétique des CSM ainsi que leurs propriétés de plasticité et de transdifférenciation.

Les premières études cliniques ont mis en évidence l'absence de toxicité liée à l'injection de CSM. Un essai pilote a été conçu pour tester la tolérance de greffes de quantité croissante de CSM. Quinze patients en rémission complète de pathologies malignes hématologiques, dont 12 avaient eu une autogreffe de CSH, ont reçu des CSM autologues préalablement amplifiées. Trois groupes de 5 patients ont reçu respectivement 1×10^6 , 10×10^6 et 50×10^6 CSM totales. Aucun effet secondaire n'a été noté (Koc *et al.* 2000). De plus il a été montré que l'injection des CSM haploidentiques n'induisait pas d'effet toxique pour les receveurs (Le Blanc *et al.* 2004).

Un essai clinique sur 32 patientes atteintes du cancer ayant suivi une chimiothérapie à haute dose et recevant une co-greffe autologue de CSM combinées avec des CSH du sang périphérique a permis de démontrer la contribution des CSM sur l'accélération de la reprise hématopoïétique chez l'homme après atteinte médullaire radio-induite (Koc *et al.* 2000). L'équipe du professeur Gorin a montré qu'il y a eu une prise de greffe des CSM dans

la moelle osseuse d'une patiente atteinte d'aplasie sévère. Ils sont parvenus à démontrer que les CSM greffées amélioraient qualitativement et quantitativement le microenvironnement médullaire. Le microenvironnement jouant un rôle primordial dans l'hématopoïèse, on peut attribuer aux CSM un rôle dans le soutien hématopoïétique chez l'homme (Fouillard 2003). Cette étude suggère l'idée que la greffe de CSM puisse être utilisée dans le futur pour stimuler la reprise de l'hématopoïèse après des lésions entraînant une aplasie médullaire et notamment après chimiothérapie, radiothérapie ou plus rarement dans le cas des irradiations sévères accidentelles.

3.2.2. Effet immunomodulateur des CSM *in vivo*

3.2.2.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux

L'induction par les CSM de la tolérance immunologique de l'hôte lors de greffe de peau a été suggérée dans un modèle de babouins. La durée de prise du greffon a été prolongée en présence de CSM. Cet effet a été observé quelque soit l'origine des CSM, identique au greffon de peau ou provenant d'un tiers. Ces observations montrent que l'effet immunosuppresseur obtenu avec les CSM ne dépend pas de la dose de CSM administrée. (Bartholomew *et al.* 2001).

3.2.2.2. Essais cliniques

La capacité des CSM à intervenir sur la réponse immunitaire en supprimant la prolifération des lymphocytes T allogéniques est actuellement, en thérapie cellulaire, une des voies de recherche ayant pour objectif d'assurer un contrôle des réactions du greffon contre l'hôte et non d'inhiber la croissance tumorale. De par leurs propriétés immunosuppressives, il semble que les CSM pourraient avoir un impact sur la fréquence de survenue et l'intensité des réactions de greffon contre l'hôte (*Graft versus Host Disease* ou GvHD). La GvHD est une complication majeure de la greffe de MO allogénique, qui entraîne de 15 à 50 % de mortalité. L'équipe de Lazarus a montré dans une étude clinique sur 30 patients atteints

de pathologies hématologiques malignes, que l'association d'une greffe de CSM et d'une greffe de CSH allogéniques entraîne une diminution en nombre et en intensité des réactions de GVHD aiguë et une accélération de la reconstitution hématopoïétique (Koc *et al.* 2001).

En 2004, Le Blanc *et al.* ont montré la rémission définitive d'un patient atteint d'une GVHD de grade 4 après deux injections de CSM (Le Blanc *et al.* 2004). Les résultats d'une co-greffe de CSM et de CSH chez des patients atteints de tumeurs malignes hématopoïétiques ont mis en évidence une progression de la survie de 2 ans chez 53 % des patients (Lazarus *et al.* 2005). La dose de CSM greffées ainsi que la fréquence d'administration optimale sont encore à établir.

3.2.3. CSM et la réparation tissulaire *in vivo*

3.2.3.1. Greffe de CSM dans des modèles animaux

De nombreux travaux *in vivo* ont été réalisés localement par injection directe dans l'organe étudié. Des CSM murines ont été injectées dans le ventricule latéral du cerveau de souris nouveau-nés et retrouvées histologiquement dans différentes régions du cerveau comme l'hippocampe, le cervelet et les bulbes olfactifs. Ces cellules implantées expriment des protéines spécifiques des astrocytes matures comme la GFAP (glial fibrillary acidic protein) ou des protéines spécifiques des neurones comme les neurofilaments, suivant leur localisation. Ces résultats donnent aux cellules souches mésenchymateuses un potentiel de vecteur cellulaire utilisable dans les pathologies neurodégénératives (Kopen *et al.* 1999). Sur le cerveau, de nombreux travaux ont été réalisés après une ischémie locale (Zhao *et al.* 2002). Une semaine après ischémie, une xénogreffe de CSM a été réalisée dans le cortex autour de la zone altérée. De deux à six semaines après injection, les fonctions sensorimotrices ont été évaluées. Les rats greffés montrent une amélioration significative de l'exécution des tests fonctionnels. L'analyse histologique des cerveaux a

révéle que les CSM implantées expriment des marqueurs astrocytaires (GFAP), oligodendritiques (Galc) et de neurones (Beta-II, NF 160, NF 200, hNSE, hNF70) mais ont une morphologie sphérique évoquant une absence de différenciation cellulaire. Il semble peu probable que le rétablissement fonctionnel observé chez ces rats après greffe soit dû à l'intégration de nouvelles cellules neuronales mais soit plutôt provoqué par des facteurs sécrétés par ces CSM implantées qui stimuleraient la réparation des tissus nerveux. Ces résultats suggèrent pour les CSM un rôle trophique ou cytoprotecteur stimulant les progéniteurs préexistants (Zhao *et al.* 2002). Très récemment des CSM génétiquement modifiées par transfection du gène de la tyrosine hydroxylase, dans l'objectif d'augmenter le taux de dopamine, ont été greffées dans le striatum de rats parkinsoniens. Six semaines après transplantation, le taux de dopamine a significativement augmenté dans cette région (Lu *et al.* 2005). Ces données suggèrent une nouvelle utilisation des CSM pour lutter contre la progression de certaines pathologies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson.

Les CSM semblent participer également à la régénération osseuse et à la réparation du tissu cartilagineux. Le protocole clinique d'une transplantation directe dans le tissu osseux devrait voir prochainement le jour. (Noel *et al* 2002 ; Ikehara *et al* 2005).

Dès 1998, des implants de CSM ont été posés sur des tendons d'Achille défectueux de lapin, et leur restructuration s'est révélée complète 12 semaines après, suggérant la participation des CSM à la régénération des tendons (Young *et al.* 1998). De nombreuses équipes travaillent actuellement sur la modélisation et la fabrication d'une matrice non toxique et biodégradable. Des expériences récentes menées sur le rat ont montré que les CSM incorporées dans une matrice de fibrine transplantée au niveau de la déchirure du ménisque, proliféraient et comblaient cette déchirure (Yamasaki *et al.* 2005). Un support permettant le soutien architectural pour la différenciation des CSM en chondrocytes au cours de la réparation de cartilage est en cours de développement (Uematsu *et al.* 2005). Il reste encore à ce jour à améliorer cette technique pour la lancer en protocole clinique.

Une greffe autologue locale de CSM dans une zone ischémisée du myocarde de porc a permis de montrer que ces cellules implantées exprimaient des protéines spécifiques du muscle. De plus, en présence de CSM, le dysfonctionnement lié à l'infarctus du myocarde était modéré par comparaison au contrôles non greffés avec reprise de la contractilité cardiaque (Shake *et al.* 2002). Ces résultats mettent en évidence la myocardioplasticité des CSM, suggérant leur potentiel clinique sur les pathologies associées à l'infarctus du myocarde. Ces pathologies cardiaques sont souvent à répétition et le tissu nouvellement régénéré est vulnérable. A cet effet il a été proposé de produire des CSM transfectées par le gène heme-oxygénase (h-HO1) augmentant la survie des cellules greffées. Ces travaux ont été effectués sur la souris balb/c lors d'ischémies cardiaques répétées montrant que ces CSM transfectées implantées possèdent bien un phénotype myogénique. Elles améliorent la fonction systolique et ont une durée de vie prolongée en comparaison aux CSM contrôles (Tang *et al.* 2005). Les CSM pourraient être impliquées dans la néovascularisation en induisant la génération de cellules endothéliales. La sécrétion par les CSM de facteurs de croissance tels que VEGF et b-FGF qui pourraient induire d'une façon paracrine la différenciation des progéniteurs préexistants des cellules endothéliales et en autocrine, la différenciation des CSM en cellules myogéniques ou endothéliales (Kinnaird *et al.* 2004). La greffe de CSM représente une stratégie prometteuse pour la néovascularisation des organes ischémisés et leur implication dans le remodelage des vaisseaux. La greffe autologue de CSM ne se limite pas uniquement aux infarctus du myocarde mais à toutes les pathologies associées à des ischémies tissulaires, qui à plus ou moins long terme, provoquent des occlusions vasculaires ou des fibroses invalidantes, pouvant conduire au décès des patients. L'effet anti-fibrotique des CSM a été consolidé par les observations d'une diminution de l'indice de mortalité et de fibrose du foie sur un modèle de rat développant des fibroses hépatiques (Zhao *et al.* 2005). Les mécanismes anti-fibrotiques associés à la greffe de CSM restent encore à élucider. Des expériences menées dans un modèle murin sur des atteintes pulmonaires induites par la bléomycine ont renforcé ce concept d'effet protecteur d'une injection de CSM sur la formation de la fibrose. Il a été également montré que les CSM implantées dans le poumon acquièrent un

phénotype proche de celui des cellules de l'organe. La protection du poumon contre une fibrose impliquait une suppression du processus inflammatoire et le déclenchement des processus de réparation tissulaire par sécrétion de facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) (Rojas *et al.* 2005). Les CSM modèreraient le développement de fibrose par un pouvoir anti-inflammatoire et une aptitude à déclencher le mécanisme de réparation tissulaire. Ces mécanismes moléculaires sont encore à clarifier avant de pouvoir utiliser les CSM dans le traitement de la fibrose.

In-vitro Chen *et al.* ont différencié des CSM en îlot de langherans qu'ils ont transplanté chez des rats diabétiques diminuant le taux de glucose plasmatique (Chen *et al.* 2004). Ces travaux sont encourageants mais doivent être approfondis dans la perspective d'un possible traitement du diabète, maladie qui touche plus de 150 millions de personnes dans le monde. Sur le même principe de greffe de CSM différenciées *in vitro*, des CSM ont été prédifférenciées en adipocytes et encapsulées dans un système d'hydrogel biocompatible ayant une forme prédéfinie aux dimensions utilisables après des actes de chirurgie plastique pour la reconstruction tissulaire (Alhadlaq *et al.* 2005).

Ces nombreux travaux expérimentaux cités ci-dessus suggèrent que les CSM ont un potentiel thérapeutique important en tant que vecteur cellulaire protéique stimulant la néovascularisation, mais aussi en modulant leur phénotype en fonction de leur microenvironnement, limitant ainsi les altérations tissulaires suite à diverses ischémies. Les CSM ont également le pouvoir de stimuler la réparation tissulaire et possèdent une aptitude à diminuer le processus inflammatoire, leur donnant une capacité de contrer le développement de la fibrose. Les CSM représentent à l'heure actuelle une population de cellules souches particulièrement séduisante pour les recherches en thérapie cellulaire. Expérimentalement, la compréhension des mécanismes impliqués dans la restauration tissulaire (migration, différenciation et contrôle de l'inflammation) restent encore à élucider.

3.2.3.2. *Essais cliniques*

Les premiers travaux dans ce domaine sont ceux de l'équipe d'Horwitz EM qui a publié les améliorations entraînées par une greffe allogénique de CSM isolées de la MO chez des jeunes sujets atteints d'ostéogénèse imperfecta. Cette pathologie se caractérise par des problèmes osseux (retard de croissance, fractures multiples et prise de poids anormale) dûs à un défaut de production de collagène de type I par les ostéoblastes. Trois mois après la prise de greffe, les jeunes sujets reprenaient du poids avec une amélioration de la croissance, une densification osseuse et une diminution du nombre de fractures (Horwitz *et al.* 1999). Ces premiers résultats suggèrent que la greffe de CSM est une bonne stratégie thérapeutique pour cette maladie et éventuellement pour d'autres pathologies osseuses.

Un protocole clinique d'allogreffe de CSM chez des patients atteints du syndrome de Hurler et chez des patients atteints de la leukodystrophie métachromatique a été lancé. Ces sujets présentent un syndrome de dégénérescence osseuse et neurologique. Les manifestations cliniques n'ont été que partiellement corrigées lors de travaux antérieurs impliquant une greffe de CSH. Une greffe de CSM de 2 à 10 à 10⁶/kg a été réalisée chez 5 patients atteints du syndrome d'Hurler et chez 6 patients atteints de leukodystrophie métachromatique qui avaient préalablement reçu une greffe de moelle osseuse de frère ou sœur HLA compatible. Vingt quatre mois après la greffe, aucune toxicité n'a été relevée. Sur 4 patients atteints du syndrome d'Hurler il a été observé une amélioration significative de la conduction neuronale. La densité minérale osseuse est maintenue ou légèrement augmentée chez tous les patients. Aucun changement apparent de l'état général des patients, ni dans leur comportement, ni dans leur développement mental et physique n'a été observé (Koc *et al.* 2002).

4. Réponse biologique des tissus irradiés

4.1. Réponse aux dommages à l'ADN

Les rayonnements ionisants peuvent interagir directement avec l'ADN ou indirectement par production de radicaux libres en conséquence de la radiolyse de l'eau par production de radicaux libres tel que le radical hydroxyde (OH), des anions tels que le O^{2-} et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui vont par la suite agir sur l'ADN (Moulder *et al* 2002). La NADPH+ oxydase, le cytochrome P450 dans la membrane plasmique et le réticulum, ainsi que des transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale amplifient ces radicaux dans les compartiments cellulaires. Ces systèmes permettent aussi de produire d'autres radicaux tels que les radicaux azotés, dont le NO (Schmidt *et al.* 1985).

Les cellules de mammifères peuvent répondre aux dommages de l'ADN radio-induits par activation immédiate de deux grandes fonctions cellulaires : la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Rich *et al.* 2000). L'ADN lésé peut être réparé. Si la réparation s'avère fidèle, il n'y a pas de conséquence ultérieure. Lorsque l'ADN n'est pas réparé correctement, la mutation peut être létale (entraînant la mort cellulaire) ou non létale. Dans ce dernier cas, si la cellule mutée n'est pas éliminée par le système immunitaire, elle peut être à l'origine de cancers pour l'individu ou d'anomalies héréditaires pour sa descendance. Les effets de l'irradiation sur l'ADN peuvent avoir des conséquences rapides (quelques heures pour les aplasies tissulaires) ou à long terme (plusieurs années pour les tumeurs) (Tubiana *et al.* 1986). La Figure 4 illustre la cinétique d'apparition des dommages radio-induits.

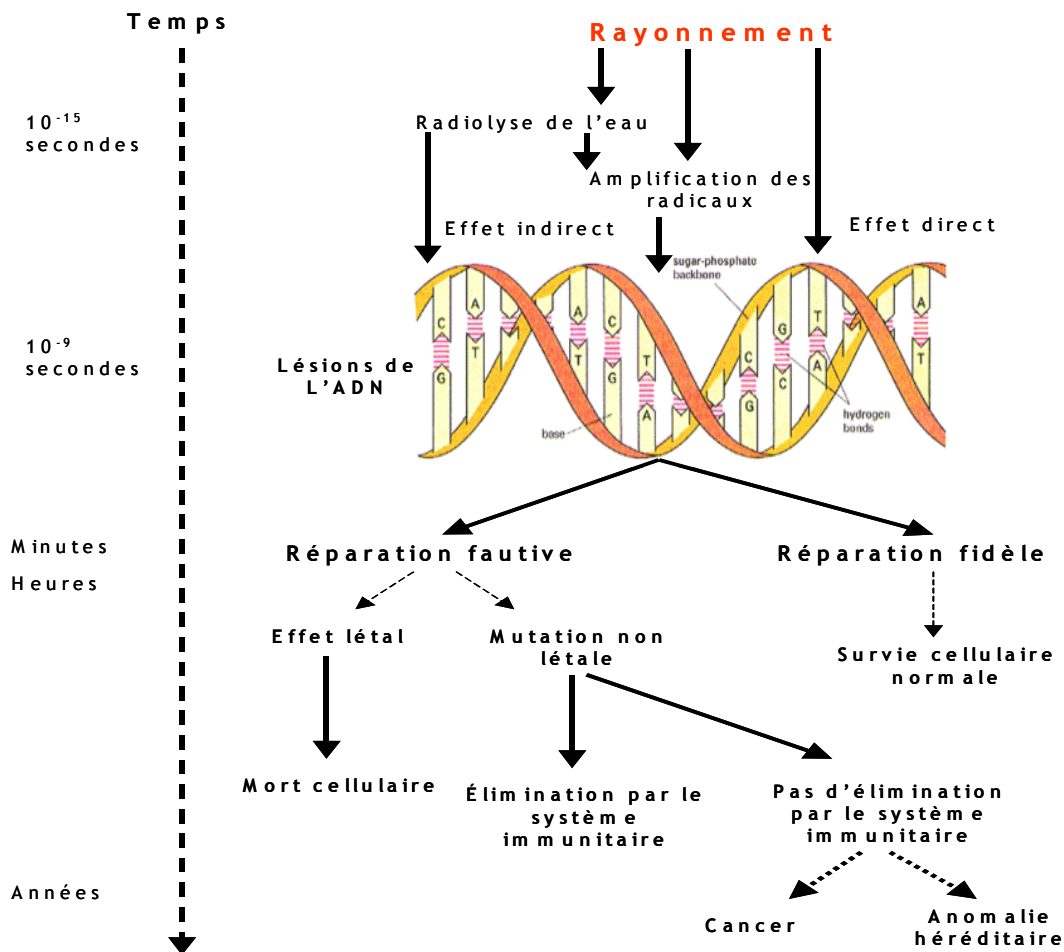


Figure 4: Cinétique des dommages radio-induits D'après Tubiana M et al 1986 et Schmidt-Ullrich et al 2000

4.2. Irradiation de tissu sain

4.2.1. De la mort cellulaire à la déplétion tissulaire radio-induite

La mort différée, c'est-à-dire la perte de la capacité de prolifération, survient au moment de l'une des premières divisions cellulaires après une irradiation de quelques Grays. Avant de mourir, la plupart des cellules irradiées lésées peuvent encore se diviser un petit nombre de fois. L'irradiation a relativement peu de conséquences si la dose n'est pas trop

élevée. Ces cellules différenciées irradiées pourront effectuer encore quelques mitoses. Cette même dose éliminera les cellules souches (et par voie de conséquence leur descendance) dont le programme prévoit un grand nombre de division. Les cellules en voie de différenciation apparaissent beaucoup moins radiosensibles que les cellules souches. Un tissu apparaît d'autant plus radiosensible que les cellules qui le composent sont peu différenciées, ont un potentiel de prolifération plus grand et se divisent plus vite. Dans un tissu où les cellules ne se divisent que rarement, les lésions cellulaires peuvent rester longtemps latentes et ne se révéler que tardivement. Dans les tissus à renouvellement rapide, l'aplasie se manifeste rapidement après irradiation (Bergonie *et al.* 2003).

L'évolution du nombre de cellules présentes dans le tissu dépend de plusieurs facteurs, notamment de la proportion de cellules capables de se diviser, de la vitesse de prolifération de ces cellules et du degré d'apoptose. *In vitro*, les cellules restées viables se multiplient moins rapidement que les cellules non irradiées. Cette altération de la capacité de division des cellules de mammifères augmente avec la dose d'irradiation et se manifeste par la diminution du nombre et de la taille des colonies (Joshi *et al* 1982). *In vivo*, les phénomènes sont plus complexes en raison de la stimulation causée par les mécanismes d'homéostasie tissulaire. Néanmoins, la diminution du nombre de cellules viables et de la réponse aux stimuli provoquant la diminution de la prolifération des cellules viables entraînent une déplétion cellulaire. La Figure 5 illustre la déplétion tissulaire radio-induite. Le fractionnement d'une même dose totale en une série de séances réduit ces deux facteurs (Fowler *et al* 1984).

Si l'atteinte des compartiments souches de l'organisme est trop importante, l'organisme se voit dans l'incapacité d'utiliser son propre système de réparation et la perte de fonctionnalité est irréversible.

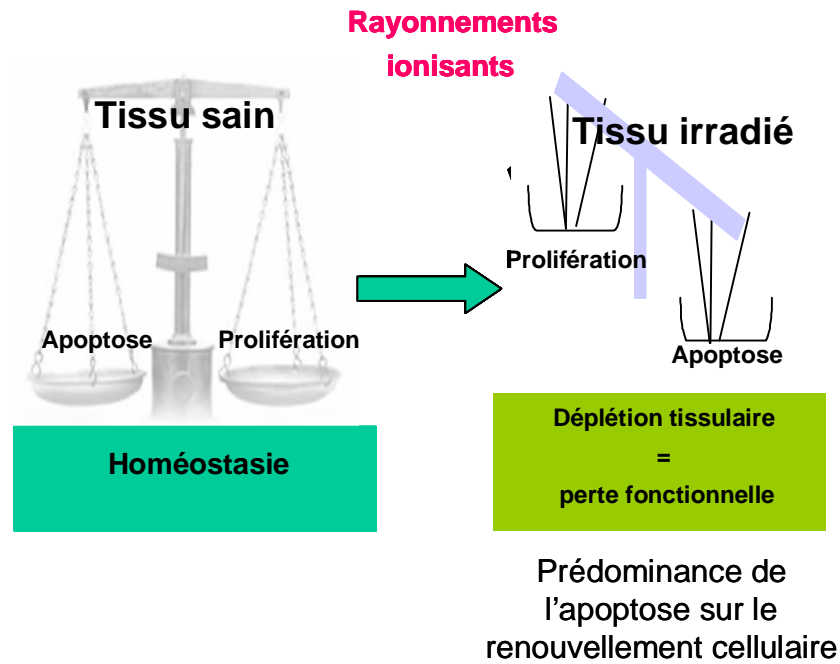


Figure 5 : Schéma du Déséquilibre homéostasique dû aux rayonnements ionisants

4.2.2. Les irradiations accidentelles sévères

4.2.2.1. Le syndrome d'irradiation aiguë (SIA)

Depuis 1945, 560 accidents ont été recensés dans le monde provoquant le décès de 180 personnes suite à un Syndrome Aigu d'Irradiation (SAI). Il est maintenant admis qu'une irradiation à des doses moyennes ou fortes peut entraîner une pathologie dite « mixte » impliquant les systèmes hématopoïétique, gastro-intestinal, neurovasculaire et cutané. Chacun de ces systèmes joue un rôle majeur dans le SAI. L'expression de ce SAI débute quelques heures après l'exposition et peut se poursuivre jusqu'à plusieurs semaines après l'irradiation en fonction de la dose reçue (Anno *et al.* 1989). La mise en place d'un continuum d'effets radio-induits peut aboutir à la défaillance progressive de différents organes se traduisant à terme par un syndrome de défaillance multi-viscérale (SDMV), traduction des termes anglo-saxons « multiple organ dysfunction syndrome/failure » (MODS/MOF). Les interactions entre les différents organes ont déjà été observées avec d'autres types d'agressions sévères : c'est ainsi que des dysfonctionnements gastro-intestinaux et pulmonaires ont été mis en cause dans les conséquences de brûlures thermiques, de chocs hémorragiques (Messick *et al.* 1994; Kuebler *et al.* 2003) et dans des

situations cliniques consécutives à divers traumatismes (mécaniques, chimiques, infectieux...) ou suite à un état de choc (Deitch *et al* 2001). Il semble que l'une des causes essentielles du SMDV réside dans le développement d'une hyper-inflammation systémique pouvant devenir néfaste si celle-ci n'est pas contrôlée. Cette hyper-inflammation peut être suivie dans le temps par une réponse anti-inflammatoire compensatrice de l'organisme visant à contrôler cette inflammation, mais pouvant provoquer une immuno-suppression sévère associée à un risque important d'infection tardive. Si le retour à l'homéostasie ne peut se faire, la survie de l'individu irradié apparaît compromise (Monti *et al.* 2005). La physiopathologie de l'irradiation a longtemps été considérée comme une succession de défaillances d'un organe vital (moelle osseuse, intestin, système nerveux central) dont l'apparition et la gravité dépendent de la dose reçue. Depuis peu, le concept d'une mise en place progressive de dysfonctionnements de plusieurs organes s'est affirmé dans le domaine de la radiopathologie accidentelle avec, entre autre, le retour d'expériences des accidents de Neshvitzh ou Tokai-Mura (Hirama *et al.* 2003). Dans cette approche, l'issue fatale du SAI n'est plus causée par la défaillance d'un seul organe, dûe à la mort cellulaire, mais est la conséquence d'atteintes de plusieurs organes interdépendants incapables de maintenir leurs fonctions homéostatiques, et qui conduisent à terme à un syndrome de défaillance multi-organes. Cette physiopathologie impliquant la combinaison de diverses atteintes fait que le traitement d'une victime d'irradiation accidentelle à forte dose reste très délicat. En effet, si les approches thérapeutiques du syndrome hématopoïétique se montrent de plus en plus efficaces, celles visant d'autres organes cibles tels que le système digestif, la peau, les poumons ou le système nerveux central sont toujours peu convaincantes, et justifient ainsi la recherche de nouvelles voies thérapeutiques qui prennent en compte les lésions multi-viscérales. Le SIA se caractérise cliniquement par trois phases. La première phase, appelée prodrome, est caractérisée par des vomissements, des diarrhées, des nausées, et de l'anorexie. A cette phase précoce, succède une seconde phase dite latente pendant laquelle on observe une régression ou une disparition des symptômes. Sa durée est inversement proportionnelle à la dose reçue. Puis dans une troisième phase, les signes cliniques réapparaissent. On distingue trois grands

syndromes : syndrome hématopoïétique, gastro-intestinal et neurovasculaire mais d'autres traumatismes peuvent être observés comme les brûlures cutanées radio-induites ou les atteintes pulmonaires.

4.2.2.2. Le syndrome gastro-intestinal

L'intestin est l'un des organes les plus radiosensibles du fait du taux de renouvellement cellulaire particulièrement rapide de son épithélium (3 à 6 jours en moyenne). L'atteinte gastro-intestinale consécutive à une irradiation à forte dose joue un rôle important dans le pronostic vital de la personne irradiée (Monti *et al.* 2005).

Le syndrome gastro-intestinal est défini par la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale consécutive à la dénudation de l'épithélium intestinal (Gunter-Smith 1989). Ce phénomène s'exprime par des diarrhées et une invasion bactérienne dans la circulation sanguine. Les pertes hydro-minérales importantes ainsi que la septicémie peuvent mettre en jeu la survie de l'individu irradié (Griffiths *et al.* 2001). La Figure 6 illustre les atteintes radio-induites aboutissant au syndrome gastro-intestinal.

L'irradiation induit une perte de cohésion de la barrière intestinale et des perturbations de la capacité d'absorption. La diarrhée est caractérisée par une quantité d'eau supérieure à la normale dans la lumière intestinale pouvant être due à un dysfonctionnement de l'intestin grêle et / ou du côlon. Le côlon étant moins radiosensible que l'intestin grêle, il peut, dans certains cas, compenser le dysfonctionnement de l'intestin grêle grâce à sa grande capacité à réabsorber des quantités d'eau plus importantes que lors du fonctionnement normal. En revanche si cette capacité de réserve du côlon est dépassée, des diarrhées peuvent apparaître (Monti *et al.* 2005).

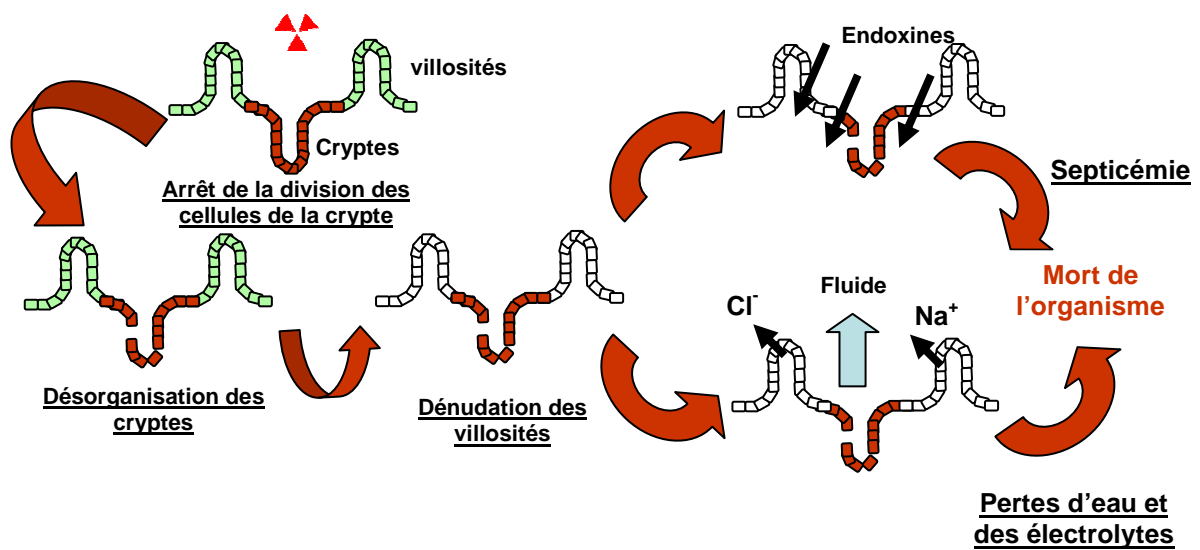


Figure 6 : le syndrome gastro intestinal - la mort intestinale d'après Griffiths NM. *Illustration du syndrome gastro-intestinal qui est défini par la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale consécutive à la dénudation de l'épithélium intestinal. Les pertes hydro-minérales importantes ainsi que la septicémie peuvent mettre en jeu la survie de l'individu irradié*

4.2.2.3. Le syndrome hématopoïétique

Le syndrome hématopoïétique apparaît également très rapidement du fait de la radiosensibilité de la moelle osseuse qui est le siège de l'hématopoïèse, un processus impliquant de nombreuses divisions cellulaires. L'aplasie médullaire radio induite a pour conséquence une chute des éléments figurés du sang qui est illustrée dans la Figure 7. Les lymphocytes sont les premiers à disparaître par apoptose, dès les premières quarante huit heures après irradiation. Par la suite, les neutrophiles, les plaquettes et les hématies disparaissent progressivement (Tubiana *et al.* 1963). Ceci entraîne des risques importants pour la victime, en particulier des risques infectieux liés à la chute des neutrophiles et des risques hémorragiques liés à la chute des plaquettes.

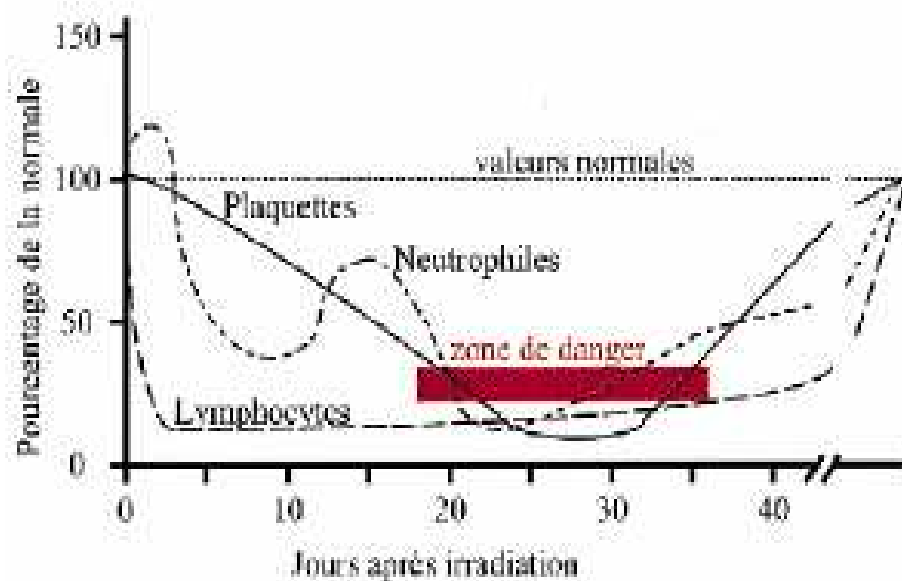


Figure 7 : Exemple d'aplasie radio-induite. D'après Bertho JM. Ces courbes sont extrapolées de situations d'irradiation accidentelle chez l'homme. La zone de danger (en rouge) représente la période pendant laquelle il existe des risques infectieux (chute des neutrophiles) et hémorragiques (chute des plaquettes)

Les rayonnements ionisants affectent l'hématopoïèse directement en provoquant une diminution du nombre des cellules les plus immatures. Bien que les cellules stromales matures soient relativement radiorésistantes, l'irradiation induit également des modifications du micro-environnement médullaire, agissant indirectement sur l'hématopoïèse (Laver *et al.* 1986; Yamazaki *et al.* 1991). Dans les quelques heures qui suivent une irradiation corporelle, une baisse brutale des progéniteurs hématopoïétiques est observée (Drouet *et al.* 2004). Il en résulte pour le compartiment médullaire un appauvrissement en cellules en cours de prolifération et de différenciation. L'arrêt de la production d'éléments figurés du sang (Dainiak *et al.* 2002) mène à une pancytopenie radio-induite dont la sévérité est liée à la profondeur de l'aplasie médullaire. La capacité de récupération hématopoïétique d'un sujet irradié sera donc liée au nombre de cellules souches hématopoïétiques survivantes.

La répartition de la moelle osseuse permet de comprendre l'importance de l'hétérogénéité de l'irradiation en situation accidentelle. L'irradiation hétérogène implique qu'il y ait, dans la grande majorité des cas, des territoires de la moelle osseuse qui ont reçu une dose d'irradiation faible, voir nulle. L'hématopoïèse résiduelle dans les territoires médullaires préservés peut permettre une reprise fonctionnelle de l'hématopoïèse, ce qui va influencer le traitement de l'aplasie radio-induite (Bertho *et al.* 2005).

4.2.2.4. Les brûlures radio-induites

La réponse aux rayonnements ionisants de la peau et des tissus sous-jacents est très complexe : c'est le reflet des radiosensibilités particulières de chaque type de cellules impliquées dans ce processus lésionnel, de leur vitesse de renouvellement et de la cinétique de restauration. La réponse de la peau sera très différente selon l'énergie du rayonnement, c'est-à-dire la répartition de la dose en profondeur, le débit de dose, la surface exposée au rayonnement, l'âge et le sexe du sujet irradié et de la zone anatomique irradiée.

Le premier symptôme d'une radiodermite aiguë a d'abord été défini comme une réaction inflammatoire de la peau, équivalente à une brûlure du premier degré. Le stade où s'arrêtera son évolution ultérieure dépend de la dose et de la gravité des lésions et son ordre chronologique sera: érythème secondaire, desquamation sèche, desquamation humide, ulcération ou cicatrisation et/ ou avec fibrose.

L'érythème est causé par la dilation des capillaires du derme et un œdème interstitiel : le flux sanguin décroît progressivement, les parois vasculaires deviennent perméables et laissent passer les différents composants plasmatiques vers les espaces extra vasculaires avec les cellules de la lignée blanche qui adhèrent d'abord aux parois vasculaires puis migrent à travers.

Lorsque l'exposition est réalisée à une plus forte dose une prolifération de l'endothélium vasculaire apparaît après le développement de l'érythème. La dégénérescence cellulaire au niveau de l'épiderme conduit à son amincissement et à l'aplatissement des papilles

dermiques. En général la peau est épaissie, kératinisée, hyperplasique au niveau de l'épiderme. La perte des cellules épidermiques est partiellement compensée donnant à la peau un aspect rugueux, sec et pigmenté (Trott *et al.* 1991). La desquamation humide (radiodermite exsudative) apparaît pour des doses supérieures à 15-20 Gy chez l'homme. Elle correspond à une perte d'épiderme suffisante pour permettre une exsudation de sérum et la formation de croûte (Giordano *et al.* 1993). Une surface rosée, suintante apparaît puis sèche en formant une croûte. La réponse inflammatoire du derme est plus prononcée dans le cas d'une desquamation humide et la surface humide dénudée se couvre de fibrine. L'aspect histologique est analogue à celui d'une brûlure du second degré (Hovdenak *et al.* 2000).

Lorsque la desquamation humide est intense et durable, une lésion secondaire du derme apparaît, comme une conséquence de la déshydratation et de l'infection : c'est la nécrose dermique. Elle est caractérisée par une perte de cellules endothéliales, une réduction de la densité des capillaires et une diminution du flux sanguin dans le derme. Un délai moyen d'apparition de 70 jours chez les pompiers de Tchernobyl exposés à une irradiation combinée β et γ a été observé.

Le processus lésionnel évolue par étape : après une première phase de lésions superficielles, il apparaît une deuxième phase de lésions de nécrose ischémique. Une troisième étape peut être une altération vasculaire en profondeur du muscle et peut déboucher sur une nécrose de la masse musculaire.

4.2.2.5. L'atteinte vasculaire radio-induite

L'endothélium, principal constituant des vaisseaux est présent dans l'ensemble des organes. Au repos, les cellules endothéliales forment une barrière de perméabilité sélective entre le sang et les tissus. Cette barrière est à la fois anti-thrombogène et anti-inflammatoire. Les cellules endothéliales activées assurent le bon déroulement du processus inflammatoire (adhésion et diapédèse des leucocytes du sang vers les tissus) et thrombotique (adhésion et agrégation des plaquettes) nécessaire à la restauration

cellulaire et tissulaire (Michiels *et al* 2003). Suite à une exposition aux rayonnements ionisants ou d'autres stress, les processus inflammatoires et thrombotiques sont induits précocement dans les vaisseaux et notamment dans les micro-vaisseaux qui sont plus radiosensibles. A plus long terme, ces processus provoquent des effets (fibrose tissulaire ou occlusions vasculaires) invalidants ou potentiellement létales pour les sujets irradiés, (Gaugler *et al* 2005).

4.2.2.6. Le syndrome cérébro-vasculaire

Le syndrome cérébro-vasculaire apparaît pour une dose supérieure à 50 Gy et entraîne la mort des sujets irradiés en 2 à 3 jours. La destruction des endothéliums vasculaires est à l'origine d'une augmentation de la perméabilité des capillaires entraînant une fuite des liquides dans l'espace extracellulaire. Il s'ensuit un œdème (cérébral) et un choc cardiovasculaire. Au cours de la phase prodromale, le sujet peut ressentir une sensation de chaleur suivie de nausées, vomissements, confusion, et désorientation. La phase latente est très courte (4 - 6 heures). A la fin de celle-ci, les symptômes nerveux réapparaissent avec une plus grande gravité (tremblement, convulsions) et conduisent au coma et à la mort. Dans le cas de doses massives, les autres syndromes (hématopoïétique et gastro-intestinal) n'ont pas le temps de se développer (Gourmelon *et al.* 2005).

4.3. Irradiation thérapeutique dans le traitement des cancers et effets tardifs

Quatre vingt cinq cancers sur cent sont traités par radiothérapie en France. La radiothérapie consiste à exposer les malades à des rayonnements de hautes énergies, destinés à détruire la tumeur en protégeant au maximum les tissus sains voisins. La sensibilité aux radiations varie selon les tissus et les différents types de cellules (Rubin *et al.* 1968).

Les cellules irradiées sont capables, grâce à des mécanismes enzymatiques, de réparer certaines lésions de leur ADN. Cette restauration des lésions sublétales s'effectue de façon

plus satisfaisante pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses. Il est nécessaire de fractionner l'irradiation en plusieurs séances afin d'obtenir un effet différentiel maximal entre tissu sain et tissu cancéreux. Il existe ainsi des tissus à temps de renouvellement rapide dont l'irradiation entraîne des réactions précoces (sang, peau, intestin, ovaire, muqueuses) et des tissus à temps de renouvellement lent dont l'irradiation entraîne des réactions tardives (os, muscle, foie, rein, tissu nerveux). Lors de la réponse des tissus sains à la radiothérapie il y a activation du système de coagulation (formation de thrombine), de l'inflammation (production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1, IL-8 et IFN- γ), de la régénération épithéliale, de la synthèse de matrice extracellulaire et du remodelage tissulaire (apparition de fibrose) (Denham *et al.* 2002).

Les réactions tardives constituent l'essentiel des effets néfastes de la radiothérapie. Des fibroses des tissus profonds, des ostéoradionécroses et des occlusions intestinales ont été observées, de plusieurs semaines à plusieurs années après radiothérapie (Turesson *et al.* 2003). Ces effets secondaires sur les cellules saines empêchent une utilisation optimale (par escalade de doses aux cellules tumorales) de la radiothérapie.

BUT DE L'ETUDE

But de l'étude

Notre travail s'inscrit dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques pour les victimes d'irradiations accidentelles. Dans tous les cas de figure d'une surexposition, la prise en charge d'une personne irradiée accidentellement est difficile pour plusieurs raisons. D'une part, il peut exister d'autres traumatismes que les effets de l'irradiation (brûlures radiobiologiques, contamination interne, traumatismes mécaniques). D'autre part, plusieurs syndromes radio-induits peuvent se développer simultanément en fonction de la dose reçue : le syndrome hématopoïétique, le syndrome gastro-intestinal et le syndrome cérébro-vasculaire. Dans un contexte d'inflammation généralisée et de réactions immunologiques ces phénomènes regroupés forment le syndrome d'atteinte multi-organes radio-induit (ou Multiple Organ Dysfunction Syndrome : MODS). La combinaison de l'ensemble de ces atteintes rend le traitement d'une victime d'irradiation accidentelle très complexe. Tandis que les traitements du syndrome hématopoïétique semblent être de plus en plus efficaces, les dommages des organes à l'interface avec le milieu extérieur (tractus digestif, peau, poumon) restent toujours difficiles à traiter. A ce jour, les mécanismes physiopathologiques commencent à être mieux appréhendés, et la diminution ou la disparition des cellules normales progénitrices capables de régénérer les tissus semblent être l'une des principales causes du syndrome aigu d'irradiation. Ainsi, en apportant des cellules normales exogènes, la thérapie cellulaire paraît être une stratégie thérapeutique innovante pour le traitement des irradiations accidentelles. Cette technique de régénération tissulaire n'induit pas de rejet de l'organe, de plus la revascularisation n'est en général pas nécessaire, globalement l'approche est beaucoup moins lourde pour le patient.

L'étude présentée dans cette thèse se place dans l'évaluation d'une approche thérapeutique du syndrome multi-organe par thérapie cellulaire. Cette approche innovante permet au travers des cellules souches mésenchymateuses d'apporter des nouvelles cellules saines. Les cellules souches mésenchymateuses possèdent une multi-potentialité et des propriétés de régulation immunologique et inflammatoire. La thérapie cellulaire

basée sur leur greffe semble constituer une approche particulièrement prometteuse à l'heure actuelle.

Nos travaux ont porté sur la mise en évidence de la recolonisation des tissus murins irradiés par les CSM dérivées de moelle osseuse humaine. J'ai développé au cours de ma thèse un modèle de greffe de CSM humaines dans des souris immunotolérantes (NOD/SCID) irradiées. Pour ce faire, des modèles d'irradiation corps entier et localisée ont été développés. La greffe des CSM dans ces modèles a été optimisée. La localisation et la différenciation des cellules humaines implantées au sein des organes murins ont été explorées. La modulation de l'inflammation radio induite par les CSM dans le processus de réparation tissulaire après irradiation corps entier ou locale aiguë sur le modèle murin NOD/SCID a été étudiée. L'impact d'une greffe de CSM sur la reprise fonctionnelle et la régénération des organes ont été évalués.

Les résultats obtenus au cours de ces études apportent des éléments nécessaires au développement d'une nouvelle approche thérapeutique des atteintes tissulaires radio-induites.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

5. Obtention des CSM à partir de MO humaine

Les CSMhu sont isolées à partir de résidus opératoires de moelle osseuse de donneurs sains consentants, conformément aux procédures approuvées par l'expérimentation humaine et les comités éthiques de l'hôpital St Antoine. Ces échantillons sont prélevés sous héparine (choay® Sanofi-synthélabo). Pour obtenir une quantité suffisante de CSMhu à greffer, il est nécessaire des les amplifier préalablement *in vitro*.

5.1. Isolement des cellules mononuclées de la MO humaine

La première étape à JO les cellules mononuclées (CMN) de la moelle osseuse prélevée sont séparées des cellules contenues dans le plasma par un buffy coat. A l'issue de cette étape, les globules rouges, les polynucléaires et les débris cellulaires résiduels sont séparés des cellules mononuclées (CMN) par centrifugation isopycniqne sur Ficoll (densité : 1.077). Les CMN sont ensuite récupérées, lavées etensemencées à une concentration de 10^7 CMN/10ml de milieu de culture dexter (milieu McCOy'5A) après un comptage des cellules à l'hématimètre de Malassez (annexe 1) (Bensidhoum et al. 2004). Au cours de la première semaine de culture, de l'hydrocortisone (Sigma ®) à une concentration de 10^{-6} M (pour inhiber les macrophages ainsi que 1 ng de b-FGF (R&D systeme ®) par millilitre (ml) de milieu et ce tout au long de la culture

5.2. Mise en culture des CSM humaines

Les cellules sont cultivées en flasques T 75 cm² TPL® à 37° C sous 5% de CO₂ en atmosphère humide dans du milieu Dexter complet (annexe 1). A J3 il faut vérifier la présence de cellules adhérentes et changer le milieu (les CSM sont au passage zéro (P0)), A J6 après l'ensemencement, sachant que les CSM ont la propriété d'adhérer au plastique, les cellules sont lavées etensemencées au premier passage P1 à une concentration de 4.10^5 par

flasque T75 cm², après deux changements de milieu, seules des CSMhu persistent et se multiplient. Au second passage P2 (à J14), quand les cellules ont une confluence de 80%, elles sont collectées. Après deux passages seule reste en culture une population de CSMhu totales sans cellules portant les antigènes de surfaces CD14 et CD45. La mise en culture des CSM humaines est détaillée dans l'article FRANCOIS S. al (article et annexe).

5.3. Analyse phénotypique des CSM humaines isolées de MO

Nous avons contrôlé le phénotype des greffons cellulaires humains pour déterminer le pourcentage exact de CSM injectées et l'absence de CSH. Ces travaux ont été réalisés par la technique de cytométrie de flux (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) qui permet le dénombrement et l'analyse de particules en suspension dans un milieu liquide. Nous avons déterminé la quantité de cellules hématopoïétiques ainsi que la quantité de cellules mésenchymateuses contenues dans le greffon. Les CSM humaines au second passage sont incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CD105 (SH2), anti-CD73 (SH3) et anti-CD45 couplés à un fluorochrome pendant 30 minutes à 4°C.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
Anti-CD 105	PE	SN6	Serotec Product
Anti-CD 73	PE	AD2	BD Pharmingen
Anti CD 45	FITC	J33	BD Pharmingen
Contrôle Isotypique	FITC ou PE	679.1Mc7	Beckman Coulter

Après 2 lavages au PBS contenant 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma chemicals Co), les cellules ont été suspendues dans 200 µl de PBS-BSA contenant 1µg/ml de 7-amino actinomycin D (Sigma chemicals Co) pour exclure de l'analyse les cellules mortes. L'analyse a été effectuée en FACS calibur®Becton-Dickinson en enregistrant au minimum

10 000 évènements par point expérimental. A chaque injection un lot de CSMhu est conservé pour analyser la composition cellulaire du greffon.

5.4. Etude du potentiel de différenciation multiple des CSM

Le potentiel de différenciation multiple des CSM a été contrôlé après le second passage. Les CSM en P2 sontensemencées à 50 000 cellules/cm² et cultivées à 37°C, 5% de CO₂. Les cellules sont incubées 21 jours dans un milieu de culture à base de DMEM (Invitrogen ; Gibco ®) auquel est ajouté :

- de l'acide ascorbique à 0.17 mM, de la dexaméthasone Sigma® à 0.5 µg/ µl et du β-glycérol-phosphate à 10 mM Sigma®, pour induire l'ostéogénèse,
- de 50 µg/ml d'acide ascorbique, 0.17 mM d'acide ascorbique, 0.35 mM de L-Proline, 1ml d'ITS 10X pour 100 ml de milieu, 5.33 µg/ml d'acide linoléique et 1 ng/ml de TGF-β1 pour induire la chondrogenèse
- de l'indométhacine à 0.2 mM, de l'hydrocortisone à 10⁻⁶ M et de l'insuline à 1mg pour 100 ml de milieu pour induire l'adipogénèse.

La mise en évidence des différenciations se fait par coloration chimique après fixation au mélange acétone/méthanol (70%, 30%) ou Para Formaldéhyde (PFA 4%). L'Alizarin Red S colore en rouge les dépôts calciques mettant en évidence l'ostéogénèse. Le Bleu Alcian et la Safranine O colorent respectivement les protéoglycanes (en bleu) et les glycosaminoglycanes (en rouge orangé) permettant la mise en évidence de la chondrogenèse. L'Oil Red O colore les vésicules lipidiques pour révéler l'adipogénèse.

6. Les trois configurations d'irradiations et la greffe de CSM dans le modèle murin

NOD/SCID

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées en conformité avec les règlements du Ministère de l'Agriculture Française pour l'expérimentation animale (Acte n° 87.847 19 octobre 1987, modifié en mai 2001).

6.1. Le modèle murin NOD/SCID

Les souris NOD/SCID sont de même fond génétique que les souris BALB/C, issues d'un croisement entre des lignées de souris portant chacune une mutation (Prochazka *et al.* 1992), les souris SCID portent une mutation autosomale (C.B-17 *scid*) qui conduit à un défaut en lymphocytes B et T fonctionnels (Bosma *et al.* 1983), lié à un défaut de réarrangement des gènes codant pour les immunoglobulines des cellules B et pour le récepteur à l'antigène des cellules T (Schuler *et al.* 1986). Ces souris NOD portent également une mutation conduisant à une forte diminution du nombre de lymphocytes T et de cellules NK (Kataoka *et al.* 1983; Poulton *et al.* 2001). Il en résulte que ce modèle présente une immunodéficience sévère faisant de lui un très bon modèle pour la greffe xénogénique.

Les reproducteurs proviennent du laboratoire Jakson (Bar Harbor, ME) et l'élevage est maintenu dans une enceinte stérile. Toute personne pénétrant dans l'animalerie porte une blouse stérile, un masque, une charlotte, des gants et des sur-chaussures pour éviter toutes contaminations extérieures. Les animaux en cours d'expérimentation sont hébergés dans des cages à couvercles filtrants auto-clavés et leur alimentation est stérile. Les cages sont placées dans des armoires dont l'air est filtré, la température de l'isolateur et des armoires est maintenue à 22°C avec un cycle lumineux de 12 heures. La manipulation de ces souris est réalisée sous hotte à flux laminaire horizontale stérilisée par les UV pendant 1 heure après chaque expérimentation. Un contrôle sanitaire est effectué tous les 6 mois par le C.D.T.A d'Orléans (Centre de Développement des Techniques Avancées pour

l'expérimentation animale). Ce centre contrôle l'absence d'ectoparasites, d'endoparasites (comme *Aspicularis tetraptera*, plus communément appelé Oxyure) et de différentes bactéries du tractus digestif et respiratoire qui sont mortelles pour ce modèle immunodéficient.

6.2. Mise au point des Trois configurations d'irradiation

Pour les trois configurations d'irradiation une dosimétrie en chambre d'ionisation a été réalisée. La figure résumant les résultats de la dosimétrie pour les configurations d'irradiations localisées sont illustrés en annexe 2.

6.2.1. Irradiation corps entier

Les souris âgées d'au moins 8 semaines sont placées dans des boîtes de contentions stériles et irradiées dans l'irradiateur (IBL 637) par groupe de cinq à l'aide d'une source de ^{137}Cs dont le débit de dose est de 1.85 Gy /minute. Pour étudier la dynamique d'implantation des CSM après greffe à long terme dans le cas d'une Irradiation corps entier (ICE), nous avons réalisé une courbe de survie dans le but de déterminer la dose d'ICE permettant d'observer les animaux le plus longtemps. Pour étudier la dynamique d'implantation des CSM après greffe, nous avons réalisé une cinétique temporelle de 48h à 6 mois post-irradiation. Au cours de cette étude toutes les souris NOD/SCID reçoivent uniquement une dose sublétales de 3.2 Gy sur tout le corps. Pour chaque temps de la cinétique, un groupe de 15 animaux est utilisé.

6.2.2. Irradiations localisées

Dans les deux cas d'irradiations localisées les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine (Ilmagène® 1000, MERIAL à 100 mg/kg), de Xylazine (Rompun® 2%, BAYER à 10 mg/kg) et de sérum physiologique. Un volume de 0.1 ml pour 10 mg de souris de cette solution analgésiante est injecté. Cette solution entraîne une anesthésie et une analgésie d'une durée de 20 à 30 minutes. Les animaux anesthésiés sont positionnés par deux ou seul dans les boîtes à contention stériles. Les irradiations localisées ont été réalisées avec une source de Cs¹³⁷ sur l'IBL 637, à l'aide d'un empilement de 5 collimateurs en plomb de façon à obtenir une fenêtre d'irradiation de 2 cm² avec un débit de dose de 0,382 Gy/minute.

Nous avons utilisé 2 configurations d'irradiations localisées aiguës : une irradiation localisée au niveau de la sphère abdominale (IA: Irradiation abdominale) une irradiation localisée au niveau de la patte droite postérieure (IP: irradiation patte). Les différentes configurations d'irradiations localisées et les temps d'expositions sont illustrés dans l'annexe 2.

6.2.2.1. Irradiation abdominale

L'irradiation abdominale (IA) se réalise en deux temps : dans un premier temps, les animaux reçoivent une ICE de 3.2 Gy et ensuite au niveau de la sphère abdominale une dose de 4.8 Gy. Il en résulte que ces animaux sont irradiés au niveau de l'abdomen à une dose totale de 8 Gy sur une zone de 2 cm². De même que pour l'ICE, afin d'étudier la dynamique d'implantation des CSMhu après greffe, nous avons réalisé une cinétique temporelle de 48h à 6 mois post-irradiation. Pour chaque temps de la cinétique, un groupe de 15 animaux est utilisé.

6.2.2.2. Irradiation de la patte droite postérieure

L'irradiation de la patte droite postérieure (IP) se déroule également en deux temps avec une première ICE à 3.2 Gy suivi d'une irradiation locale de la patte droite postérieure à des doses totales de 15, 20 et 25 Gy. Pour chaque dose étudiée, un groupe de 15 animaux est utilisé. Les animaux sont sacrifiés 6 semaines post-exposition. Après irradiation les animaux sont épilés au niveau des pattes postérieures de façon à apprécier la repousse du poil en comparant la patte irradiée et la patte gauche dite témoin. Pendant ces 42 jours nous avons suivi macroscopiquement l'apparition des lésions radio-induites (desquamation, œdème, nécrose) et la cicatrisation.

6.3. Greffe des CSM dans le modèle murin NOD/SCID

Pour chaque temps de la cinétique d'implantation des CSM humaines en P2 et pour chaque dose d'IP nous avons utilisé : 5 animaux uniquement exposés (les témoins), 10 animaux uniquement greffés (les shams) et 10 animaux irradiés et greffés. Le poids, le comportement des animaux ainsi que leur consommation hydrique et alimentaire sont suivis tout au long de l'expérimentation. Une étude préliminaire réalisée au laboratoire avait précédemment déterminée les meilleures conditions d'injection des CSM (Bensidhoum et al. 2004). Les CSM humaines en P2 sont injectées au niveau de la veine caudale, 24h après irradiation à une concentration de 5 millions pour une ICE et une IA et de 2,5 millions pour une IP. Avant injection un traitement à la collagénase du greffon est réalisé pour éviter que les CSM ne s'agglutinent.

6.4. Prélèvements des tissus

Avant chaque prélèvement les souris NOD/SCID sont anesthésiées par une injection intrapéritoniale de 350 µl de mixte Imalgène Rompun/serum physiologique (décrit précédemment). Les tissus sont prélevés de 48h à 6 mois post-IA et ICE et à 6 semaines

post-IP. Une ponction intracardiaque est réalisée, les souris sont sacrifiées et prélevées, et le sang est conservé pour analyse. Pour éliminer les cellules sanguines dans les organes, on réalise une perfusion de 40 ml de PBS 1X. Les souris sont placées à 4°C lors des prélèvements pour diminuer la dégradation des ARN. L'ordre de prélèvement s'effectue suivant la vitesse de dégradation qui varie suivant les organes. Sur les souris sont prélevés: le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les reins, la rate, l'ensemble du tractus digestif (estomac, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon proximal et colon distal), la peau abdominale et des pattes postérieures, le muscle abdominal et les quadriceps. Les prélèvements des fémurs et des tibias et de la moelle osseuse sont réalisés en dernier.

Le protocole expérimental *in vivo* et le devenir de chaque organe prélevé est illustré dans l'annexe 3. Chaque organe est scindé en deux parties: une partie est conservée dans 500 µl de RNAlater Quiagen® (stabilisant l'ARN) permettant de réaliser les analyses de biologie moléculaire, et la seconde partie est fixée pendant 12 h dans du para-formaldéhyde à 4% avant d'être déshydratée et imprégnée en paraffine par un automate (Annexe 12), avant d'être coulée dans un bloc de paraffine pour les différentes études histologiques. Les fémurs analysés en histologie sont préalablement décalcifiés dans une solution décalcifiante SAKURA TDE™ pendant plus de 4 heures, puis fixés et déshydratés.

Dans le cas du prélèvement intracardiaque sans héparine, un volume moyen de 700 µl de sang est récupéré, lequel est divisé en deux parties, une partie est utilisée pour étudier la NFS. L'autre partie, sur laquelle les globules rouges sont lysés avec un tampon de lyse (annexe 4) est conservée en culot sec à -80°C et destinée à l'extraction d'ADN.

7. Etude des paramètres physiologiques du modèle murin NOD/SCID

7.1. Etude du taux plasmatique des paramètres biochimiques du sang

Les taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques ont été mesurés de façon à mettre en évidence d'éventuelles atteintes rénales et/ou hépatiques radio-induites après ICE et IA. Dans un premier temps les animaux ont été prélevés au niveau des sinus rétro-orbitaux. Du fait de la petite quantité de plasma obtenu le taux d'urée plasmatique a

uniquement été mesuré et ce, sur une période 30 jours pour mettre en évidence les temps auxquels il semble intéressant d'approfondir l'analyse biochimique. Pour chaque temps où il semble intéressant de doser tous les paramètres biochimiques, nous avons prélevés 10 animaux (irradiés non greffés), 10 animaux (irradiés greffés) et 5 animaux uniquement greffés (les shams).

7.1.1. Dosage plasmatique de l'urée

L'urée est le produit final de la dégradation par le foie des acides aminés provenant des protéines d'origine alimentaire, elle représente 75% de l'azote non protéique éventuellement excrétée. L'urée est ensuite véhiculée par la circulation jusqu'aux reins où elle est éliminée dans les urines. Il y a 3 facteurs majeurs qui déterminent la concentration plasmatique d'urée : La perfusion rénale et la quantité d'eau excrétée, la vitesse de synthèse de l'urée et la vitesse de filtration glomérulaire. La signification d'une augmentation du taux d'urée plasmatique peut être l'absence d'hydratation altérant la fonction rénale, une urémie élevée peut également provenir d'un régime hyperprotidique, d'un effort prolongé ou d'une insuffisance rénale aiguë. La signification de la baisse du taux d'urée plasmatique peut être observée lors d'une hémodilution c'est à dire lorsque le sang est trop dilué en eau, ou dans le cas d'une insuffisance hépatique sévère et dans le cas de malnutrition ou d'un jeûne prolongé. De ce fait, en parallèle à ce dosage sérique il est impératif de suivre la consommation alimentaire et hydrique des animaux.

La détermination quantitative de la concentration plasmatique d'urée est réalisée au moyen des analyseurs Konelab™, selon la procédure thermoclinical Labsystems décrite en annexe 5. L'analyse repose sur le fait que le NADH (la forme réduite) absorbe fortement autour de 340 nm alors que le NAD⁺ (la forme oxydée) n'absorbe pratiquement pas. L'analyseur va suivre par spectrophotométrie la diminution de l'absorbance à 340 nm et mesurer la concentration absolue car les proportions de chaque produit ou substrat sont parfaitement stœchiométriques selon la loi de Beer Lambert.

7.1.2. Dosage plasmatique de la créatinine

La créatinine est un produit de dégradation de la créatine. Celle-ci est stockée au niveau musculaire sous forme libre et surtout sous forme de créatine-phosphate. Lors de sa dégradation, il y a libération de créatinine et formation d'ATP (adénosine triphosphate). La créatinine est filtrée au niveau glomérulaire mais n'est pas réabsorbée au niveau tubulaire. En revanche, il existe une sécrétion tubulaire qui augmente dans certaines situations pathologiques, en particulier au cours de l'insuffisance rénale, et peut représenter de 10 à 40 % de la créatininurie. Bien que l'excrétion de la créatinine soit influencée par l'alimentation et l'activité physique et qu'il existe par ailleurs, en plus de la filtration glomérulaire, une sécrétion rénale, la créatininurie est utilisée comme référence pour apprécier la filtration glomérulaire. La prise alimentaire et hydrique pouvant moduler la créatininurie, il est nécessaire de suivre ces paramètres au cours de l'expérimentation sur les animaux prélevés. Une augmentation du taux de créatinine dans le sang peut également être liée à certaines pathologies comme la leucémie, l'hypertension artérielle, le diabète et l'insuffisance cardiaque (Mlekusch *et al.* 2003).

La détermination quantitative de la concentration plasmatique de créatinine est réalisée au moyen de l'analyseur Konelab™, selon la procédure procédure thermoclinical Labsystems décrite en annexe 6 utilisant le principe de Jaffé (Cruickshank *et al.* 1988) où la créatinine génère une coloration rouge en présence d'une solution alcaline de picrate. L'intensité de la coloration rouge-orangé du complexe que forment la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin est mesurée par l'automate à 510 nm, sans action de créatinases. Les dosages sont effectués sur du plasma après élimination des protéines par l'acide picrique ajouté avant alcalinisation. L'analyseur va suivre par spectrophotométrie la vitesse à laquelle la créatinine produit un complexe coloré à une absorbance de 510 nm et mesurer la concentration absolue selon la loi de Beer Lambert. Sachant que certaines substances réagissent plus lentement avec la solution alcaline de picrate (glucose, protéines, lactulose ...) et d'autres plus rapidement comme l'acétoacétate, l'automate

mesure la cinétique et non le point final de cette réaction, ceci minimisant l'effet d'interférence avec d'autres substances qui peuvent exister comme la bilirubine.

7.1.3. Dosage plasmatique des transaminases ASAT/ALAT

L'aspartate aminotransférase (ASAT/AST) et l'alanine aminotransférase (ALAT/ALT), font partie d'un groupe d'enzymes les aminotransférases ou transaminases, qui catalysent la transformation réversible des acides α -cétoniques en acides aminés par transfert de groupes amines. L'ASAT et l'ALT sont toutes deux normalement présentes dans le plasma, la bile, le liquide céphalo-rachidien mais sont absentes dans l'urine, sauf en cas de lésion rénale. Lors de nécroses hépatiques, les concentrations plasmatiques en AST et en ALT s'élèvent avant même l'apparition des signes cliniques et des symptômes. Bien que les concentrations sériques en AST et en ALT augmentent toutes deux lors de tout processus affectant l'intégrité des cellules hépatiques, l'ALT est l'enzyme la plus spécifique du foie. En revanche une élévation du taux d'AST peut survenir avec des lésions du cœur ou des muscles squelettiques au même titre qu'avec des lésions du parenchyme hépatique. Une élévation de l'activité de l'ALT sérique n'est que rarement observée lors de maladies autres que des pathologies du parenchyme hépatique (Himmerich *et al.* 2005).

La détermination quantitative de la concentration plasmatique des transaminases est réalisée au moyen des analyseurs Konelab™, selon la procédure décrite procédure thermoclinical Labsystems en annexe 7 (cf dosage plasmatique de l'urée).

7.2. Etude des taux sériques des protéines pro-inflammatoires

Pour étudier l'effet des CSM sur le processus inflammatoire induit par les 3 types d'irradiations détaillées ci-dessus, nous avons réalisé la quantification des protéines inflammatoires (les interleukines, chemokines et MMPs) par la technique typique d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) menée par la société Perbio®.

- Cytokines :
 - Interleukines Il1 α / β , Il-2, Il4, Il6, Il8 (KC), Il10
 - GM-CSF, IFNF- γ , TNF- α , Ostéopontine
- Chémokines : SDF-1 β , TARC, RANTES, MIP-1, MCP-1
- Métalloprotéinases : MMP2, MMP9

Ces travaux ont été effectués à l'aide de plaques à 96 puits, chaque puits possède 16 anticorps monoclonaux de spécificité différente. Le signal chimico-luminescent de chaque puits a été analysé par le logiciel Searchlight CCD Imaging des laboratoires Perbio®. L'intensité du signal généré par la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité de protéines cibles présentes dans les sérums prélevés 48h après irradiation.

8. Biodistribution et différenciation *in vivo* des CSM

8.1.Extraction d'ADN et d'ARN

Cette étape a pour but d'obtenir de l'ADN pur à partir des cellules présentes dans un tissu donné afin d'y rechercher de l'ADN humain par amplification du gène de la β -Globine humaine. En parallèle sur ces mêmes échantillons d'ADN, la présence d'ADN murin est détectée par amplification du gène murin de la RAPSIN (Receptor-Associated Protein at the Synapse).

L'extraction se déroule en deux grandes étapes, une lyse tissulaire pour chacun des organes et l'extraction d'ADN par le biorobot 9604 Quiagen® qui utilise la même procédure que le kit QIAamp DNA MiniKit QIAgen® (annexe 8) donnant la possibilité d'extraire 96 échantillons d'ADN en même temps. L'extraction d'ADN du sang prélevé est réalisée avec le kit Paxgene blood DNA test preanalytix® (annexe 8).

8.1.1. Lyse tissulaire

Les différents échantillons sont coupés et pesés, une partie est utilisée pour l'extraction d'ADN et la seconde partie est conservée à -80°C pour une extraction d'ARN. La partie utilisée pour l'extraction d'ADN est broyée dans un tampon de lyse (ATL QIAgen®) contenant des détergents. Les broyats tissulaires sont effectués dans 300 µl de tampon ATL. Les organes les plus riches en collagène tels que l'os, le muscle et la peau sont préalablement incubés dans un bain marie à 67°C pendant 1 heure avec 30 µl de collagénase. Pour tous les broyats tissulaires un traitement avec 20 µl de QIAGEN® protéinase K est réalisé dans un bain marie à 57°C pendant 12 heures. Les lysats tissulaires sont passés sur colonnes Qiaschreder QIAgen® pour éliminer les débris cellulaires.

8.1.2. Extraction d'ADN

Le BIOROBOT 9604 Qiagen® utilise des lysats dont la concentration est de 5 mg de tissus dans 180 µl de volume final, si cette quantité est dépassée les colonnes d'extraction risquent d'être saturées. Les volumes de lysats étant déterminés, ils sont déposés dans le bloc réactionnel à 96 puits du BIOROBOT et complétés à 180 µl avec du tampon ATL.

Le BIOROBOT utilise la procédure du logiciel QIAsoft 3.0 plus du BIOROBOT qui est la même que celle utilisée par le kit QIAamp DNA minikit de Qiagen® (annexe 3).

Les différentes extractions sont collectées dans un s-bloc, le volume des différents échantillons d'ADN est constant à 100 µl, la densité optique (DO) est lue à 260 nm (1 unité de DO = 50 ng/µl d'ADN) et le ratio DO_{260}/DO_{280} déterminant la pureté des échantillons sont mesurés.

8.1.3. Extraction des ARN totaux à la synthèse d'ADNc

Les ARN sont extraits à partir des tissus dans lesquels a été détecté de l'ADN humain pour étudier par RT-PCR l'expression de gènes humains par les CSM dans les tissus murins où elles se sont implantées. Cette extraction est réalisée suivant la procédure du kit Rneasy Mini Kit de Qiagen® (annexe 9). Les ARN totaux sont quantifiés, sachant qu'une unité de DO = 40ng/ d'ARN.

Avant d'être rétro-transcrits, les ARN sont préalablement linéarisés par dénaturation thermique dans un bain marie à 65°C pendant 5 minutes de façon à dénaturer les structures en tige-boucle. Connaissant la quantité d'ARN, on réalise la synthèse d'ADNc sur le volume correspondant à 1 µg d'ARN auquel on ajoute un mélange contenant des amorces aléatoires (Random Primers Invitrogene®), des dNTP (Invitrogene®), un tampon ionique (Tampon first-stand 5X Invitrogene®), du dithiothréitol (DTT, dénaturant les ponts disulfures protéiques), un inhibiteur de RNases (RNase OUT®) et une transcriptase inverse qui est la superscript II®. La réaction de polymérisation se réalise dans un thermocycleur Biometra® (annexe 9).

8.2. Mise en évidence de l'ADN humain dans les tissus murins par PCR quantitative

La PCR quantitative est réalisée suivant la technique TaqMan™. La détection et la quantification des produits de PCR sont effectuées en temps réel grâce à un procédé d'enregistrement de l'augmentation de la fluorescence lors de la cinétique d'amplification réalisée par l'automate (ABIPRISM 7700 PE Applied Biosystems™). La sonde TaqMan™ consiste en un oligonucléotide comportant en son extrémité 5' un fluorochrome dit « reporteur », et à son extrémité 3' un fluorochrome dit « quencher » (inhibiteur de fluorescence, TAMRA), qui inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR, la sonde s'hybride spécifiquement entre les amorces sens et anti-sens. Pendant l'élongation, la sonde est clivée par l'activité exonucléasique 5'-3' de l'ampliTaq Gold™ inhibant la fluorescence. Au cours de la phase exponentielle, la quantité de brins néo-synthétisés est proportionnelle à

la quantité de matrice initiale. Le Threshold Cycle (Ct) représente le cycle pour lequel le signal est supérieur au seuil de détection, et le début de la phase exponentielle d'amplification d'ADN. Plus le Ct est faible et plus l'amplification exponentielle de la cible est précoce et inversement plus le Ct est grand et moins la quantité de cible est importante. Dans le cas d'un Ct égale ou proche de 40, on considère qu'il n'y a pas d'amplification.

Cette technique de PCR quantitative a pour but d'exprimer une fréquence de cellules humaines en amplifiant le gène de la β -Globine humaine (β -Globine humaine amorce sens 5'GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA3' et anti-sens 5'CCTTGATACCAACCTGCCAGG3' et la sonde 5'FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3' (FAM, 6-carboxy-fluorescein, TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-rodamine) par rapport aux cellules murines en amplifiant spécifiquement le gène de la rapsyn murine (amorce sens 5'ACCCACCCATCCTGCAAAT3') et anti-sens (5'ACCTGTCCGTGCTGCAGAA3') au sein d'un tissu donné. Les amorces utilisées pour cette étude ont une efficacité supérieure à 90%, elles sont strictement spécifiques de l'espèce (humain ou murin). La détermination du pourcentage de cellules positives en PCR est calculée à partir du nombre de copies contenues dans une certaine quantité d'ADN de souris ou d'homme et ce calcul est détaillé en annexe 10

8.3. Etude de l'expression des gènes humains SH2, SH3, alpha-SMA des CSM humaines *in vivo* par RT-PCR

Le but de ces travaux est de démontrer le potentiel de restriction (diminution ou extinction de l'expression de gènes) ou d'induction (augmentation de l'expression de gènes) des CSM suivant leur implantation tissulaire. Pour cette étude un lot de CSM a été conservé avant une greffe sur lequel le transcriptome a été étudié par RT-PCR. Les ARN messagers (ARNm) sont extraits par la procédure du kit RNeasy® mini kit de Qiagen®, (annexe 9). Avant d'être retro-transcrits les ARNm sont d'abord linéarisés par dénaturation thermique. Un μ g d'ARN est ensuite ajouté à un mélange contenant des amorces aléatoires (Random Primers®), des dNTP (Invitrogene®), un tampon ionique (Tampon first-stand 5X

Invitrogen®), du dithiothréitol (DTT, dénature les ponts disulfures des protéines), un inhibiteur des RNases (RNase OUT®) et une transcriptase inverse (Superscript II®). La réaction de polymérisation se fait dans un thermocycleur Blometra®. Les ADNc sont soumis à une amplification en utilisant les amorces spécifiques de l'ARNm codant pour les gènes SH2, SH3 et α -SMA humain. Le gène de la GAPDH a été choisi comme gène de référence et amplifié en utilisant des amorces et une sonde fluorescente (VIC) (Applied Biosystems®). Les PCR en temps réel ont été réalisées en double avec le système de détection de séquence ABI prism 7700 (Applied Biosystems®). Les résultats de PCR en temps réel sont exprimés en nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'un signal significatif (Ct). La quantification des ARNm de SH2, SH3 et α -SMA a été réalisée par différence (Δ Ct) entre le nombre de Ct du gène d'intérêt (SH2, SH3, α -SMA) et celui du gène de référence (GAPDH), considéré comme invariant. Pour étudier l'induction ou l'extinction de ces gènes, nous avons exprimé nos résultats en quantités relatives représentant le ratio de la quantité d'ARNm humain *in vivo* sur la quantité d'ARNm humain avant greffe. La procédure de PCR sur l'ADNc est résumée en annexe 11.

Les amorces utilisées pour les gènes SH3, SH2 et α -SMA :

CD73-1228F: TATCCGGTCGCCCATTGAT

CD73-1300R: AAAGGGCAATACAGCAGCCA

CD105-1075F: ATCCAGACAAAGTGTGCCGAC

CD105-1146R: GCACTTCAAATGCGCAACA

Alpha-SMA-1228F: GAAGAGCATCCCACCCTGC

Alpha-SMA-1300R: ATTTTCTCCCGGTTGGCCT

8.4. Les contrôles

Les contrôles effectués obligatoirement pour chaque plaque de PCR sont :

- Une absence de contamination par un produit de PCR ou un acide nucléique contaminant,
- une absence d'amplification d'un contaminant d'ADN dans un échantillon d'ARN dans le cas d'une RT-PCR,
- une absence d'amplification d'un acide nucléique murin par les amorces humaines et inversement

L'efficacité doit être supérieure à 90% pour chaque couple d'amorces et les Ct varient moins de 0,1 cycle pour chaque amplification. Chaque essai est réalisé en double pour vérifier la reproductibilité de l'expérience.

9. Etude histologique

L'étude de l'implantation des CSMhu dans des organes irradiés ne serait pas complète si une étude de l'atteinte tissulaire ainsi qu'une localisation des ces cellules humaines au sein des différents organes positifs en PCR n'avait pas été effectuée. De ce fait, nous avons réalisé des colorations HES, des marquages d'apoptose et de prolifération cellulaire sur les tissus des souris irradiées non greffées et sur les tissus des souris irradiée greffées pour déterminer l'atteinte tissulaire radio-induite et observer si la greffe de CSMhu modifiait cette atteinte structurale. De plus, cette étude histologique a été complétée par la localisation *in situ*.des CSM humaines dans les différents organes par un marquage immunohistologique de la β -2-microglobuline humaine. Pour déterminer si les CSM conservent *in vivo* leur haut pouvoir prolifératif nous avons également réalisé un marquage immunohistochimique de la protéine PCNA.

Pour l'étude histologique, les organes sont fixés pendant 12 h dans du paraformaldéhyde 4% puis inclus en parrafine, ceci étant réalisé par l'automate VIP-Tissue-TeK®, lequel utilise une succession de bains comprenant 4 étapes : déshydratation, éclaircissement,

imprégnation ou infiltration et enrobage (annexe 12). Les tibias prélevés sont d'abord décalcifiés pendant 4 heures dans une solution décalcifiante (Decalcifier solution SAKURA TDE™) puis fixés et déshydratés comme les autres tissus. L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. La paraffine étant hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degrés croissants puis dans des bains de toluène (butanol ou LMR) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage, qui infiltre alors tout le tissu. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel l'organe prélevé est inclus et sur lequel il est possible de réaliser des coupes de 3 à 5 µm à l'aide d'un microtome.

Pour chaque marquage ou coloration, les coupes d'organes sur lames sont déparaffinées et déshydratées par des bains successifs de xylène et d'éthanol absolu.

9.1. Marquage trichromique HES

Les colorations HES permettent d'étudier la structure tissulaire avant et après irradiation avec ou sans implantation des CSM humaines. Nous avons réalisé une coloration trichromique alliant une coloration nucléaire (par l'hématoxyline), une coloration cytoplasmique (par l'éosine) et une coloration du collagène par la Safranine sur des sections de 5 µm d'épaisseur, quelque soit le tissu. Suite à cette coloration (annexe 13), sur chaque tissu on observe les noyaux en bleu-noir, le cytoplasme en rose et le collagène en jaune. Ces travaux permettent d'observer des modifications structurales comme la destructuration villositaire, les déplétions cellulaires, la formation d'ulcération, on peut également observer s'il y a présence de zone(s) cellulaire(s) en mitose. L'ensemble des observations permettent de déterminer si le tissu observé est altéré ou non. Pour les organes comme le rein et le foie les observations structurales peuvent être améliorées par une coloration à l'acide périodique de Schiff et ou au trichrome de Masson.

9.2. Marquage immunohistochimique TUNEL

Pour appuyer les observations structurales faites sur les colorations HES, nous avons évalué la mort cellulaire apoptotique par la technique TUNEL en utilisant le kit *In Situ* (Cell Death POD de Roche Applied Science®) (annexe 14)

Nous avons observé et quantifié le nombre de cellules en apoptose au niveau des jéjunums des animaux, témoins, non-irradiés greffés (shams) et prélevés de 48 heures à 15 jours post-ICE et IA, greffés ou non.

9.3. Marquage immunohistochimique Ki 67 murin

L'étude de la prolifération cellulaire peut être effectuée à l'aide de plusieurs paramètres : index mitotique, taux d'incorporation de la 5-bromo-désoxyuridine (BrdU), analyse de protéines associées au cycle cellulaire. Parmi ces protéines, l'antigène Ki-67 est le plus largement étudié. Son intérêt en pratique médicale a été longtemps limité par le fait que ce marqueur n'était détectable que sur coupes à congélation. La commercialisation d'un antisérum utilisable sur tissus fixés par les réactifs formolés (Cattoretti *et al.* 1992) rend possible les études rétrospectives. Les travaux de caractérisation de la protéine Ki-67 ont permis de montrer qu'elle était exprimée durant toute la durée du cycle cellulaire, permettant d'évaluer la fraction cellulaire en phase de croissance. Grâce à ce marquage (annexe 15) nous avons pu quantifier le taux de cellules murines en phase de croissance après irradiation et le comparer au taux de cellules murines en prolifération en présence de CSMhu.

Nous avons observé et quantifié le nombre de cellules en prolifération au niveau des jéjunums des animaux, témoins, non-irradiés greffés (shams) et prélevés de 48 heures à 15 jours post-ICE et IA, greffés ou non

9.4. Marquage immunohistochimique de la bêta-2-microglobuline humaine

Les cellules humaines ont été localisées au sein des tissus murins grâce à un immunomarquage de bêta-2-microglobuline humaine. L'anticorps polyclonal NCL-B2Mp-NOVO-CASTRA® utilisé est spécifique de l'homme et ne croise pas avec les antigènes de souris. Ce marquage a été réalisé sur les organes où le taux d'ADN humain était le plus élevé pour augmenter la probabilité d'observer les CSM humaines sur les coupes.

Après le déparaffinage, les lames sont plongées dans un bain de Triton 0,1X pour augmenter la perméabilité, puis une digestion enzymatique par la trypsine 250 Difco® à pH 7,8 est réalisée pour améliorer l'accessibilité à l'antigène β -2-microglobuline, en chambre humide sous agitation à 37°C. L'anticorps primaire est utilisé à une dilution 1/25, incubé 1 heure à 37°C. Les biotines endogènes sont bloquées et le second anticorps E0432 (Dakocytomation®) couplé à la phosphatase alcaline est dilué au 1/200 et incubé 30 minutes. La réaction enzymatique de la phosphatase alcaline se déroule sous l'action successive de 6 réactifs du kit Enhanced V-Red Detection ventana®. Le marquage se termine par une contre-coloration à l'hématoxyline et une réhydratation des tissus par des bains d'Ethanol et de Xylène. Les lames sont ensuite recouvertes d'un film plastique. Les cellules positives pour cet antigène humain sont marquées en rouge (Cf article FRANCOIS S.annexe). Suivant les tissus, la procédure de marquage varie. Par exemple pour l'intestin le démasquage antigénique a été réalisé dans un tampon citrate PH : 6 à 99°C pendant 20 minutes, les peroxydases endogènes sont inhibées dans un bain de méthanol à 3% H₂O₂, l'anticorps primaire est dilué au 1/250^{ème}. La réaction enzymatique se déroule sous l'action successive des réactifs du kit basic DAB detection ventana®. Dans ce cas les cellules positives seront colorées en marron

9.5. Marquage immunohistochimique PCNA

Nous avons évalué la prolifération cellulaire des cellules humaines implantées dans le rein et le cerveau des souris NOD/SCID irradiées, en réalisant un marquage de l'antigène nucléaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, NOVOCASTRA®), (annexe 16). Cette protéine accessoire de l'ADN polymérase est synthétisée au cours du cycle cellulaire. L'anticorps NCL-PCNA a autant d'affinité avec l'antigène murin qu'avec l'antigène humain. Le marquage n'étant pas spécifique de l'espèce, nous avons réalisé un marquage de la β -2-microglobuline humaine et un marquage de l'antigène PCNA sur des coupes successives.

10. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Sigmastats (SPSS, Paris, France). Les résultats sont reportés sous forme de moyenne \pm écart type (ET) ou écart standard à la moyenne (ES). Les comparaisons entre groupes ont été réalisées avec le t-test. Les différences sont considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***), la non significativité est notée (ns).

RESULTATS

RESULTATS

11. Caractérisation des CSM isolées et amplifiées à partir de MO

11.1. Capacité de différenciation *in vitro* des CSM

Pour déterminer si les cellules souches mésenchymateuses isolées et amplifiées à partir d'échantillon de moelle osseuse humaine conservent leur capacité de différenciation multiple, l'ostéogenèse, la chondrogenèse et l'adipogenèse ont été induites *in vitro* sur les CSM récoltées au second passage (CSM en P2). Ce sont les premières voies de différenciation décrites dans la littérature. La différenciation a été mise en évidence par coloration chimique des molécules synthétisées par les CSM dans leur milieu d'induction.

L'évaluation du potentiel ostéogénique des CSMhu en P2 a été réalisée par marquage de l'activité de la phosphatase alcaline des cellules en utilisant une solution de rouge d'alizarin permettant de révéler la présence de dépôts calciques (Figure 8B). Les CSM mises en culture avec un milieu d'induction de la chondrogenèse sont colorées avec du bleu alcian et de la safranine O de façon à colorer en bleu les protéoglycanes et en rouge orangé les glycosaminoglycanes (Figure 8C). Le potentiel adipogénique des CSM cultivées a été révélé par marquage au Oil red O pour mettre en évidence la présence des vésicules lipidiques (Figure 8D).

La différenciation *in vitro* des CSM en P2 amplifiées à partir de MO humaine, a permis de vérifier que ces cellules humaines isolées conservent leur potentiel de différenciation au moins jusqu'au deuxième passage.

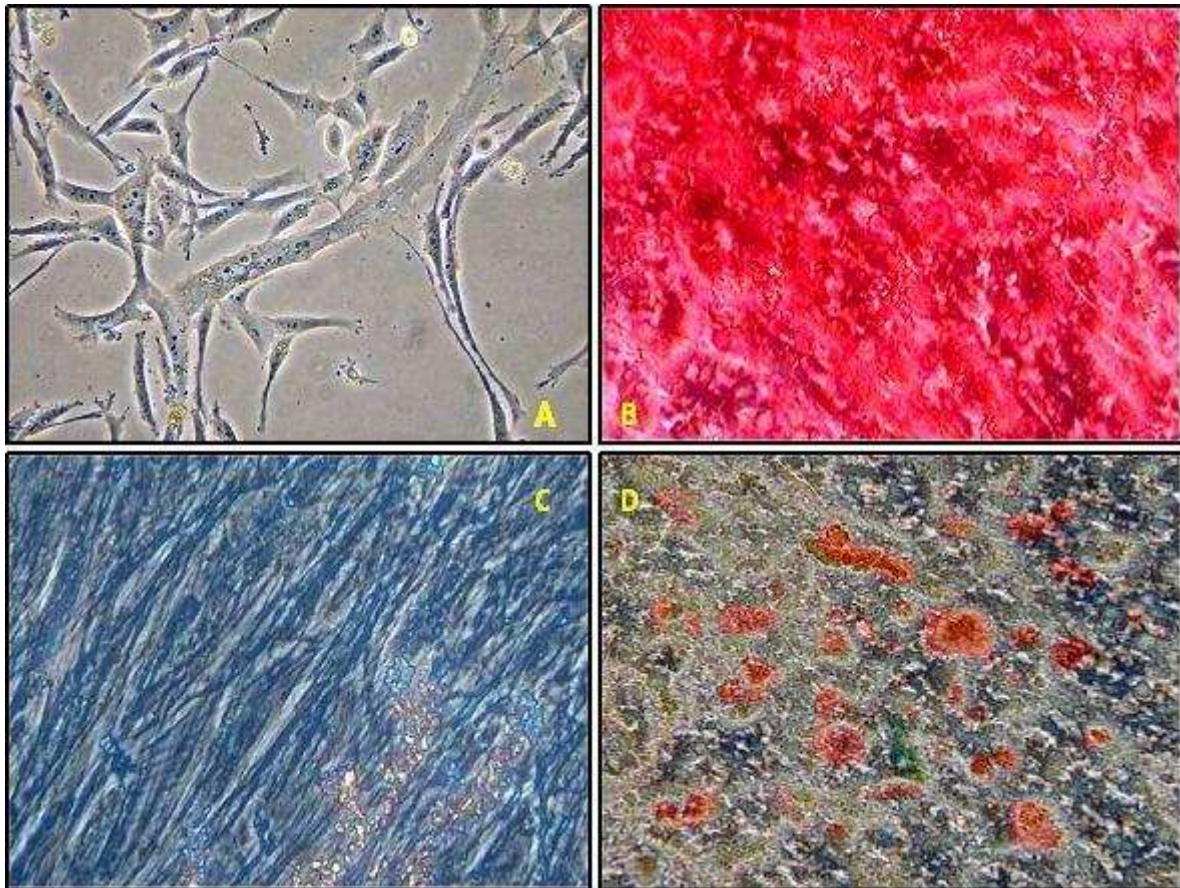


Figure 8 : Différenciation in vitro des CSM isolées et amplifiées à partir de MO humaine

Coloration chimique des molécules synthétisées par les CSM dans leur milieu d'induction. La photo A représente les CSM in vitro au second passage sans induction. La photo B représente la coloration rouge par l'alizarin Red S mettant en évidence la présence de dépôts calciques permettant de montrer le caractère ostéogénique des CSM différenciées. La photo C permet d'apprécier en bleu la présence des protéoglycanes et en rouge orangé la présence des glycosaminoglycanes ce qui permet de mettre en évidence le caractère chondrogénique des CSM différenciées. La photo D illustre le caractère adipogénique des CSM différenciées où les vésicules lipidiques sont colorées en rouge.

11.2. Phénotype des CSM cultivées à partir de MO humaine

Pour chaque lot de CSMhu en P2, la quantité de cellules hématopoïétiques et les pourcentages de cellules possédant les marqueurs SH2 et SH3 qui sont spécifiques des CSM ont été déterminés. La Figure 9 représente un exemple d'analyse par FACS d'un échantillon de CSM. Le Tableau V représente les pourcentages de cellules positives pour les marqueurs spécifiques des CSM et les cellules positives pour l'antigène CD45, qui est un marqueur des cellules hématopoïétiques.

Ces analyses par FACS ont permis de constater que les CSM humaines cultivées jusqu'au deuxième passage sont fortement positives pour les antigènes SH2 et SH3 respectivement en moyenne $37,3\% \pm 4,0$ et $72,9\% \pm 3,7$. Il est important de noter que le pourcentage de cellules possédant l'antigène CD45 est négligeable dans l'ensemble de notre population cellulaire isolée et amplifiée (CSMhu en P2). Les greffons réalisés au cours de cette étude ne sont quasiment pas contaminés par les cellules souches hématopoïétiques. En moyenne $43,1 \cdot 10^6 \pm 11,5 \cdot 10^6$ CSM humaines ont été isolées et amplifiées pour environ 23 ml de MO mis en culture. Au cours de cette étude les greffons contiennent de $2,5$ à $5,10^6$ CSMhu en P2, un échantillon de MO permet donc de greffer en moyenne de 8 à 10 animaux (tableau V).

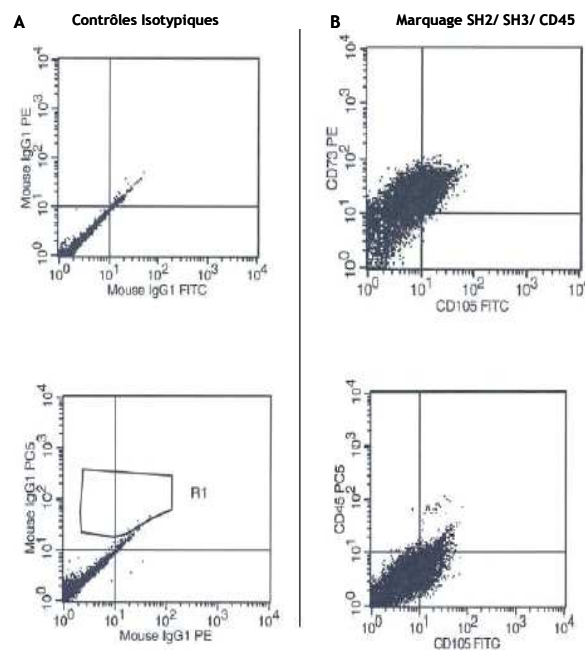


Figure 9 : Analyse par FACS d'un échantillon de CSM au second passage

Représentation graphique de l'analyse par FACS d'un échantillon de greffe (CSM en P2). (A) représentation des contrôles isotypiques. (B) représentation et détermination de la fréquence des cellules positives pour les marqueurs spécifiques des CSM SH2 (CD105) et SH3 (CD73) et CD45 (marqueur des cellules hématopoïétiques).

Tableau V: Pourcentage de cellules SH2+, SH3+ et CD45 + dans les CSM cultivées

N° de MO	Volume MO en ml	Nombre de CSM humaines en 10 ⁶ cellules	% de cellules SH3+	% de cellules SH2+	% de cellules CD 45 +
1	25.0	37.5	65.9	38.1	0.3
2	20.0	79.0	72.5	43.1	0.3
3	8.5	20.5	71.6	48.6	0.4
4	30.0	19.4	67.7	27.7	0.1
5	32.0	58.5	87.0	28.9	0.1
<i>Moyenne</i>	23.1	43.1	72.9	37.3	0.2
<i>SEM</i>	4.2	11.5	3.7	4.0	0.1

Paramètres de 5 échantillons de moelle osseuse (MO). Pour chaque échantillon de MO le nombre de CSM humaines au second passage et le pourcentage correspondant de cellules positives pour les antigènes SH3 (CD73), SH2 (CD105) et CD45. sont exprimés.

12. Mise en évidence des atteintes tissulaires radio-induites dans le modèle murin

NOD/SCID

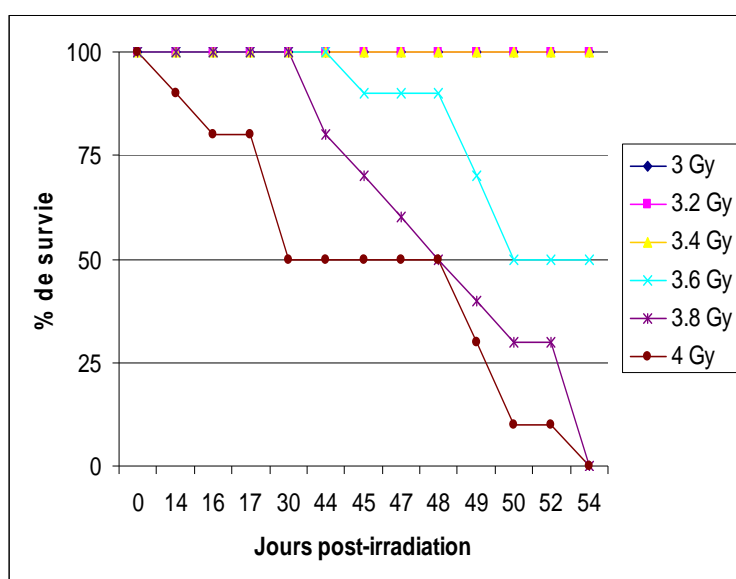
Le poids ainsi que la consommation hydrique et alimentaire ont été mesurées sur une période de 3 mois chez les animaux après une irradiation corps entier (ICE) ou après une irradiation de la sphère abdominale (IA). Aucune modification significative de la consommation hydrique et alimentaire n'a été observée. En revanche, dans ces 2 configurations d'irradiation, les animaux commencent à perdre significativement du poids 3 jours après exposition. Une reprise pondérale s'observe au cours de la troisième semaine. D'après ces premiers résultats physiologiques de base, les atteintes tissulaires ont été observées de 3 à 15 jours post-irradiation et ce par coloration trichromique HES et marquage des cellules apoptotiques et en prolifération sur coupes d'organes. Pour approfondir l'analyse des souffrances tissulaires, des dosages plasmatiques de l'urée, de la créatinine et des transaminases ont été réalisés.

12.1. Atteintes radio-induites après une ICE

12.1.1. Suivi du poids après ICE

Dans le but de déterminer une dose subléthale pour une ICE des souris NOD/SCID, une courbe de survie a été réalisée pour des doses de 3 à 4 Gy (Figure 10). Pour une ICE à 4 Gy, la DL_{50} est de 30 jours, pour une ICE de 3.8 Gy, la DL_{50} est de 48 jours et pour une ICE de 3.6 Gy la DL_{50} est de 50 Jours. Pour suivre l'évolution des animaux gréffés et l'implantation des CSM sur une période de plus de 2 mois il est donc nécessaire d'irradier en corps entier les souris NOD/SCID à une dose inférieure à 3.6 Gy. Pour suivre à long terme le devenir *in vivo* des CSM, nous avons au cours de cette étude réalisé toutes les ICE à 3.2 Gy.

Parallèlement le poids ainsi que la consommation hydrique et alimentaire des animaux ont été suivis 90 jours post-ICE. Au cours de cette période d'observation, aucune modification du comportement, ni de la prise alimentaire et hydrique n'a été observée. La Figure 11 illustre la variation de poids des animaux irradiés en corps entier à une dose de 3.2 Gy. La perte de poids post-ICE est maximale au cours de la deuxième semaine. Dès la troisième semaine post-irradiation, les souris reprennent du poids sans traitement. Pour étudier les atteintes tissulaires, les analyses doivent être réalisées entre J3 et J21 post-ICE. Les études des atteintes tissulaires après ICE ont été faites à J15 post-exposition.



Pour chaque dose d'irradiation un groupe de 10 souris NOD/SCID a été irradié en corps entier. Le pourcentage de survie est calculé par la soustraction du nombre de souris mortes au nombre de souris totales pour une dose d'irradiation.

Figure 10 : Courbe de survie des souris NOD/SCID après une ICE de 3 à 4Gy

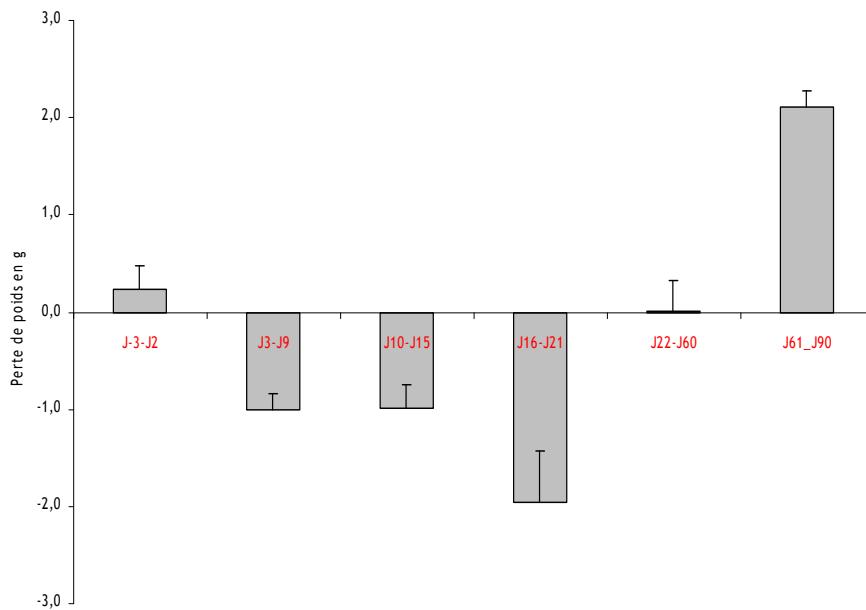


Figure 11 : Suivi du poids des souris NOD/SCID après une ICE à 3.2 Gy

Le poids des souris a été mesuré sur une période de 3 mois. La perte de poids est calculée à partir du poids à J0 (jours de l'irradiation). Il y a une perte significative de poids de J3 ($P < 0.01$) à J21 ($p < 0.01$).

12.1.2. Etude histologique des atteintes tissulaires après ICE

L'analyse histologique des différentes atteintes tissulaires radio-induites dans le cas d'une ICE à 3,2 G a été réalisée sur l'ensemble des organes prélevés (cœur, poumon, foie, rein, rate, estomac, intestin dans sa totalité, peau, muscle et fémur de la patte gauche postérieure ainsi que le cerveau). Les marquages trichromiques HES ont été effectués sur les tissus prélevés de j3 à j15 post-ICE. L'étude anatomopathologique à J15 a permis de mettre en évidence une déplétion cellulaire au niveau de la rate (Figure 12B), ainsi qu'une hémorragie et une déplétion cellulaire au niveau de la moelle osseuse de l'ensemble des animaux irradiés (Figure 12D). L'analyse histologique réalisée sur les différentes parties de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, caecum, côlon proximal et distal) de J3 à J15 post-ICE a révélé que l'intestin conserve son intégrité tissulaire dans les temps précoces après irradiation corps entier. En effet, nous n'avons pas observé de foyers inflammatoires, ni de prolifération cellulaire. De plus la taille des villosités intestinales n'a pas variée. Aucune

souffrance tissulaire ni modification structurale n'ont été observées dans les autres organes étudiés.

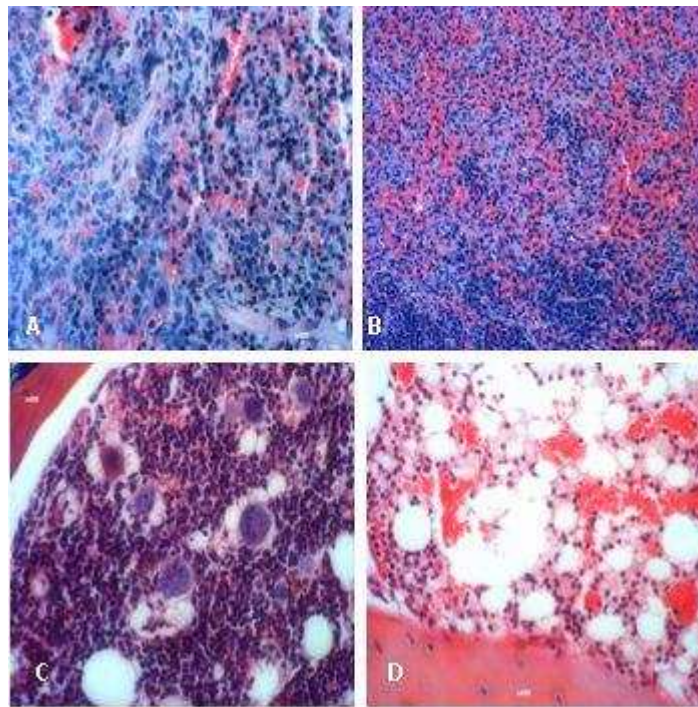


Figure 12 : Marquages trichromiques HES de la rate et de la moelle osseuse après irradiation corps entiers. *Observation microscopique de la coloration trichromique HES sur coupes de 5 μ m de la rate et de la Moelle osseuse. (A) : rate non irradiée ; (B) rate prélevée 15 jours post ICE à 3.2 Gy (C) : Moelle osseuse non irradiée (D), moelle osseuse 15 jours-post ICE à 3.2 Gy.*

12.1.3. Dosage plasmatique de l'urée, de la créatinine et des transaminases après ICE

Pour approfondir l'étude des atteintes radio-induites après une ICE, les taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques ont été mesurés de façon à mettre en évidence d'éventuelles atteintes rénales et/ou hépatiques radio-induites. Dans un premier temps, les animaux ont été prélevés au niveau des sinus rétro-orbitaux. Du fait de la petite quantité de plasma obtenu, le taux d'urée plasmatique a uniquement été mesuré et ce sur une période 30 jours pour mettre en évidence les temps auxquels il semble intéressant d'approfondir l'analyse biochimique. La cinétique du taux d'urée plasmatique réalisée dans le cas d'une ICE a permis d'observer une diminution significative de ce taux entre J7

($p < 0,05$) et J15 ($p < 0,01$) après exposition (Figure 13A). Au cours de cette étude, les animaux ne modifiant pas leur consommation hydrique et alimentaire, cette diminution du taux d'urée plasmatique pourrait être le reflet d'une souffrance hépatique. Pour étudier cette hypothèse, les taux d'urée, de créatinine et de transaminases (ASAT/ALAT) plasmatiques ont été dosés à 7 jours post-exposition. A une semaine post-ICE, on a observé une diminution significative du taux d'urée d'un facteur 1,3 ($p < 0,01$), (Figure 13B), aucune variation significative du taux de créatinine (Figure 13C), une augmentation d'un facteur 2,7 ($p < 0,01$) du taux d'ASAT et d'un facteur 2,5 ($p < 0,01$) du taux d'ALAT (Figures 13C et 13D). L'ASAT est une enzyme retrouvée à des concentrations élevées dans les cellules du foie, du myocarde, des cellules musculaires, du rein, du pancréas et dans les globules rouges. L'ALAT étant localisée uniquement dans le cytosol des hépatocytes, la forte élévation de sa concentration sérique est relativement spécifique d'une cytololyse hépatique (Pappas *et al* 1989). L'augmentation du taux des transaminases plasmatiques confirme une souffrance hépatique radio-induite décelable 7 jours post-ICE à 3,2 Gy. Chez les souris NOD/SCID non irradiées (Témoin), le rapport ASAT/ALAT est de $3,0 \pm 0,2$. Une semaine après exposition, celui-ci ne varie pas ($3,3 \pm 0,3$). Il n'y a pas d'augmentation isolée de l'ASAT. L'élévation des transaminases plasmatiques semble avoir une origine hépatique.

Il faut noter que d'après la cinétique du taux d'urée (Figure 13A) et la courbe de variation du poids après une ICE à 3.2 Gy (Figure 11), une reprise naturelle et générale de l'organisme a lieu 3 semaines après l'exposition aux RI. C'est donc au cours de cette période qu'il est intéressant d'observer à la fois le bénéfice d'une greffe de CSM et leur biodistribution dans les tissus irradiés après une exposition du corps entier à une dose sublétales.

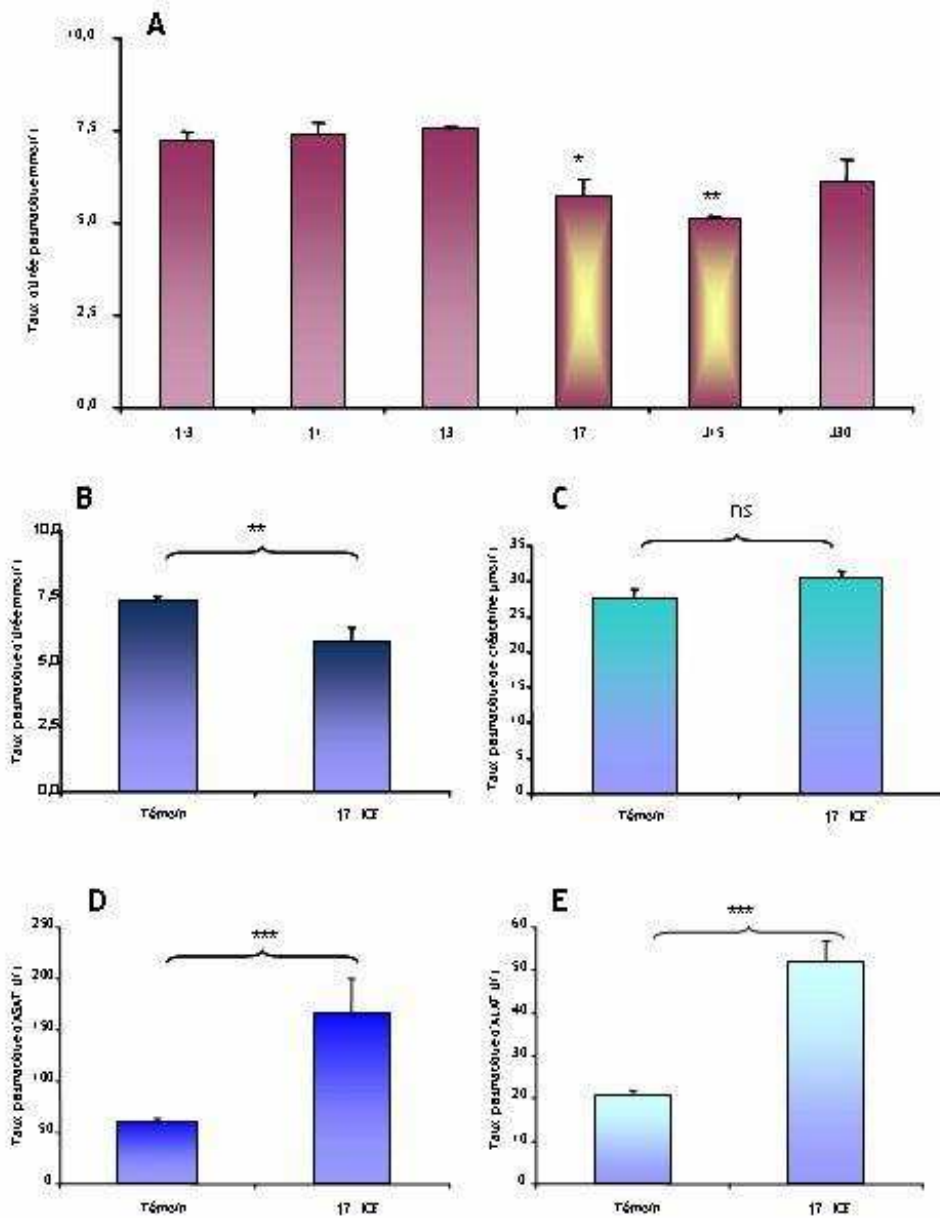


Figure 13 : Effet d'une irradiation corps entier sur les taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques Les dosages biochimiques de l'urée, de la créatinine et des transaminases ont été effectués sur 200 µl de plasma prélevé sur des souris NOD/SCID irradiées corps entier à 3.2 Gy. L'histogramme A représente le taux d'urée plasmatique de J-3 à J30 post-ICE. L'histogramme B compare le taux témoin d'urée au taux d'urée plasmatique 7 jours post-ICE. L'histogramme C compare le taux témoin de créatinine au taux de créatinine plasmatique 7 jours post-ICE. L'histogramme D compare le taux témoin d'ASAT au taux d'ASAT plasmatique 7 jours post-ICE. L'histogramme E compare le taux témoin d'ALAT au taux d'ALAT plasmatique 7 jours post-ICE. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns (pas de différence significative)

12.2. Atteintes radio-induites après une IA

12.2.1. Suivi du poids après une IA

D'après la courbe de la variation de poids des souris NOD/SCID après une IA à 8 Gy, il est possible de constater que la perte de poids est significative dès 72 heures (J3) post-IA. Au cours de la seconde semaine, on observe que plus de 40% des animaux perdent plus de 10% de leur poids. Il semble que cette période soit une phase critique où la mortalité monte à 20%. Les animaux qui sont décédés après irradiation ont perdu plus de 15% de leur poids initial ($21,8 \pm 0,8$ g). Dès la troisième semaine post-irradiation, les animaux reprennent du poids sans traitement. Pour étudier les atteintes tissulaires, il semble donc intéressant de se placer entre J3 et J19 post IA. L'observation des atteintes tissulaires après une IA a été effectuée entre J3 et J15 post-exposition. La Figure 14 représente la variation de poids des animaux ayant reçu une dose de 8 Gy au niveau de l'abdomen.

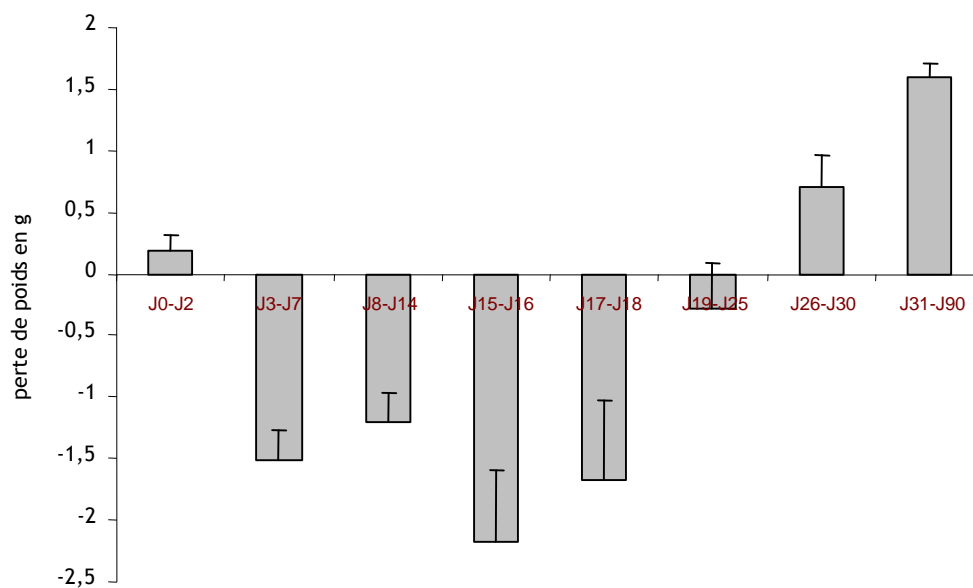


Figure 14 : Suivi du poids des souris NOD/SCID après une IA de 8 Gy. Le poids des souris NOD/SCID a été mesuré en gramme sur une période de 90 jours post-IA à 8 Gy. La perte de poids est calculée à partir de J0 (jours de l'irradiation). Il y a une perte significative de poids des souris entre J3 ($p < 0,001$) et J18 ($p < 0,01$).

12.2.2. Etude histologique des atteintes tissulaires après une IA

Pour mettre en évidence les atteintes tissulaires radio-induites dans le cas d'une IA à 8 Gy, des marquages trichromiques HES ont été réalisés sur l'ensemble des organes prélevés. Les marquages ont été effectués sur les tissus prélevés de j3 à j15 post-IA. L'étude histologique a permis de mettre en évidence une déplétion cellulaire au niveau de la rate de l'ensemble des animaux irradiés comme dans le cas d'une ICE à 15 jours post-IA. Les colorations HES sur les différentes parties de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, caecum, côlon proximal et distal) de J3 à J15 post-ICE ont permis d'observer des modifications structurales dès J3 post-IA au niveau du jéjunum de tous les animaux irradiés selon cette configuration d'exposition aux RI. La taille des villosités intestinales ainsi que la mort cellulaire par apoptose et la prolifération cellulaire ont été observées. Aucune souffrance tissulaire ni modification structurale n'ont été observées dans les autres organes étudiés histologiquement.

12.2.2.1. Mesure de la taille des villosités intestinales

Sans irradiation, la taille moyenne des villosités dans le jéjunum est de $230,3 \pm 5,3 \mu\text{m}$. Après IA, la taille moyenne des villosités varie (Figure 15B et 15C). A J3 post-IA, on observe un épaissement de la sous-couche musculaire ainsi que l'apparition de sténoses qui sont signes d'inflammation (Figure 15B). La taille des villosités intestinales a été mesurée sur tous les jéjunums prélevés à J3 et J15 post-IA (Figure 15D). L'irradiation localisée au niveau de l'abdomen a entraîné une diminution significative d'un facteur 1,2 ($p < 0,01$) de la taille des villosités intestinales. A 15 jours post-IA, la taille des villosités intestinales a augmenté significativement d'un facteur 1,5 ($p < 0,001$). L'augmentation de la taille des villosités intestinales pourrait être liée à une augmentation de la prolifération cellulaire qui fait partie de la réponse intestinale aux RI (Potten et al 2004).

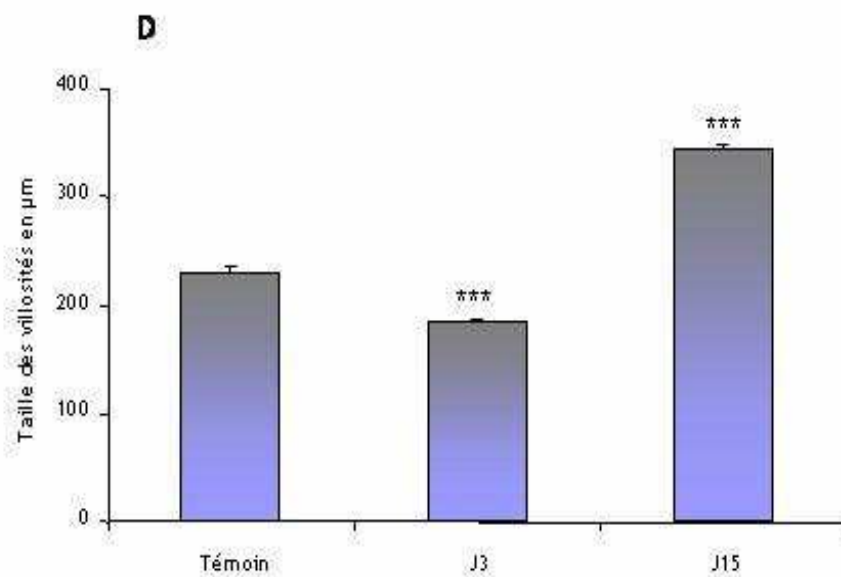
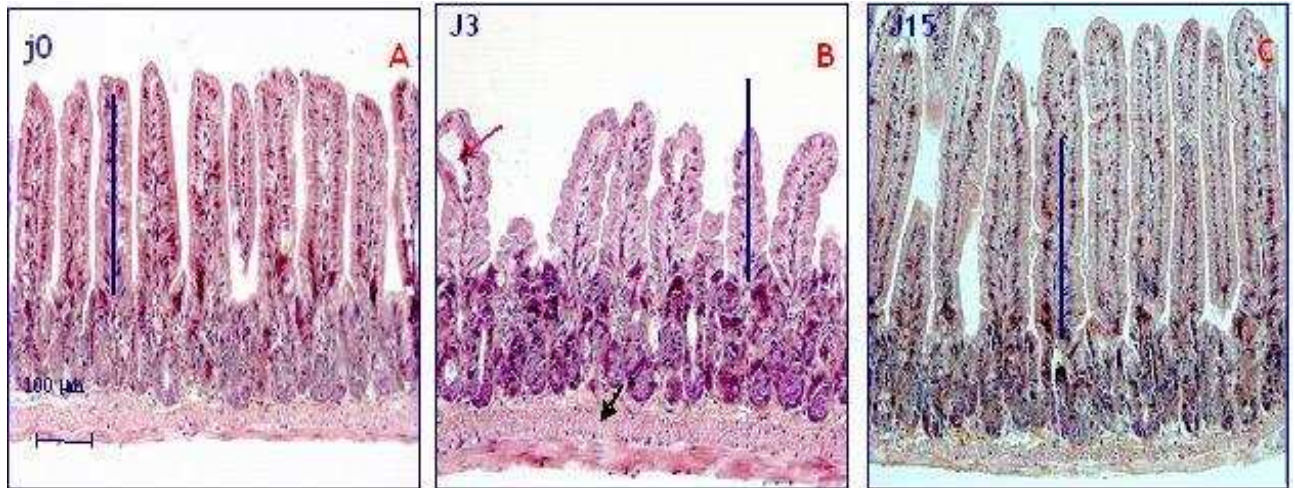


Figure 15: Effet d'une irradiation abdominale sur la taille des villosités du jéjunum

Les photographies A, B, C représentent respectivement une coloration trichromique de jéjunum témoin, à 3 jours post-IA et à 15 jours post-IA. En B il ya une flèche rouge mettant en évidence une sténose et une flèche noire mettant en évidence l'épaississement de la sous couche musculaire. L'histogramme D représente la taille des villosités dans les jéjunums en fonction du temps post-irradiation abdominale (IA). La taille des villosités intestinales est mesurée en µm. Les tailles des villosités à J3 et J15 sont comparées à la taille des villosités témoins par un t-test, $p < 0.001$ (***)

12.2.2.2. Quantification de l'apoptose et de la prolifération cellulaire intestinale

Après irradiation, les cellules lésées meurent précocement par apoptose. Pour déterminer si l'intestin irradié se trouve dans un état de déplétion cellulaire, la quantification du nombre de cellules apoptotiques et du nombre de cellules en prolifération dans les cryptes

a été réalisée sur des coupes de jéjunums prélevés à J3 et J15 post-IA. La quantification de l'apoptose a été réalisée par un marquage immunohistochimique TUNEL (Figure 16 A et 16B). Le plus grand nombre de cellules apoptotiques intestinales est observé à J3 au niveau des cryptes. L'IA a entraînée une augmentation significative de la mort cellulaire par apoptose d'un facteur 9,6 ($p < 0,01$). A 15 jours post-IA, le taux de cellules mortes par apoptose est comparable au taux témoin qui est de $0,52 \pm 0,07$ cellules apoptotiques par crypte (Figure 16C). Le nombre de cellules murines proliférantes a été déterminé dans le jéjunum à 3 et 15 jours post-IA par marquage immunohistologique de la protéine Ki67 (Figure 17A et 17B). L'irradiation localisée au niveau de l'abdomen a entraîné une augmentation significative du nombre de cellules en prolifération. Le taux de cellules murines proliférantes a augmenté d'un facteur 2,8 ($p < 0,001$) trois jours après exposition. Le nombre de cellules proliférantes semble diminuer avec le temps. A J15 la quantité de cellules murines en prolifération est augmentée d'un facteur 1,4 ($p < 0,001$). dans le jéjunum des animaux irradiés (Figure 17C).

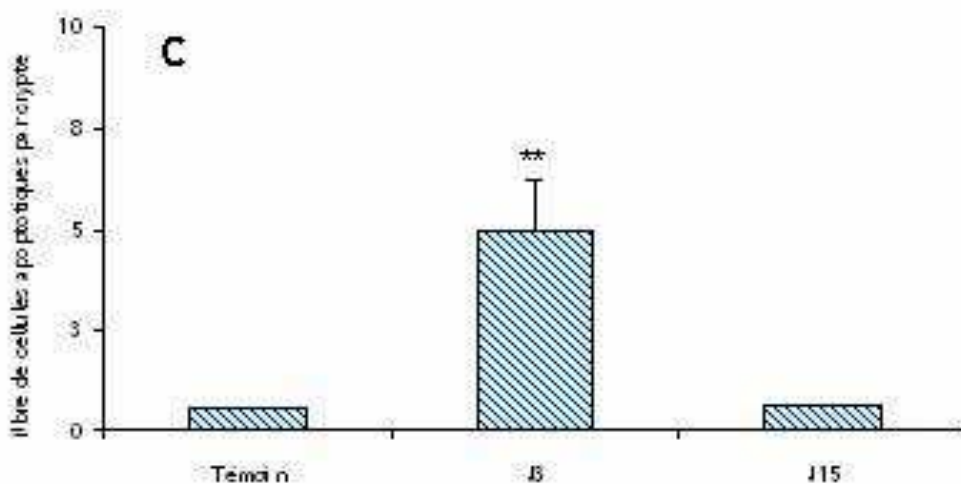
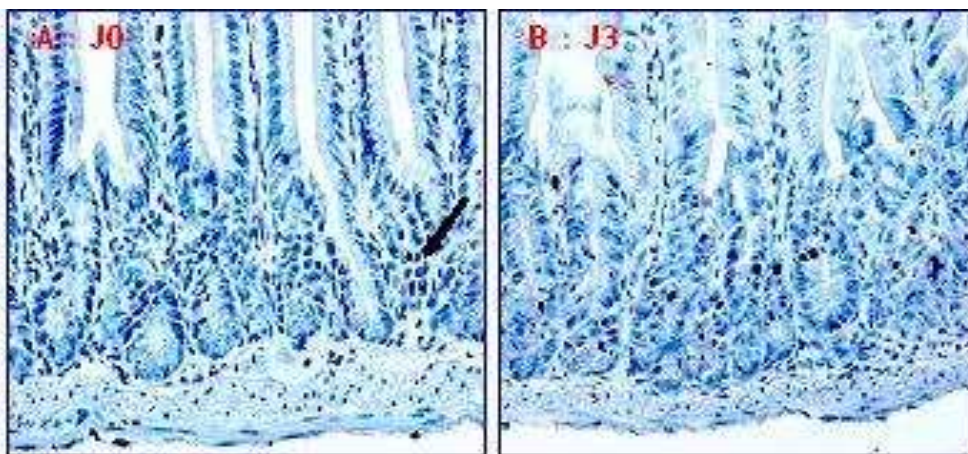


Figure 16 : Marquage immunohistologique (TUNEL) et quantification des cellules apoptotiques.

Les photographies A et B représentent le Marquage TUNEL sur des jéjunums qui correspondent respectivement aux temps J0 et J13 post-IA, la flèche noire localise les cellules apoptotiques dans les cryptes. L'histogramme C représente le nombre de cellules en apoptose dans un jéjunum témoin, à J3 et J15 post-IA à 8Gy. Le nombre de cellules en apoptose dans les jéjunums témoins a été comparé au nombre de cellules apoptotiques dans les jéjunums prélevés à J3 et J15 par un t-test. $p < 0,001$ (***)

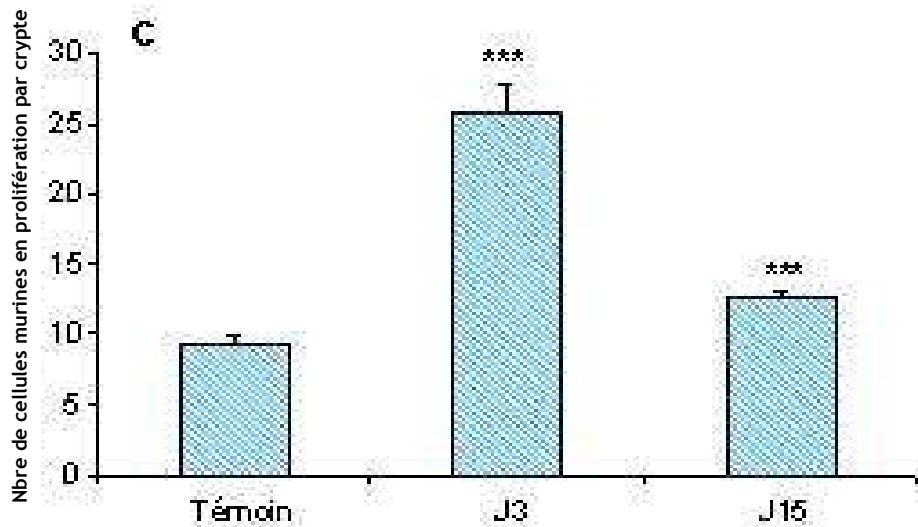
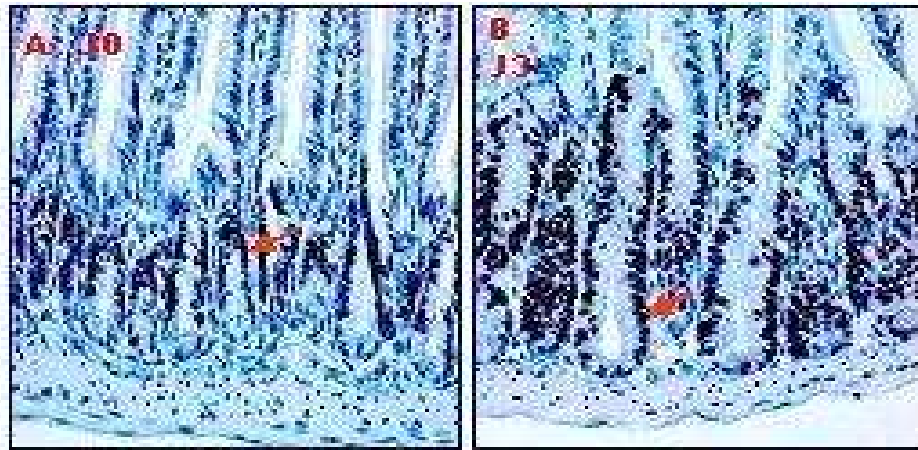


Figure 17 : Marquage immunohistologique de la protéine Ki67 murine et quantification des cellules proliférantes. Les photographies A et B représentent le marquage immunohistochemique Ki 67 murin réalisé sur les jéjunums prélevés à J3 et J15 post_IA, les flèches rouges localisent les cellules proliférantes dans les cryptes. L'histohramme C représente le nombre de cellules en prolifération dans un jéjunum témoin, à J3 et J15 post-ICE IA à 8 Gy. Le nombre de cellules en prolifération dans les jéjunums témoins a été comparé au nombre de cellules proliférantes dans les jéjunums prélevés à J3 et J15 par un test-t. $p < 0,001$ (***)

12.2.3. Dosage plasmatique de l'urée, de la créatinine et des transaminases après une IA

Pour approfondir l'étude des atteintes radio-induites après une IA les taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques ont été dosés de façon à mettre en évidence d'éventuelles atteintes rénales et/ou hépatiques radio-induites. Dans un premier temps les animaux ont été prélevés au niveau des sinus rétro-orbitaux comme pour le cas de l'ICE et le taux d'urée plasmatique a été mesuré sur une période de 30 jours pour déterminer les

temps auxquels il est possible de détecter des variations biochimiques du sang. La cinétique du taux d'urée plasmatique réalisée dans le cas d'une IA a permis d'observer une diminution significative de ce taux 72 heures (J3) après exposition (Figure 18A). Bien que les animaux ne modifient pas leur consommation hydrique et alimentaire, cette diminution du taux d'urée plasmatique pourrait refléter une diminution de l'activité hépatique comme pour l'ICE, mais de façon plus précoce. Les taux d'urée, de créatinine et de transaminases (ASAT/ALAT) plasmatiques ont donc été dosés à J3. A ce temps il a été observé une diminution significative du taux d'urée d'un facteur 1,7 ($p < 0,01$) (Figure 18B), aucune variation significative du taux de créatinine (Figure 18C), une augmentation d'un facteur 1,8 ($p < 0,001$) de taux d'ASAT et aucune variation du taux d'ALAT (Figures 18C et 18D). A J3 post-IA, le rapport des transaminases est de $5,6 \pm 0,2$. Le rapport ASAT/ALAT est 2 fois plus élevé ($p < 0,001$) que le rapport témoin. L'augmentation isolée et prédominante du taux d'ASAT plasmatique pourrait refléter une souffrance extra-hépatique radio induite. La cinétique du taux d'urée (Figure 18A) et la courbe de variation du poids après une IA à 8 Gy (Figure 14), suggère une reprise naturelle et générale de l'organisme 3 semaines après l'exposition aux RI.

C'est au cours des 15 premiers jours après IA qu'il sera intéressant d'observer à la fois le bénéfice d'une greffe de CSM et leur biodistribution dans les tissus après exposition.

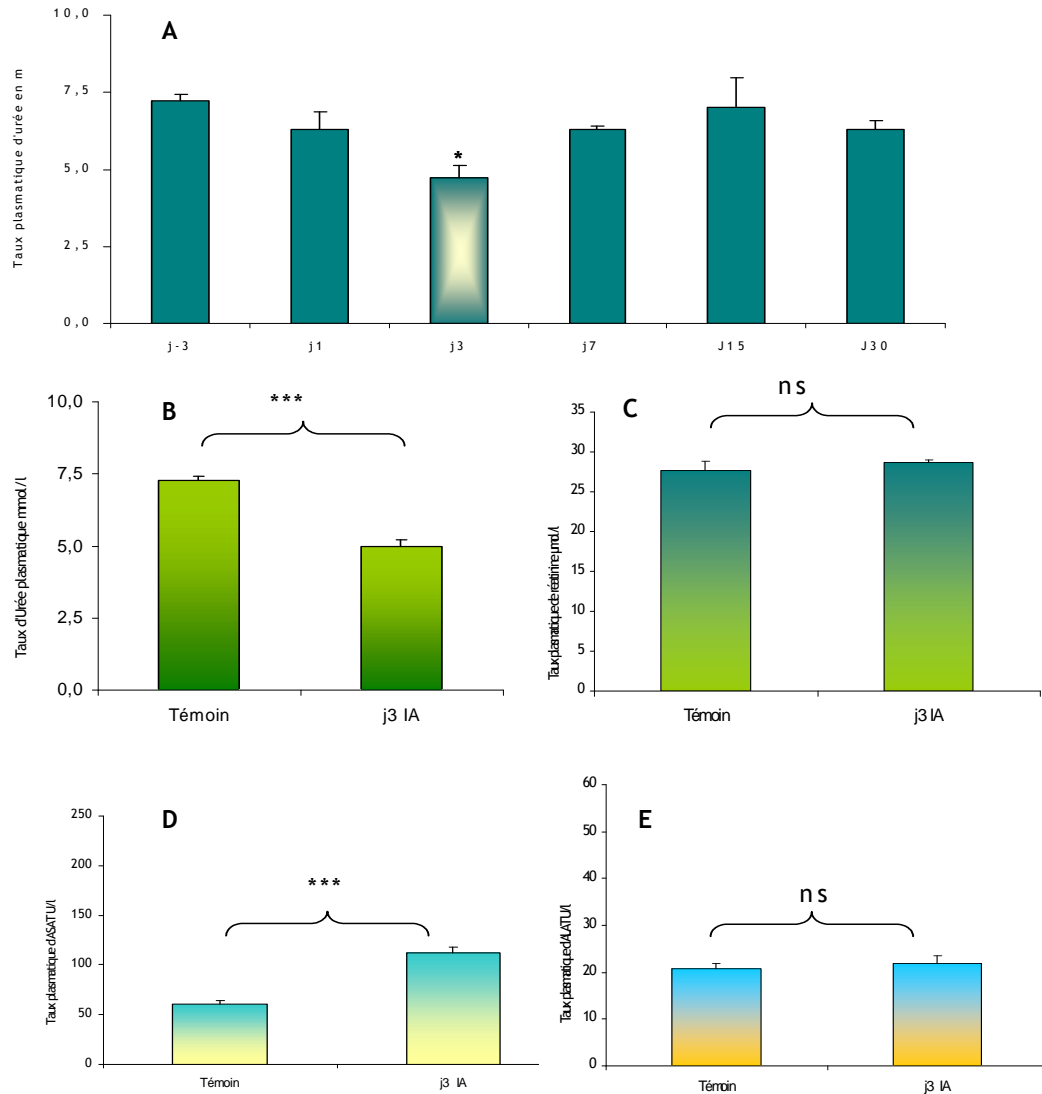


Figure 18 : Effet d'une irradiation abdominale sur le taux d'urée, de créatinine et des transaminases plasmatiques. Les dosages biochimiques de l'urée, de la créatinine et des transaminases ont été effectués sur 200 μ l de plasma prélevé sur des souris NOD/SCID irradiées au niveau de l'abdomen à 8 Gy. L'histogramme A représente le taux d'urée plasmatique de J-3 à J30 post-IA. L'histogramme B compare le taux témoin d'urée au taux d'urée plasmatique 7 jours post-IA. L'histogramme C compare le taux témoin de créatinine au taux de créatinine plasmatique 7 jours post-IA. L'histogramme D compare le taux témoin d'ASAT au taux d'ASAT plasmatique 7 jours post-IA. L'histogramme E compare le taux témoin d'ALAT au taux d'ALAT plasmatique 7 jours post-IA. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns (pas de différence significative).

12.3. Etude de l'évolution des lésions de la patte irradiée après une irradiation de la patte droite postérieure (IP)

Observations macroscopiques des lésions après une IP

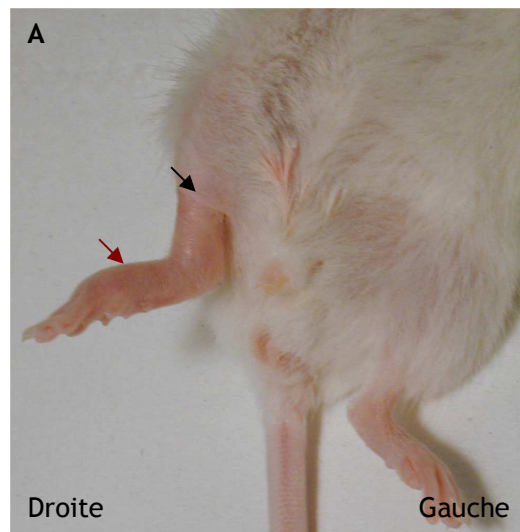
L'étude de l'effet dose sur les lésions induites par des irradiations aiguës localisées au niveau de la patte droite postérieure a été réalisée sur une période de 6 semaines. Cet interval de temps regroupe le temps d'apparition des lésions et leur cicatrisation. Six

semaines après une IP de 15 Gy, au niveau de la patte irradiée, il y a apparition d'une desquamation intermédiaire entre humide et sèche sur une longueur de 1,5 mm. L'appréciation de la fonte musculaire révèle une légère perte de la masse musculaire de la patte irradiée. La repousse de poil de la patte exposée apparaît comparable à la patte témoin. L'augmentation de la dose à 25 Gy entraîne l'apparition d'atteintes plus importantes (Figure 19). Quinze jours après une IP à 25 Gy les animaux ont développé une nécrose (Figure 19C) et une desquamation humide (Figure 19B) au niveau de la zone irradiée dont l'étendue varie entre les différentes souris. L'atteinte la plus communément observée est un œdème au niveau de l'extrémité de la patte irradiée (Figure 20C). La Figure 19A met en évidence le fait que l'irradiation à 25 GY a entraîné une perte importante de l'élasticité de la patte et une diminution de la repousse du poil. A cette dose la perte de l'élasticité s'observe 5 jours post-IP et s'accroît tout au long de l'expérience. A six semaines post-IP, la patte irradiée est rétractée avec une perte d'élasticité de 70%.

12.3.1. Observations microscopiques de la peau des pattes irradiées

Les peaux des pattes irradiées ont été prélevées 6 semaines après IP à 15, 20 et 25 GY. Ces tissus ont été fixés et un marquage trichromique HES a été réalisé pour observer les modifications structurales radio-induites (Figure 20). Six semaines après une IP à 15 Gy, on observe une augmentation de l'épaisseur du derme (Figure 20B) et après une IP à 25 Gy, il y a en plus une condensation de l'épiderme (Figure 20C). De plus, La comparaison histologique des peaux entre les différentes doses d'IP et la peau témoin suggère que l'augmentation de la dose d'irradiation entraîne une augmentation de la taille des follicules pileux (Figure 20B et 20C).

Face ventrale



Face externe patte droite

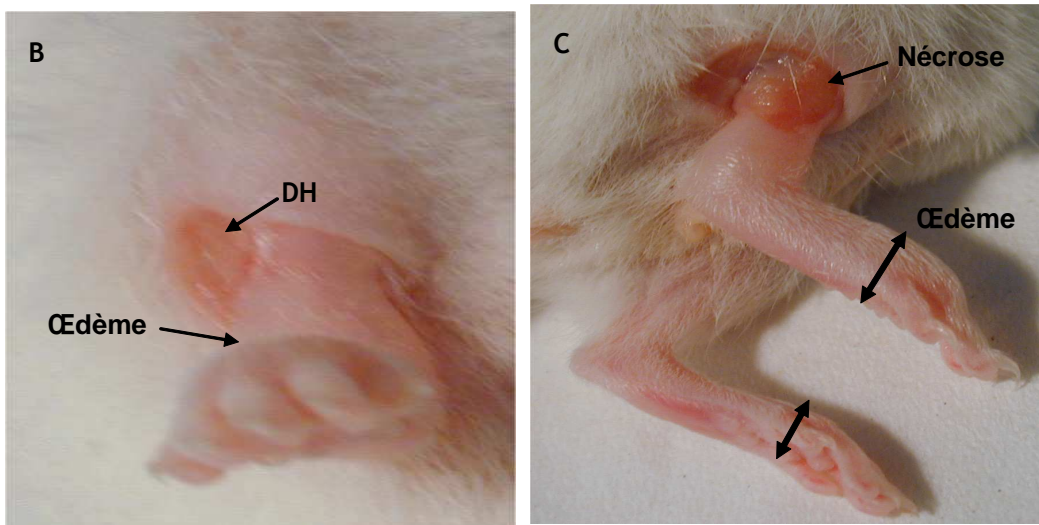


Figure 19 : Evaluations macroscopiques des lésions de la patte droite postérieure irradiée à 25 Gy. Observation macroscopique des lésions six semaines après une irradiation localisée de la patte droite postérieure à une dose de 25 Gy. Photo A : Vue ventrale de l'animal, observation de la rétraction de la patte irradiée (flèche noire), faible repousse de poils et œdème à l'extrémité de la patte droite (flèche rouge). Photo B : Vue face externe de la patte irradiée, observation d'œdème et d'une desquamation humide (DH). Photo C : Vue face externe de la patte irradiée, observation de nécrose et d'œdème.

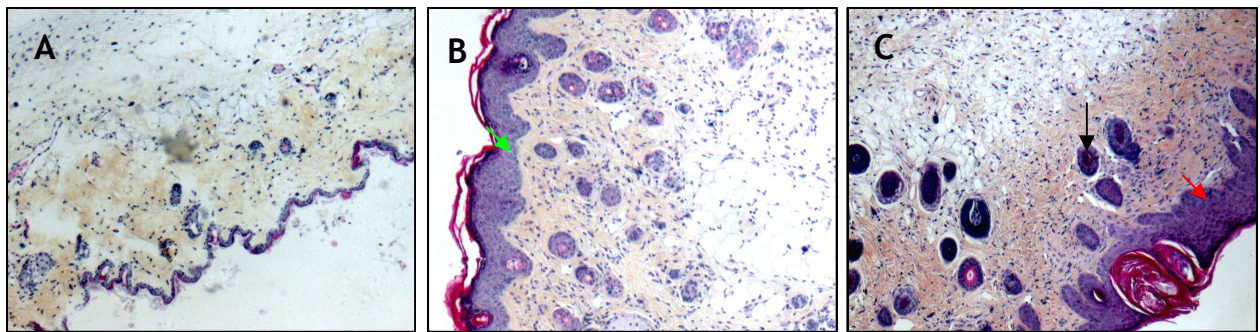


Figure 20 : Marquages trichromiques HES des peaux des pattes postérieures 6 semaines post-IP. Observation microscopique après marquage trichromique HES de peaux de pattes irradiées prélevées six semaines après une irradiation localisée de la patte droite postérieure. Photo A: Peau patte témoin (non-irradiée). Photo B: Peau patte après IP 15 Gy, la flèche verte indique l'épaississement de l'épiderme. Photo C: Peau patte après IP 25 Gy : la flèche rouge localise et indique l'épaississement du derme. La flèche noire localise un follicule pileux.

13. Etude de la biodistribution des CSM dans les tissus irradiés

Les CSM humaines en P2 sont injectées 24 heures après irradiation par voie intraveineuse à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par souris NOD/SCID dans le cas d'une ICE et d'une IA. Dans le cas de ces 2 configurations d'irradiation, l'implantation des cellules humaines injectées a été étudiée de J3 à J120 post-irradiation. Dans le cas d'une IP, les CSM ont été injectées à une concentration de $2.5 \cdot 10^6$ par animaux et leur implantation a été étudiée à 6 semaines post-exposition pour des doses totales de 15 à 25 Gy. La présence d'ADN humain au sein des tissus murins irradiés a été déterminée par amplification du gène de la β -Globine humaine par PCR. La biodistribution des CSM a tout d'abord été réalisée qualitativement de façon à déterminer le ou les temps auxquels il y a un grand nombre d'organes murins possédant de l'ADN humain. Pour chaque organe étudié, les résultats sont exprimés par le rapport du nombre d'animaux positifs pour la présence de CSM sur le nombre d'animaux total analysé. Le taux d'implantation des cellules humaines a été quantifié au temps ou à la dose où il y avait le plus grand nombre d'organes colonisés par les CSM injectées. Les résultats sont exprimés en pourcentages représentant le rapport de la quantité d'ADN humain sur la quantité d'ADN murin total.

13.1. Etude de la biodistribution des CSM après une ICE à 3,2Gy

Les Tableaux VI et VII représentent respectivement la biodistribution des cellules humaines à des temps précoces de J3 à J15 post-ICE et à des temps plus tardifs de J30 à J120 post-ICE. La cinétique d'implantation des CSM humaine réalisée de J3 à J120 suggère que J15 est le temps auquel il y a le plus grand nombre d'organes colonisés par les CSM injectées. L'étude quantitative de l'implantation a été réalisée à J15, les résultats sont exprimés en pourcentage représentant le rapport de la quantité d'ADN humain sur la quantité d'ADN murin total (Figure 21 et 22).

13.1.1. Cinétique d'implantation des CSM de J3 à J120

13.1.1.1. Implantation précoce des CSM après une ICE

De l'ADN humain est détectable 24 heures après injection des cellules humaines (J3 post-ICE), dans un grand nombre d'organes. Le nombre total d'organes possédant le gène de la β -Globine humaine est de 14% à J3, 28% à J7 et de 47% à J15 (Tableau VI). L'implantation des cellules humaines semble augmenter en fonction du temps entre J3 et J15. Aux temps précoces (de J3 à J15), le pourcentage de souris NOD/SCID possédant de l'ADN humain dans, le cœur, les poumons et l'estomac est respectivement de 81%, 79% et 56%. L'implantation précoce des CSM suggère une migration préférentielle de ces cellules souches vers ces organes. En revanche, 23% des animaux analysés possèdent de l'ADN humain dans leur moelle osseuse. Les CSM humaines en P2 qui ont été isolées à partir de MO ne semblent pas coloniser préférentiellement leur tissu d'origine. Seul 4% des souris analysées sont positives en PCR pour le sang, suggérant une faible circulation des cellules humaines. Dans l'intestin, le pourcentage de souris NOD/SCID possédant de l'ADN humain dans le duodénum, jéjunum et les côlons sont respectivement de 48%, 14% et 11%. Le gène de la β -globine humaine n'a pas été détecté dans les 28 iléons analysés. Le duodénum semble être la partie de l'intestin la plus colonisée par les CSM. Très peu de souris possèdent de l'ADN humain dans les peaux et les fémurs des pattes postérieures analysés

respectivement 11% et 12%. En revanche, 43% des souris analysés sont positives en PCR pour les quadriceps, suggérant une implantation des CSM dans le muscle. Bien que le cerveau, le foie et les reins soient des tissus à renouvellement cellulaire lent, le gène de la β -globine humaine a été détecté dans ces organes. Aux temps précoces après ICE, le pourcentage de souris possédant de l'ADN humain dans le foie, le cerveau et les reins est respectivement de 36%, 21% et 14%. La rate et la moelle osseuse sont les 2 organes hématopoïétiques de la souris qui ont été prélevés. Aux temps précoces les CSM en P2 qui ont été injectées semblent préférentiellement coloniser la rate par rapport à la MO. Sur les 26 rates et Mo analysées, il y a respectivement 11 et 6 de ces tissus possédant de l'ADN humain.

A 15 jours post-ICE, dans tous les types de tissus prélevés à l'exception du côlon distal et de l'iléon, de l'ADN humain a été détecté. C'est le temps précoce où la biodistribution des CSM injectées est la plus large. Le nombre de sites colonisés, ainsi que le nombre d'organes positifs analysés par type tissulaire est le plus important à J15 par rapport à J3 et J7.

Tableau VI : Pourcentage de souris positives pour la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J3 à J15 post-irradiation

Jours post-irradiation	J3	J7	J15	Frequence souris +/- tissu
Muscle abdominal	2/10 (20%)	5/10 (50%)	2/6 (33%)	9/26 (35%)
Cœur	8/10 (80%)	6/8 (75%)	7/8 (88%)	21/26 (81%)
Poumon	4/10 (40%)	10/10 (100%)	8/8 (100%)	22/28 (79%)
Foie	2/10 (20%)	0/10 (0%)	8/8 (100%)	10/28 (36%)
Rein	0/10 (0%)	0/10 (0%)	4/8 (50%)	4/28 (14%)
Rate	0/10 (0%)	6/8 (75%)	5/8 (63%)	11/26 (42%)
Estomac	4/10 (40%)	6/8 (75%)	4/7 (57%)	14/25 (56%)
Duodénum	2/10 (20%)	5/10 (50%)	2/6 (33%)	12/26 (46%)
Jéjunum	2/10 (20%)	0/10 (0%)	2/8 (25%)	4/28 (14%)
Ileon	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/8 (0%)	0/28 (0%)
Caecum	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	3/28 (11%)
Côlon proximal	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	3/28 (11%)
Côlon Distal	2/10 (20%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	4/26 (15%)
Cerveau	0/10 (0%)	0/10 (0%)	6/8 (75%)	6/28 (21%)
Peau patte postérieure	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	3/28 (11%)
Quadriceps	0/10 (0%)	5/10 (50%)	7/8 (88%)	12/28 (43%)
Fémur (sans MO)	0/10 (0%)	2/8 (25%)	1/8 (12.5%)	3/26 (12%)
Moelle osseuse	0/10 (0%)	1/8 (12.5%)	5/8 (63%)	6/26 (23%)
Sang	0/10 (0%)	0/10 (0%)	1/8 (12.5%)	1/28 (4%)
Frequence souris +/- jour post-irradiation	26/190 (14%)	48/178 (28%)	71/151 (47%)	

Les organes sont collectés aux temps post-irradiation J3, J7, J15. Les CSM ont été injectées 24 heures après l'ICE à 3.2 Gy. L'ADN a été extrait à partir des organes et analysés pour la présence du gène de la β -globine humaine par PCR. Les résultats représentent le nombre de souris positives pour la présence d'ADN humain par rapport au nombre total de souris analysées.

13.1.1.2. Distribution à long terme des CSM après une ICE

De l'ADN humain est détectable au moins jusqu'à 120 jours après injection des cellules humaines, dans un nombre d'organes moins important à J15. Le pourcentage d'animaux possédant le gène de la β -Globine humaine est de 34% à J30, 27% à J60 et de 18% à J90 et J120 (Tableau VII). L'implantation des cellules humaines semble diminuer en fonction du

temps entre J30 et J90. A plus long terme (de J30 à J120), le pourcentage de souris NOD/SCID irradiées possédant de l'ADN humain dans les poumons et le cœur est respectivement de 54% et 50%. Ces pourcentages sont plus faibles qu'aux temps précoces. Les CSM colonisent préférentiellement ces organes également à long terme. En revanche, 13% des souris analysées en PCR ont de l'ADN humain dans leur moelle osseuse. Les CSM humaines en P2 qui ont été isolées à partir de MO ne semblent pas coloniser préférentiellement la moelle osseuse murine à plus long terme. Le pourcentage d'animaux ayant le gène de la β -Globine humaine dans le sang est de 57%, suggérant une recirculation des cellules humaines après leurs implantations dans les organes. Dans l'intestin, le pourcentage d'animaux positif en PCR pour le gène de la β -Globine humaine pour le caecum, le côlon proximal, le jéjunum et le colon distal est respectivement de 23%, 24%, 13% et 11%. Le gène de la β -globine humaine n'a pas été détecté dans les 30 iléons et 29 duodénus analysés. A des temps plus longs, le duodénum n'est plus la partie la plus colonisée de l'intestin par les CSM. Bien que l'intestin soit un tissu à renouvellement rapide, les CSM semblent avoir intégré toutes les autres sections de l'intestin après plusieurs mois post-injection. Le pourcentage d'animaux possédant de l'ADN humain dans la peau, le quadriceps et le fémur des pattes postérieures s'est révélé très faible entre 20 et 11%. Bien que le cerveau, le foie et les reins soient des tissus à renouvellement cellulaire lent, le gène de la β -globine humaine a été détecté dans un nombre d'organe comparable aux temps précoces. A long terme après une ICE, le pourcentage d'animaux possédant de l'ADN humain dans le foie, le cerveau et les reins est respectivement de 28%, 21% et 17%. La rate et la moelle osseuse sont les 2 organes hématopoïétiques de la souris qui ont été prélevés. A plus long terme comme aux temps précoces c'est-à-dire proches de l'injection les CSM en P2 semblent préférentiellement coloniser la rate (10/24) par rapport à la MO (4/30).

A 30 jours post-ICE, dans tous les types de tissus prélevés à l'exception du duodénum, de l'iléon et de la peau, de l'ADN humain a été détecté. J30 est le temps tardif où la biodistribution des CSM injectées est la plus large. Le nombre de sites colonisés ainsi que

le nombre d'animaux positifs pour la présence de cellules humaines apparaît être plus important à J30 par rapport à J60, J90 et J120. Le nombre d'animaux positifs en PCR ainsi que la biodistribution des CSM est plus important à J15 (47%) qu'à J30 (34%).

Le temps auquel l'implantation des CSM est optimale varie d'un organe à l'autre. La circulation des CSM dans le sang périphérique semble maximale à J30 post-ICE. Pour l'estomac, le duodénum et la rate, c'est à J7 qu'il y a le plus grand nombre d'animaux positifs en PCR. Pour la MO, le muscle, le cerveau, les reins, le foie, les poumons, le cœur, le jéjunum et le caecum, c'est à J15 qu'il y a le maximum d'animaux positifs en PCR. Pour l'os et la peau, l'implantation maximale des CSM apparaît plus tardivement respectivement à J60 et J90.

Tableau VII : Pourcentage de souris positives pour la présence la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J30 à J120 post-irradiation ICE.

Jours post-irradiation	J30	J60	J90	J120	Fréquence de souris +/- tissu
Muscle abdominal	0/8 (0%)	0/6 (0%)	<u>4/8 (50%)</u>	2/6 (33%)	6/28 (21%)
Cœur	<u>6/8 (75%)</u>	0/8 (0%)	<u>4/8 (50%)</u>	4/6 (67%)	14/28 (50%)
Poumon	<u>6/8 (75%)</u>	0/8 (0%)	3/8 (38%)	<u>6/6 (100%)</u>	15/28 (54%)
Foie	4/7 (57%)	<u>4/8 (50%)</u>	0/8 (0%)	0/6 (0%)	8/29 (28%)
Rein	3/7 (43%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/6 (33%)	5/29 (17%)
Rate	4/7 (57%)	<u>4/8 (50%)</u>	2/6 (33%)	0/6 (0%)	10/27 (37%)
Estomac	4/6 (67%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)	1/6 (17%)	8/28 (29%)
Duodénum	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)	0/29 (0%)
Jéjunum	2/8 (25%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/6 (0%)	4/30 (13%)
Iléon	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)	0/30 (0%)
Caecum	3/8 (38%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	2/6 (33%)	7/30 (23%)
Côlon proximal	3/7 (43%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/6 (0%)	5/29 (24%)
Côlon Distal	1/5 (20%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/6 (33%)	3/27 (11%)
Cerveau	2/6 (33%)	<u>4/8 (50%)</u>	0/8 (0%)	0/6 (0%)	6/28 (21%)
Peau patte postérieure	0/6 (0%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)	0/6 (0%)	3/28 (11%)
Quadriceps	2/8 (25%)	<u>4/8 (50%)</u>	0/8 (0%)	0/6 (0%)	6/30 (20%)
Fémur (sans MO)	0/8 (0%)	<u>4/8 (50%)</u>	2/8 (25%)	0/6 (0%)	6/30 (20%)
Moelle osseuse	3/8 (38%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	1/6 (17%)	4/30 (13%)
Sang	4/7 (57%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)	4/29 (14%)
Fréquence de souris +/- jour post-irradiation	47 /137 (34%)	40/150 (27%)	27/150 (18%)	20/114 (18%)	

Les organes sont collectés aux temps post-irradiation J30, J60, J90 et J120. Les CSM ont été injectées 24 heures après l'ICE à 3.2 Gy. L'ADN a été extrait à partir des organes et analysés pour la présence du gène de la β -globine humaine par PCR. Les résultats représentent le nombre de souris positives pour la présence d'ADN humain par rapport au nombre total de souris analysées.

13.1.2. Etude quantitative de l'implantation des CSM à J15 post-ICE

Pour déterminer le taux d'implantation des CSM dans un grand nombre d'organe, l'étude quantitative de la biodistribution de ces cellules a été réalisée à J15. Une expérience préliminaire a été menée pour déterminer les organes vers lesquels migrent les CSM lorsque les animaux n'ont pas été irradiés (les shams). Les shams et les animaux irradiés-greffés ont été comparés statistiquement par un t-test. Le taux d'implantation des cellules humaines a été déterminé sur une série d'animaux shams greffés par une injection de CSM à $5 \cdot 10^6$ par voie intraveineuse. Les résultats de PCR quantitative par amplification du gène de la β -Globine sont exprimés par le rapport de la quantité d'ADN humain détectée sur la quantité d'ADN murin détectée. L'ADN de souris est quantifié en utilisant un gène « de ménage » la RAPSYN qui ne croise pas avec l'ADN humain.

13.1.2.1. Etude quantitative de l'implantation des CSM sans irradiation

Tous les organes sont prélevés 14 jours après injection des cellules souches et sont analysés par PCR quantitative (temps comparable à J15 pour les souris irradiées 24 avant l'injection). L'étude qualitative de l'implantation des CSM chez les souris shams est illustrée dans le Tableau VIII. L'implantation des cellules humaines dans l'intestin a été analysée uniquement dans le jéjunum et aucun muscle abdominal n'a pu être analysé. Chez les souris non irradiées greffées (les souris shams) de l'ADN humain a été détecté dans différents organes. Le pourcentage de souris non irradiées possédant de l'ADN humain dans la MO, les poumons est respectivement de 100% et 70%. Pour la rate et l'os, le pourcentage d'animaux possédant de l'ADN humain sans irradiation est de 50%. Les sites préférentiels de colonisation des CSM semblent être modifiés par l'exposition aux RI. Sans irradiation, les CSM isolées de Mo humaine semble migrer préférentiellement vers la moelle osseuse murine. Avec ou sans irradiation, les poumons apparaissent comme un site préférentiel de migration des cellules humaines injectées. Les cellules humaines ne sont

détectées que pour 20% des animaux dont le sang périphérique a été analysé. Il semble que peu de CSM soient présents dans la circulation sanguine périphérique.

Tableau VIII : Pourcentage de souris positives pour la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR 14 jours après injection des animaux shams

Organes prélevés	Shams J14
Cœur	2/10 (20%)
Poumon	7/10 (70%)
Foie	2/10 (20%)
Rein	3/10 (30%)
Rate	5/10 (50%)
Estomac	0/10 (0%)
Jéjunum	3/10 (30%)
Cerveau	4/10 (40%)
Peau patte postérieure	1/10 (10%)
Quadriceps	4/10 (40%)
Fémur (sans MO)	5/10 (50%)
Moelle osseuse	<u>10/10 (100%)</u>
Sang	2/10 (20%)

Les organes sont collectés 14 jours après injection de CSM. L'ADN a été extrait à partir des organes et analysés pour la présence du gène de la β -globine humaine par PCR. Les résultats représentent le nombre de souris positives pour la présence d'ADN humain par rapport au nombre total de souris analysées.

13.1.2.2. Etude quantitative de l'implantation des CSM à 15 jours post-ICE

L'étude quantitative a permis d'observer de faibles taux d'implantation des cellules isolées de la MO (Figure 21). Les taux d'implantation des CSM dans les organes des souris shams ont été comparés par un t-test aux taux d'implantation de ces cellules humaines dans les organes des souris irradiées corps entiers. L'irradiation n'a pas entraînée de variation significative du taux de CSM circulantes dans le sang périphérique ($0,03 \pm 0,02\%$), ni du taux de CSM implantées dans les poumons, l'estomac, le jéjunum, les reins et les fémurs des pattes postérieures. Bien que les CSM semblaient préférentiellement coloniser les poumons, l'ICE n'a pas favorisé une plus grande migration vers ces tissus. Le taux d'implantation des CSM est peu élevé 15 jours post-irradiation ($0,04 \pm 0,02\%$). En revanche l'ICE a entraîné une augmentation significative de la quantité de cellules humaines d'un

facteur 23 ($p < 0,01$) dans la peau des pattes postérieures, d'un facteur 3,5 dans le cerveau ($p < 0,01$) et d'un facteur 3 dans le cœur ($p < 0,01$). Il semble que l'exposition corps entiers a augmenté le taux de migration des CSM vers ces organes.

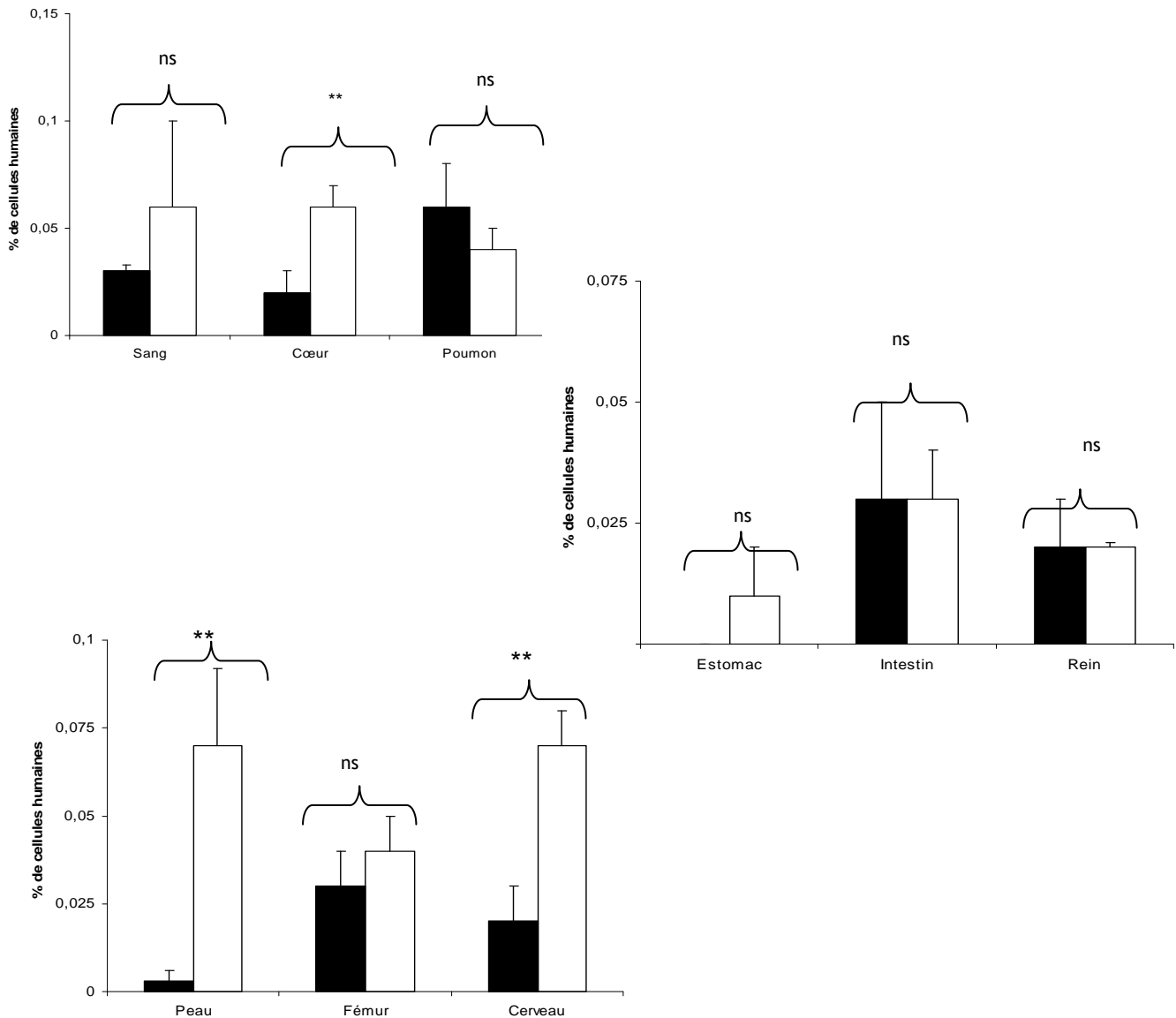


Figure 21 : Faible pourcentage d'implantation des CSM 15 jours post-ICE à 3,2 Gy. Les organes sont prélevés à 14 jours post-injection de CSM humaines à partir des souris irradiée en ICE à une dose sublétales de 3.2 Gy et des souris shams. L'ADN est extrait des tissus et analysés pour la présence du gène de la β -Globine humaine. L'histogramme noir représente le pourcentage de cellules humaines implantées dans les souris NOD/SCID shams (non-irradiées). L'histogramme hachuré représente le pourcentage de cellules humaines implantées dans les souris 15 jours post-ICE à 3.2 Gy. (ns) indique qu'il n'y a aucune différence significative entre ces deux groupes. (* = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ et ***= $p < 0,001$).

Des taux d'implantation des CSM plus élevés ont été observés dans le foie, la rate, la MO et les quadriceps (Figure 22). Deux semaines après ICE, il y a une augmentation significative

du nombre de cellules humaines implantées, d'un facteur 3 dans le foie ($p < 0,05$) et la MO ($p < 0,001$). L'irradiation corps entier semble augmenter la migration des CSM vers ces tissus. La mise en évidence d'une atteinte hépatique et d'une déplétion cellulaire dans la rate ainsi que l'implantation plus importante des CSM dans ces organes suggère une colonisation préférentielle des CSM vers ces sites altérés par les RI. L'augmentation de la colonisation pourrait être soit le résultat d'une augmentation de la prolifération de ces CSM déjà implantées et/ou une augmentation de leur mobilisation vers ces organes.

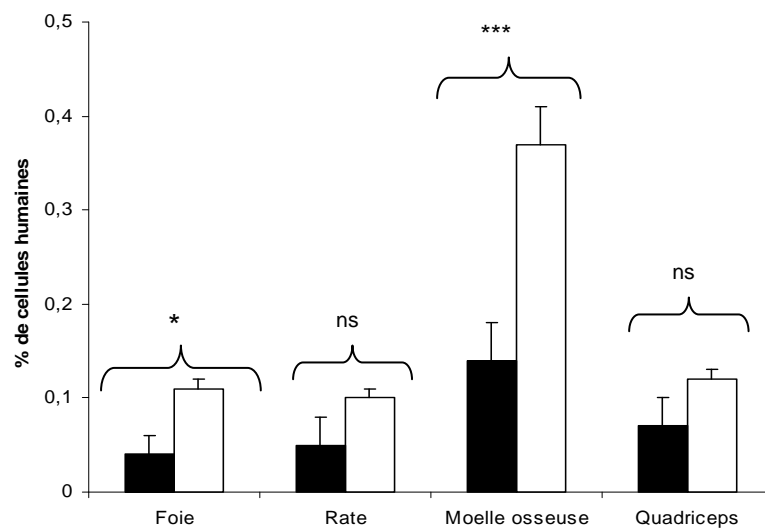


Figure 22: Forte implantation des CSM 15 jours post-ICE à 3.2 Gy. Les organes sont prélevés à 14 jours post-injection de CSM humaines à partir des souris irradiée en ICE à une dose subléthale de 3.2 Gy et des souris shams. L'ADN est extrait des tissus et analysés pour la présence du gène de la β -Globine humaine. L'histogramme noir représente le pourcentage de cellules humaines implantées dans les souris NOD/SCID shams (non-irradiées). L'histogramme hachuré représente le pourcentage de cellules humaines implantées dans les souris 15 jours post-ICE à 3.2 Gy. (ns) indique qu'il n'y a aucune différence significative entre ces deux groupes

13.2. Etude de la biodistribution des CSM après une IA à 8Gy

Quatre vingt dix jours après irradiation, très peu de souris sont positives pour le gène de la β -globine humaine après IA, seul les résultats de J3 à J60 de l'étude qualitative de l'implantation des CSM sont présentés (Tableau IX). La biodistribution des cellules humaines est maximale à J15 post-IA. C'est à ce temps que l'implantation quantitative des

CSM dans les différents organes a été déterminée. Les résultats sont exprimés en % représentant le rapport de la quantité d'ADN humain sur la quantité d'ADN murin total (Figures 23 et 24).

13.2.1. Cinétique d'implantation des CSM de J3 à J60

De l'ADN humain est détectable de 24 heures après injection des cellules humaines (J3 post-IA) à au moins 60 jours post-IA, dans un grand nombre d'organe. Le pourcentage de souris possédant le gène de la β -Globine humaine est de 14% à J3, 54% à J15, 51% à J30 et de 17% à J60 (Tableau IX). L'implantation des cellules humaine semble augmenter jusqu' à j15 et diminuer ensuite en fonction du temps. La biodistribution des CSM après une IA devient maximale à J15. Après une IA, les CSM humaines semblent préférentiellement migrer dans les poumons, les reins et la rate. Pour ces organes, plus de 50% des animaux sont positifs pour la présence du gène humain. Les cellules humaines injectées colonisent également les muscles abdominaux, le cœur, le foie, l'estomac, le jéjunum, les quadriceps, les os (fémurs) et la moelle osseuse mais de façon plus modérée. Pour ces organes, 35 à 50% des animaux sont positifs lors de la recherche du gène humain par PCR. En revanche très peu de CSM se localisent dans les autres régions de l'intestin et dans la peau, pour ces organes moins de 20% des animaux sont positifs pour la présence de gène humain de la β -Globine. Très peu de CSM semblent en circulation dans le sang périphérique, seul 8% des souris sont positives en PCR pour le sang.

Tableau IX: Pourcentage de souris positives pour la β -Globine humaine dans les différents tissus analysés par PCR de J3 à J60 post-IA

Jour post-irradiation Organes	J3	J15	J30	J60	Fréquence de souris +/- Tissu
Muscle abdominal	1/10 (10%)	2/10 (20%)	6/6 (100%)	1/6 (17%)	10/32 (31%)
Cœur	2/10 (20%)	5/10 (50%)	4/6 (67%)	4/10 (40%)	15/36 (42%)
Poumon	7/10 (70%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	2/10 (20%)	23/26 (64%)
Foie	1/10 (10%)	10/10 (100%)	5/6 (83%)	0/10 (0%)	16/36 (44%)
Rein	3/10 (30%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	2/10 (20%)	19/36 (53%)
Rate	3/10 (30%)	10/10 (100%)	5/6 (83%)	2/10 (20%)	20/36 (56%)
Estomac	1/10 (10%)	9/10 (90%)	5/6 (83%)	0/8 (0%)	15/34 (44%)
Duodénum	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)	5/36 (14%)
Jéjunum	1/10 (10%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	1/10 (10%)	16/36 (44%)
Ileon	1/10 (10%)	1/10 (10%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)	5/36 (14%)
Caecum	0/10 (0%)	1/10 (10%)	1/6 (17%)	1/10 (10%)	3/36 (8%)
Côlon Proximal	0/10 (0%)	1/10 (10%)	2/6 (33%)	3/10 (30%)	6/36 (17%)
Côlon Distal	0/10 (0%)	0/10 (0%)	2/6 (33%)	2/10 (20%)	4/36 (11%)
Cerveau	4/10 (40%)	10/10 (100%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)	17/36 (47%)
Peau patte	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/6 (0%)	0/10 (0%)	1/36 (3%)
Quadriceps	1/10 (10%)	4/10 (40%)	2/6 (33%)	1/8 (12,5%)	14/34 (41%)
Fémur (sans MO)	1/10 (10%)	3/10 (30%)	5/6 (83%)	5/10 (50%)	14/36 (39%)
MO	0/10 (0%)	10/10 (100%)	3/6 (50%)	4/8 (50%)	17/34 (50%)
Sang	0/10 (0%)	3/10 (30%)	0/6 (0%)	0/10 (0%)	3/36 (8%)
Fréquence de souris+/ jour pos-irradiation	26/190 (14%)	102/190 (54%)	58/114 (51%)	31/186 (17%)	

Les organes sont collectés à J3, J15, J30 et J60 post-IA à 8Gy. L'ADN a été extrait à partir de ces organes et analysé pour la présence du gène de la β -globine humaine par PCR. Les résultats représentent le nombre de souris positives pour la présence d'ADN humain par rapport au nombre total de souris analysées

13.2.2. Etude quantitative de l'implantation des CSM à J15 post-IA

Suite à l'analyse qualitative de la biodistribution des CSM de J3 à J60 soulignant une implantation de ces cellules dans un plus grand nombre d'organes à J15 et J30, nous avons choisi de réaliser l'étude quantitative de l'implantation à J15. A ce temps 100% des souris possèdent de l'ADN humain dans les poumons, le foie, les reins, la rate, le jéjunum, le cerveau et la moelle osseuse. L'étude quantitative de l'implantation des CSM dans l'intestin a été réalisée uniquement dans le jéjunum. Les taux d'implantation des CSM dans les différents organes prélevés à J15 post-IA ont été comparés par un t-test aux taux d'implantation sans irradiation (les Shams). La Figure 23 illustre les faibles taux d'implantation des CSM et la Figure 24 les organes où les taux sont plus importants. Le taux de CSM circulantes dans le sang périphérique 15 jours post-IA ($0,06 \pm 0,04\%$) est comparable à celui sans irradiation ($0,01 \pm 0,01\%$).

L'irradiation abdominale n'a pas entraîné de variation du taux d'implantation des CSM dans le cœur et le cerveau (respectivement $0,02 \pm 0,01\%$ et $0,04 \pm 0,01\%$) (Figure 23A), ni dans les organes de la patte postérieure (peau $0,03 \pm 0,01\%$; muscle $0,03 \pm 0,01\%$. et fémur $0,02 \pm 0,01\%$) (Figure 23C). En revanche l'IA favorise la colonisation du système digestif par les CSM. Il y a une implantation des cellules humaines dans l'estomac ($0,12 \pm 0,01\%$). Il y a 6 fois ($p < 0,01$) plus de CSM humaines dans le jéjunum après une IA en comparaison aux jéjunums des souris shams (Figure 23B)

L'irradiation abdominale à 8 Gy a favorisé l'implantation des CSM injectées dans les organes hématopoïétiques (foie, rate et moelle osseuse) ainsi que dans les poumons et les reins (Figure 24). Pour les poumons, les reins, les rates, les foies et les MO analysés, 50% des animaux sont positifs pour l'analyse PCR (Tableau IX). Ceci mettant en évidence une migration préférentielle des CSM vers ces organes après une IA. L'étude quantitative réalisée à J15 post-IA révèle que l'exposition a augmenté significativement le taux d'implantation des cellules injectées dans ces organes d'un facteur 19 dans la rate

($p < 0,001$), d'un facteur 13 dans les poumons, d'un facteur 11 dans le foie ($P < 0,001$), d'un facteur 5 dans les reins et d'un facteur 3 dans la moelle osseuse prélevée au niveau des fémurs. La colonisation de ces organes par les CSM après une IA semble plus importante que celle observée après une ICE.

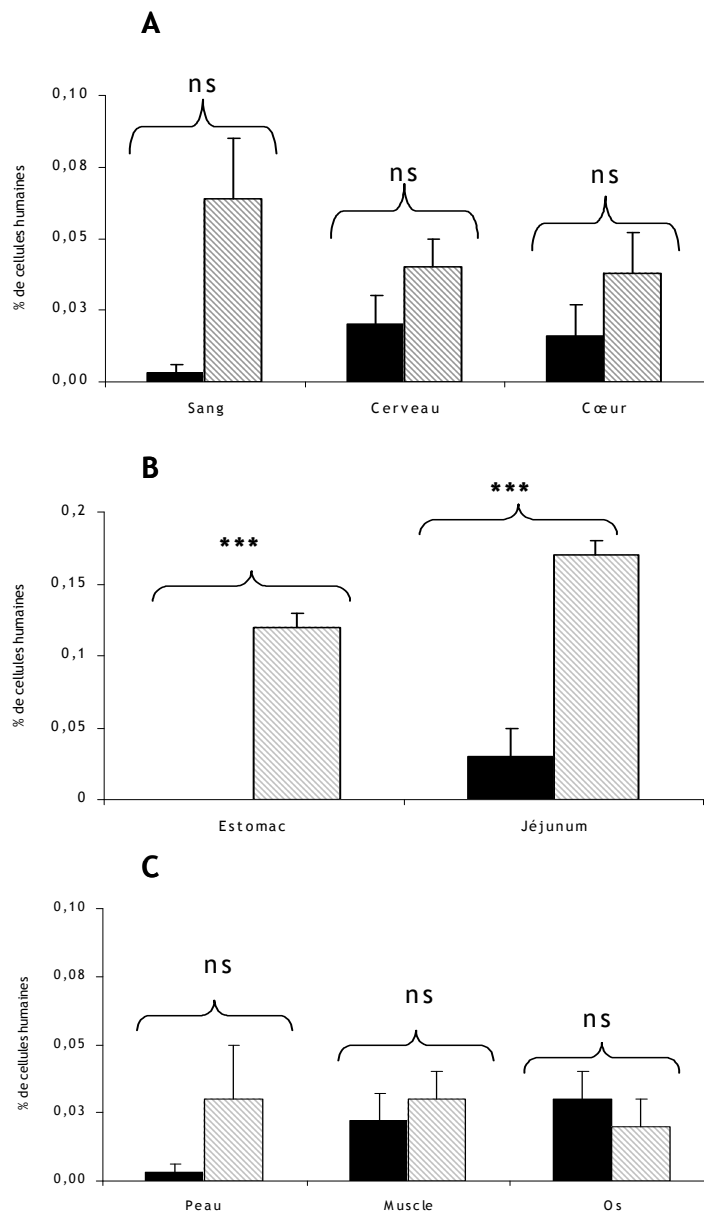


Figure 23 : Faible taux d'implantation des CSM humaines 15 jours post-IA à 8Gy.

Les organes sont prélevés à 14 jours post-injection de CSM humaines à partir des souris irradiée en IA à une dose de 8G et des souris shams. L'ADN est extraits des tissus et analysés pour la présence du gène de la β -Globine humaine. L'histogramme noir représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris NOD/SCID non-irradiées (Shams). L'histogramme hachuré gris représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris 15 jours post-IA. (ns) indique qu'il n'y a aucune différence significative selon le test-t entre ces deux groupes. (* = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ et ***= $p < 0,01$).

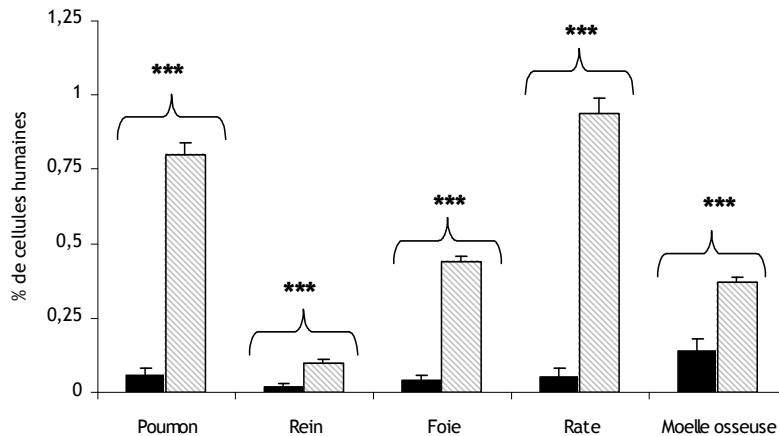


Figure 24: Taux élevé d'implantation des CSM (supérieur à 0,1%) 15 jours post-IA à 8 Gy. Les organes sont prélevés à 14 jours post-injection de CSM humaines à partir des souris irradiées en IA à une dose de 8Gy et des souris shams. L'ADN est extraits des tissus et analysés pour la présence du gène de la β -Globine humaine. L'histogramme noir représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris NOD/SCID non-irradiées (Shams). L'histogramme hachuré gris représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris 15 jours post-IA. (ns) indique qu'il n'y a aucune différence significative selon le test-t entre ces deux groupes. (* = $p < 0.05$; ** = < 0.01 et *** = $p < 0.01$).

13.2.3. Etude comparative des taux d'implantation des CSM à J15 entre une ICE et une IA

L'étude quantitative du gène de la β -globine humaine par PCR 15 jours post-IA a permis d'observer une migration significative des CSM humaines dans des organes de la sphère abdominale (estomac, jéjunum, reins, rate, foie). Les souris irradiées au niveau de l'abdomen ont aussi reçu préalablement une ICE à 3,2 Gy. Pour déterminer si l'IA supplémentaire de 4,8 Gy favorise la migration des CSM vers les organes de la sphère abdominale, à 15 jours post-exposition, les taux d'implantation des cellules humaines après ICE ont été comparés aux taux après IA par un test-t (Figure 25).

L'IA supplémentaire de 4,8 Gy a favorisé la migration des CSM vers les organes appartenant à la sphère abdominale. Les CSM semble préférentiellement migrer vers les zones les plus exposées aux RI. En comparaison à l'ICE, l'IA a entraîné une augmentation significative du taux d'implantation des CSM d'un facteur 12 dans l'estomac ($p < 0,001$), d'un facteur 9 dans la rate ($p < 0,001$), d'un facteur 5 dans le jéjunum, les reins et le foie ($p < 0,001$).

Les analyses des atteintes tissulaires ont permis de mettre en évidence une souffrance hépatique radio-induite, une déplétion cellulaire au sein de la rate, ainsi que des modifications structurales et une augmentation de l'apoptose au niveau du jéjunum. L'IA semble entraîner une augmentation du taux d'implantation des CSM injectées dans ces organes.

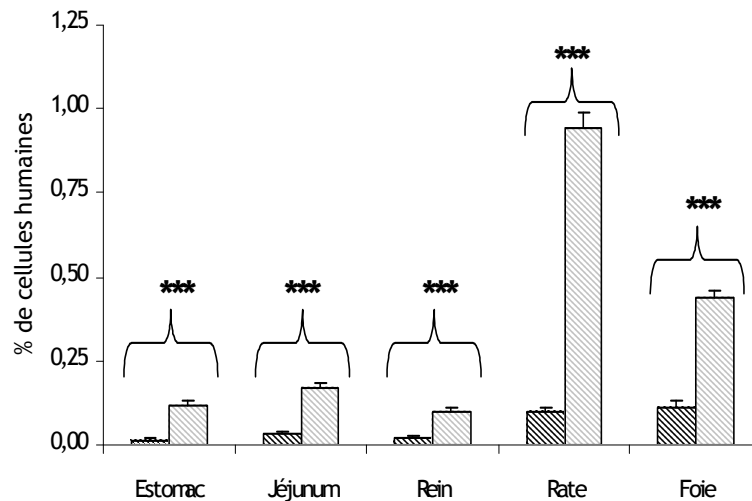


Figure 25 : Comparaison du taux d'implantation des CSM entre ICE et IA dans les organes de la sphère abdominale. Les organes sont prélevés à 14 jours post-injection de CSM humaines à partir des souris irradiées en IA à une dose de 8Gy et des souris shams. L'ADN est extrait des tissus et analysé pour la présence du gène de la β -Globine humaine. L'histogramme hachuré noir représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris NOD/SCID 15 jours post-ICE. L'histogramme hachuré gris représente le pourcentage de CSM implantées dans les souris 15 jours post-IA. (***)= $p < 0,001$ indique qu'il y a une différence statistiquement significative entre ces deux groupe

13.3. Etude de la biodistribution des CSM après une Irradiation de la Patte droite droite postérieure (IP)

13.3.1. Etude qualitative de l'implantation des CSM en fonction de la dose reçue

Le tableau X illustre l'analyse qualitative du nombre de souris NOD/SCID possédant de l'ADN humain dans les différents organes de la patte irradiée. Les résultats montrent que

les CSM injectées migrent préférentiellement au niveau du muscle et de l'os et ce de façon dose-dépendante.

En revanche les CSM n'ont pas été détectées dans la moelle osseuse prélevée au niveau du fémur de la patte irradiée. Ces résultats indiquent que nos CSM cultivées ont une très faible capacité à migrer vers leur tissu d'origine après une IP. L'irradiation étant hétérogène, les animaux pourraient utiliser leur propre réserve de cellules stromales pour repeupler les zones atteintes. Ces observations diffèrent de ce qui est déjà connu dans la littérature sur la capacité des CSM à migrer vers la moelle osseuse (Devine et al. 2003).

Il semble exister un effet dose sur le nombre d'animaux dont les quadriceps et les fémurs sont positifs en PCR (Tableau X). L'effet dose est également retrouvé sur le nombre d'animaux dont les autres organes n'appartiennent pas à la zone irradiée (tableau XI). Pour le fémur de la patte irradiée à 15 Gy on peut déjà observer que 12,5% des animaux sont positifs. A 20 Gy, 40% sont positifs et à 25 Gy ils sont tous positifs (100%). L'IP à 25 Gy semble être la dose optimale donnant le plus grand nombre possible de souris positives en PCR pour le quadriceps et le fémur de la patte irradiée. C'est également à cette dose qu'il y a une localisation des CSM dans le plus grand nombre d'organe (Tableau XI). Le pourcentage de souris NOD/SCID possédant le gène de la β -Globine humaine est de 11% pour une IP de 15 Gy, de 44% pour une IP de 20 Gy et de 89% pour une IP de 25 Gy.

Tableau X : Pourcentage de souris NOD/SCID positives pour le gène de la β -globine humaine détecté par PCR dans le muscle et le fémur de la patte irradiée

Dose IP en Gy	15 Gy	20 Gy	25 Gy
Frequence de souris + pour le quadriceps	0/8 (0%)	1/8 (12.5%)	8/8 (100%)
Frequence de souris + pour le fémur (sans MO)	1/8 (12,5%)	3/8 (38%)	8/8 (100%)

Les différents organes sont prélevés 6 semaines après les irradiations (15,20 et 25Gy), les pourcentages représentent le rapport du nombre de souris positives pour la présence de la β -globine humaine sur le nombre total de souris analysées.

Tableau XI : Pourcentage de souris NOD/SCID positives pour le gène de la β -globine humaine détecté par PCR dans les organes n'appartenant pas à la zone irradiée par des IP de 15, 20 et 25 Gy

Organes	15 Gy	20 Gy	25 Gy	Fréquence souris+ / Tissue
Muscle abdominal	2/8 (25%)	0/6 (0%)	6/8 (75%)	8/22 (36%)
Cœur	6/8 (75%)	0/6 (0%)	8/8 (100%)	14/22 (64%)
Poumon	2/6 (33%)	4/10 (40%)	8/8 (100%)	14/24 (58%)
Foie	0/8 (0%)	6/8 (75%)	8/8 (100%)	14/24 (58%)
Rein	2/6 (33%)	6/10 (60%)	8/8 (100%)	16/24 (67%)
Rate	0/8 (0%)	5/10 (50%)	8/8 (100%)	13/26 (50%)
Estomac	0/8(0%)	6/10 (60%)	8/8 (100%)	14/26 (54%)
Duodenum	0/8 (0%)	10/10 (100%)	8/8 (100%)	18/26 (69%)
Jejunum	0/6 (0%)	0/10 (0%)	6/8 (75%)	6/24 (25%)
Iléon	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)	10/24 (42%)
Caecum	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)	10/26 (38%)
Côlon proximal	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)	10/26 (38%)
Côlon distal	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)	10/26 (38%)
Cerveau	0/8 (0%)	4/10 (40%)	8/8 (100%)	12/26 (46%)
Fréquence souris + / dose d'IP	12/106 (11%)	57/130 (44%)	100/112 (89%)	

Les organes sont prélevés 6 semaines après les irradiations (15, 20 et 25Gy), les pourcentages représentent le rapport du nombre de souris positives pour la présence de la β -globine humaine sur le nombre total de souris analysées.

13.3.2. Etude quantitative de l'implantation des CSM en fonction de la dose reçue

13.3.2.1. Dans les organes de la zone recevant une dose supplémentaire

L'étude quantitative de l'implantation des CSM a été réalisée sur les tissus des pattes postérieures prélevés six semaines après une irradiation de la patte droite postérieure (IP) à 15, 20 et 25 Gy (tableau XII). Pour le quadriceps droit, à 15 Gy aucune implantation n'est observée, à 20 Gy le taux est de $0,02 \pm 0,01\%$ et il s'élève significativement à $57,53 \pm 19,18\%$ pour une IP de 25 Gy. Pour le fémur droit, le taux d'implantation varie également avec la dose reçue, mais l'implantation est plus faible et est maximale pour une IP à 20 Gy ($1,37 \pm 0,50\%$). Six semaines après une IP à 25 Gy, c'est au niveau du quadriceps de la patte irradiée que les CSM sont majoritairement implantées.

Tableau XII: Pourcentage de cellules positives pour la β -globine humaine détectées par PCR dans le quadriceps et le fémur de la patte droite irradiée à 15, 20 et 25 Gy.

	15 Gy	20 Gy	25 Gy
% d'implantation des CSM humaines dans le quadriceps droit	$0,00 \pm 0,00\%$	$0,02 \pm 0,01\%$	$57,53 \pm 19,18\%$
% d'implantation des CSM humaines dans le fémur (sans MO) droit	$0,00 \pm 0,00\%$	$1,21 \pm 0,74\%$	$1,37 \pm 0,50\%$

Les organes sont prélevés 6 semaines après les irradiations (IP à 15, 20 et 25Gy), les pourcentages représentent le rapport de la quantité d'ADN humain amplifié sur la quantité d'ADN murin amplifié

13.3.2.2. Dans les organes n'appartenant pas à la zone surexposée

Pour compléter l'étude de la biodistribution des CSM dans un organisme ayant reçu une IP à forte dose, nous avons analysé qualitativement la présence d'ADN humain par PCR dans les organes n'appartenant pas à la zone la plus irradiée, après une IP à forte dose (15, 20 et 25 Gy). C'est après une IP à 25 Gy que nous observons le maximum de souris positives pour le gène humain β -globine (Tableau XI). Le tableau XIII regroupe les taux d'implantation des CSM dans les organes n'appartenant pas à la zone surexposée. Le taux d'implantation des CSM humaines est important dans le poumon, le rein et l'estomac. La grande variabilité entre les souris ainsi que la trop grande quantité d'ADN humain amplifié, nous ont limité dans la détermination du taux d'implantation pour ces 3 organes. A l'inverse c'est la faible quantité d'ADN murin amplifié à partir du muscle abdominal qui nous a limité dans l'interprétation de l'implantation dans ce tissu. Pour les autres organes les quantités d'ADN amplifiées ont été suffisantes pour permettre la quantification des CSM humaines implantées bien qu'une grande variabilité inter-souris soit observée. De manière surprenante, c'est dans des organes géométriquement éloignés de la zone surexposée comme le foie, le cerveau et la rate que les CSM sont détectées en plus grande quantité (respectivement $2,63 \pm 0,80\%$; $6,95 \pm 3,14\%$; $1,56 \pm 0,25\%$). Il n'y a pas de différence significative du taux d'implantation des CSM dans ces tissus. Par contre leurs taux d'implantation sont significativement plus élevés que dans l'intestin. Par exemple, l'implantation des CSM est plus élevée d'un facteur 5 ($p < 0,001$) dans la rate que dans le colon distal ($0,32 \pm 0,23\%$). Il n'y a pas de différence significative observée pour l'implantation des CSM dans les différentes régions de l'intestin.

Les CSM isolées à partir de MO humaine semblent migrer préférentiellement dans les organes de la zone irradiée, leur taux d'implantation semble dose-dépendant dans ces organes. Ces cellules humaines migrent également dans des organes n'appartenant pas aux

zones irradiées comme le rein. Le nombre de site et la fréquence d'implantation semble dose dépendant. Cette localisation des CSM dose dépendante dans tout l'organisme après une irradiation localisée suggère à la fois une colonisation non restreinte des CSM vers plusieurs foyers réactionnels et l'existence d'une réaction globale du corps suite aux RI. L'irradiation supplémentaire de 3,2 Gy en corps entiers pourrait également participer à cette réaction généralisée de l'organisme à la surexposition.

Tableau XIII: Pourcentage de cellules humaines positives pour le gène de la β -globine humaine détecté par PCR dans les organes n'appartenant à la zone surexposée après une IP à 25 Gy.

Organes	% de cellules humaines implantées
Foie	10,23 \pm 5,60 %
Cerveau	6,95 \pm 3,14 %
Rate	1,56 \pm 0,25 %
Duodénum	0,08 \pm 0,02 %
Jéjunum	0,04 \pm 0,02 %
Iléon	0,04 \pm 0,02 %
Caecum	0,04 \pm 0,02 %
Côlon Proximal	0,04 \pm 0,02 %
Côlon Distal	0,32 \pm 0,23 %

Les organes sont collectés six semaines après IP à 25 Gy. Le pourcentage d'implantation des cellules humaines dans les organes dits non-irradiés après IP à 25 Gy. Le pourcentage de CSM implantées a été calculé par le rapport de la quantité d'ADN humain amplifié sur la quantité d'ADN murin.

14. Etude du comportement des CSM dans les tissus irradiés

14.1. Localisation *in situ* des CSM par marquage immunohistochimique de la bêta-2-microglobuline humaine

Par marquage immunohistochimique de la bêta-2-microglobuline humaine dans les tissus murins irradiés, les CSM humaines injectées ont été localisées *in situ*. Ces cellules humaines semblent préférentiellement migrer autour des axes vasculaires (Figure 26) et dans des zones fonctionnelles (Figure 27). Les marquages ont été réalisés sur les organes pour lesquels le taux d'implantation était le plus important. Dans les poumons (Figure 26 B), le cerveau (Figure 26 D) et les reins, (Figure 26 F), la localisation des CSM humaines est préférentiellement péri-vasculaire. Le marquage de la bêta-2-microglobuline humaine sur des coupes de poumon a permis d'observer que les CSM semblent traverser l'intima pour s'implanter autour des vaisseaux.

Dans le cerveau, les CSM ont été localisées autour des veinules. Les CSM colorées en rouge par le marquage immunohistochimique permet d'apprécier une localisation autour des vaisseaux dans le rein, et à plus fort grossissement, les cellules humaines semblent avoir une morphologie de cellules endothéliales. La modification morphologique des CSM implantées dans le rein suggère une différenciation de celle-ci en fonction de leur environnement.

Dans le cerveau les CSM se localisent aussi dans la pie-mère (Figure 27B). Dans le rein les CSM peuvent s'implanter dans des glomérules (Figure 27A). Dans la rate les CSM colonise l'ensemble de ce tissu (Figure 27C). Les CSM peuvent être localisées dans les tissus de soutien comme le septum interlobulaire du foie (Figure 27D) ainsi que dans la musculuse et la muqueuse de l'estomac (respectivement Figure 27E et 27F). L'implantation des CSM isolées de la MO dans des tissus de soutien et des zones fonctionnelles comme la capsule de Bowman du glomérule suggère un rôle fonctionnel de celles-ci dans les organismes irradiés. Les Figures 26B et 26G illustrent respectivement un vaisseau pulmonaire et une aire portale dans lesquelles on observe des cellules sanguines circulantes qui ne semblent pas posséder la bêta-2-microglobuline humaine. Cette observation suggère que les CSM ne semblent pas être dans la circulation, ce qui est concordant avec nos résultats de PCR.

Les cellules humaines ont été également mises en évidence *in situ* au niveau du jéjunum par immunohistochimie. Les CSM injectées semble préférentiellement s'implanter dans le

mésentère 3 jours post-IA (Figure 28A). Les CSM peuvent aussi se localiser autour des cryptes (Figure 28B) et des vaisseaux de la lamina propria (Figure 28C).

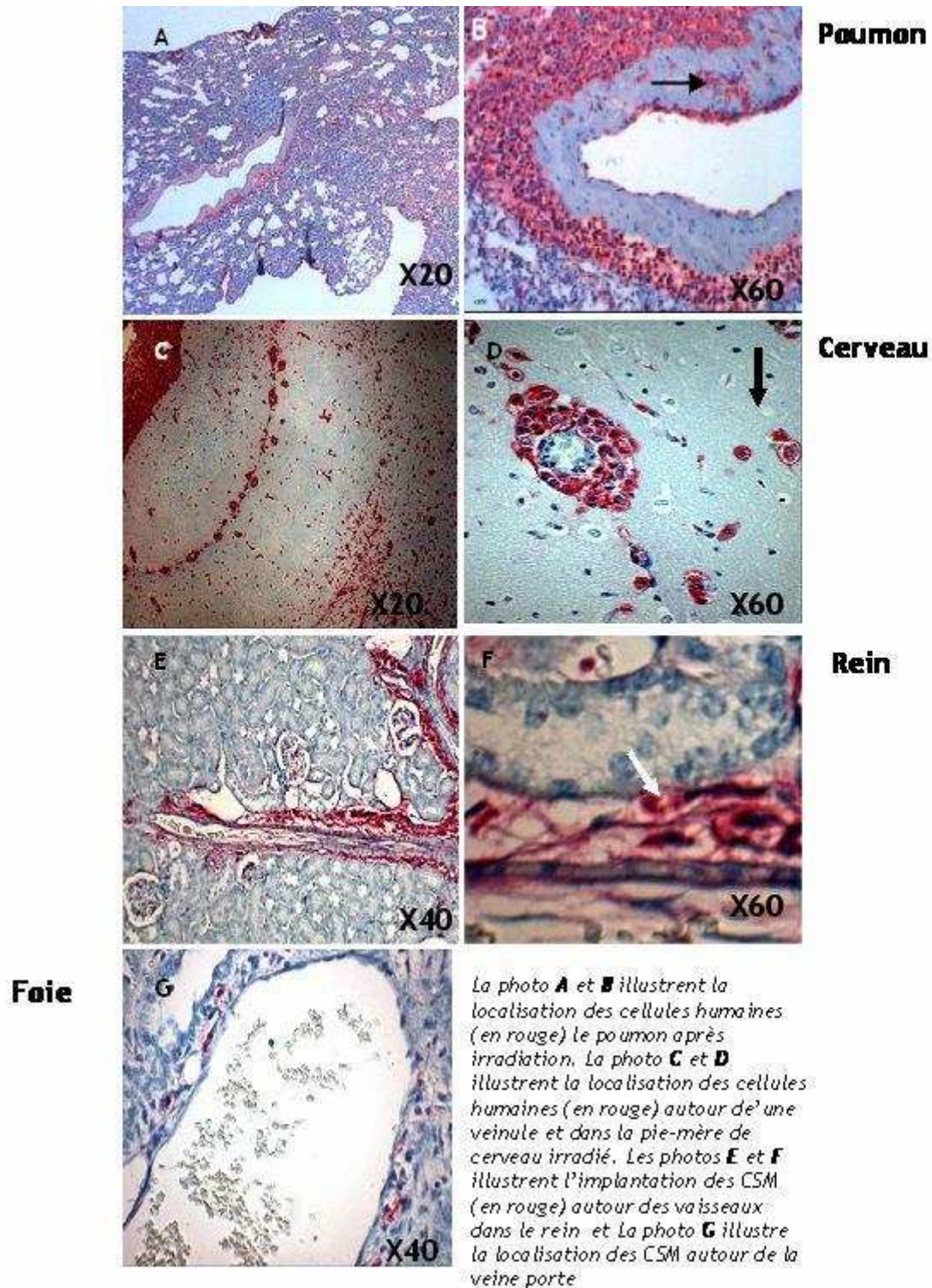
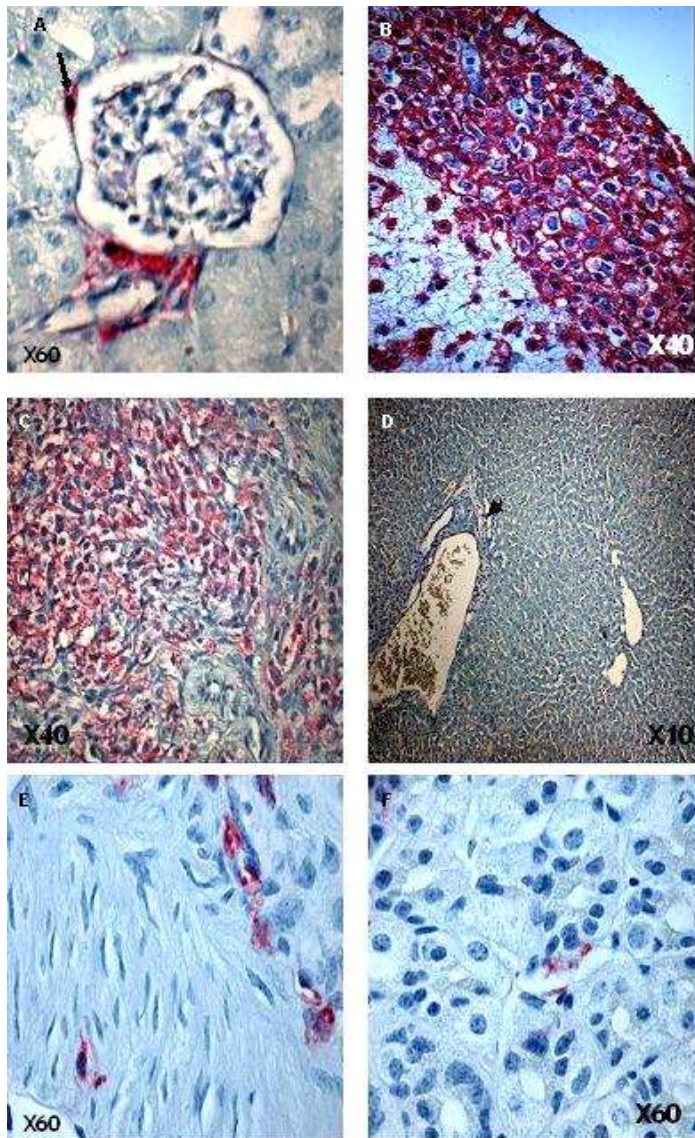


Figure 26 : Marquage immunohistochimique des cellules humaines autour des vaisseaux, 15 jours post-irradiation



La figure A illustre la localisation des cellules humaines (en rouge) dans le glomérule rénale après une irradiation ICE. La photo B illustre la localisation des cellules humaines (en rouge) dans la pie mère de cerveau de souris irradiées et la photo C illustre l'implantation des CSM (en rouge dans la rate). La photo D illustre la localisation des CSM dans le septum interlobulaire du foie. Les photos E et F illustrent respectivement l'implantation des CSM dans la musculuse et la muqueuse à l'étage des glandes dans l'estomac

Figure 27: Marquage immunohistochimique des cellules humaines dans le rein, le cerveau, la rate, le foie et l'estomac prélevés 15 jours post-irradiation

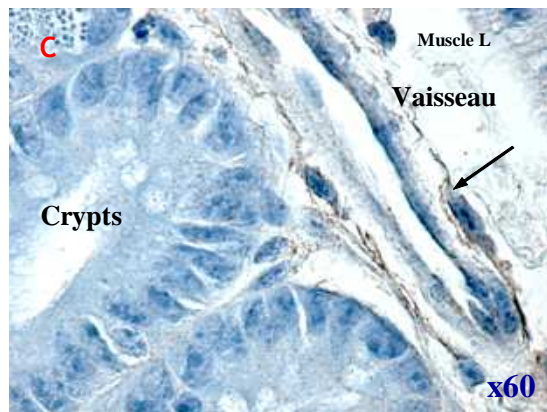
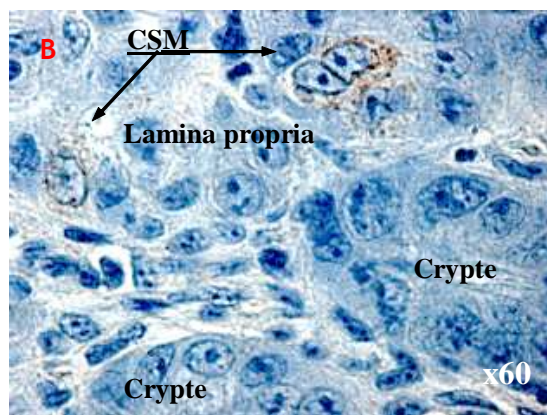
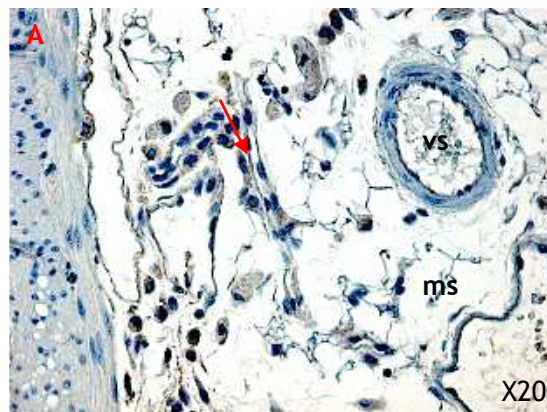


Figure 28 : Marquage immunohistochimique des cellules humaines dans le jéjunum 3 jours post-IA. La photo A illustre la localisation des CSM dans le mésentère (ms), vs : vaisseaux. La photo B illustre la localisation des CSM autour des cryptes de la lamina propria et la photo C l'implantation des CSM autour des vaisseaux de la lamina-propria.

14.2. Etude de la différenciation *in vivo* des CSM par RT-PCR

Nous avons étudié le phénotype de ces cellules humaines logées au sein des tissus murins. Pour cela un système de RT-PCR quantitative permettant d'amplifier spécifiquement les ARN messagers humains a été développé. Les gènes SH2, SH3 et alpha-SMA qui sont des marqueurs spécifiques des CSM ont été étudiés dans plusieurs organes, afin de savoir si les cellules, *in vivo*, acquièrent un phénotype différent des CSM humaines en P2 avant greffe. Les résultats ont été exprimés pour chaque gène étudié sous forme du rapport du taux d'expression de messagers humains implanté dans le tissu sur le taux d'expression des messagers présents dans les CSM avant injection (normalisé par rapport à la GAPDH) (Figure 29). Les CSM implantées semblent moins exprimer SH2 et alpha-SMA qu'avant greffe, mettant en évidence une modulation phénotypique.

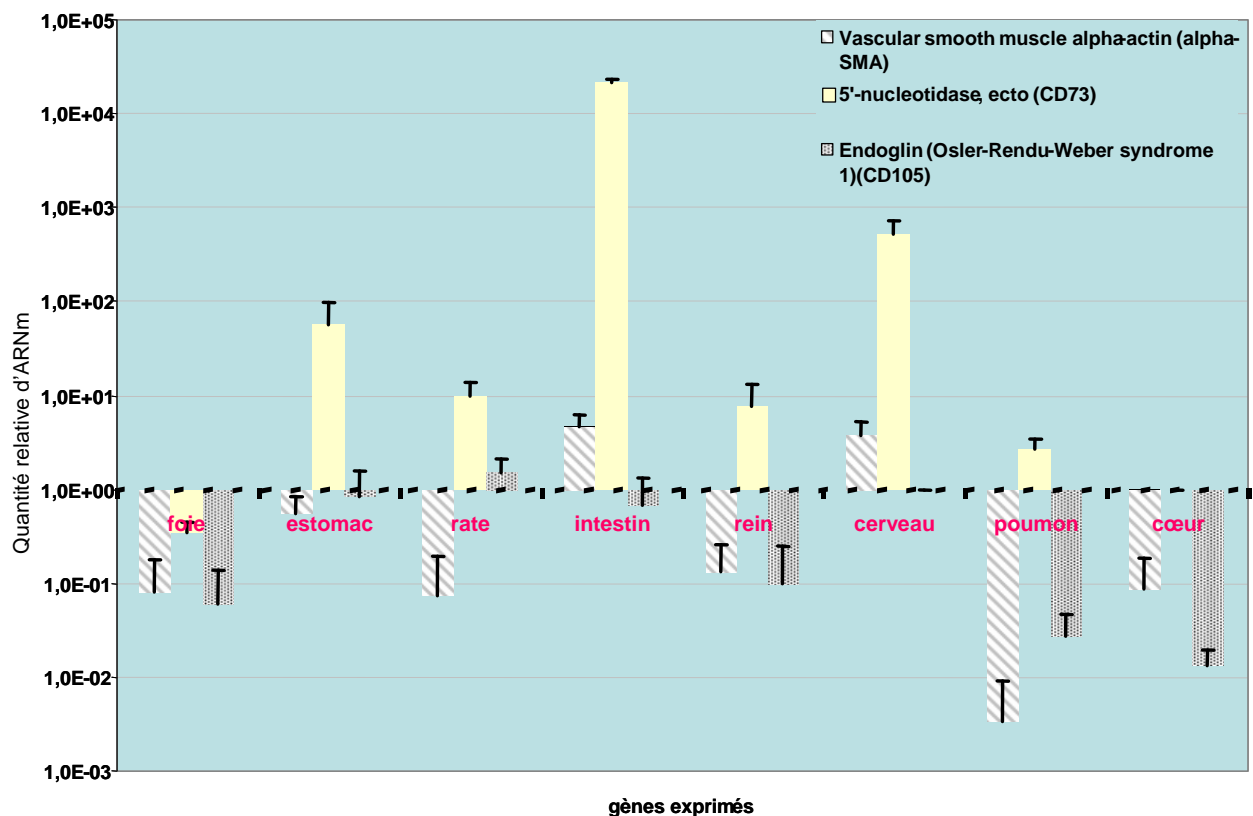


Figure 29 : Variation du taux d'expression des marqueurs spécifiques des CSM après implantation. Les gènes SH2, SH3 et alpha-SMA qui sont des marqueurs spécifiques des CSM ont été étudié dans le foie, l'estomac, la rate, l'intestin, le rein, le cerveau, le poumon et le cœur prélevés à J30 post-ICE. Les résultats ont été exprimés pour chaque gène étudié sous forme du rapport des messagers humains dans le tissu divisé par les messagers présents dans les CSM avant injection (normalisé par rapport à la GAPDH). Ces résultats expriment une variation du taux d'un ARN messager des cellules implantées dans un tissu par rapport aux CSM cultivées.

14.3. Mise en évidence de l'état prolifératif des CSM implantées

Un marquage immunohistochimique sur coupes successives de la bêta-2-microglobuline humaine et de la protéine PCNA permettant de localiser les cellules en prolifération a été réalisé sur le rein et le rein (Figure 30). Certaines des cellules humaines implantées (colorées en rouge) sont colorées en marron sur la coupe successive de rein et de cerveau. Dans le rein et le cerveau une grande partie des CSM implantées semblent conserver leur pouvoir prolifératif 30 jours post-ICE.

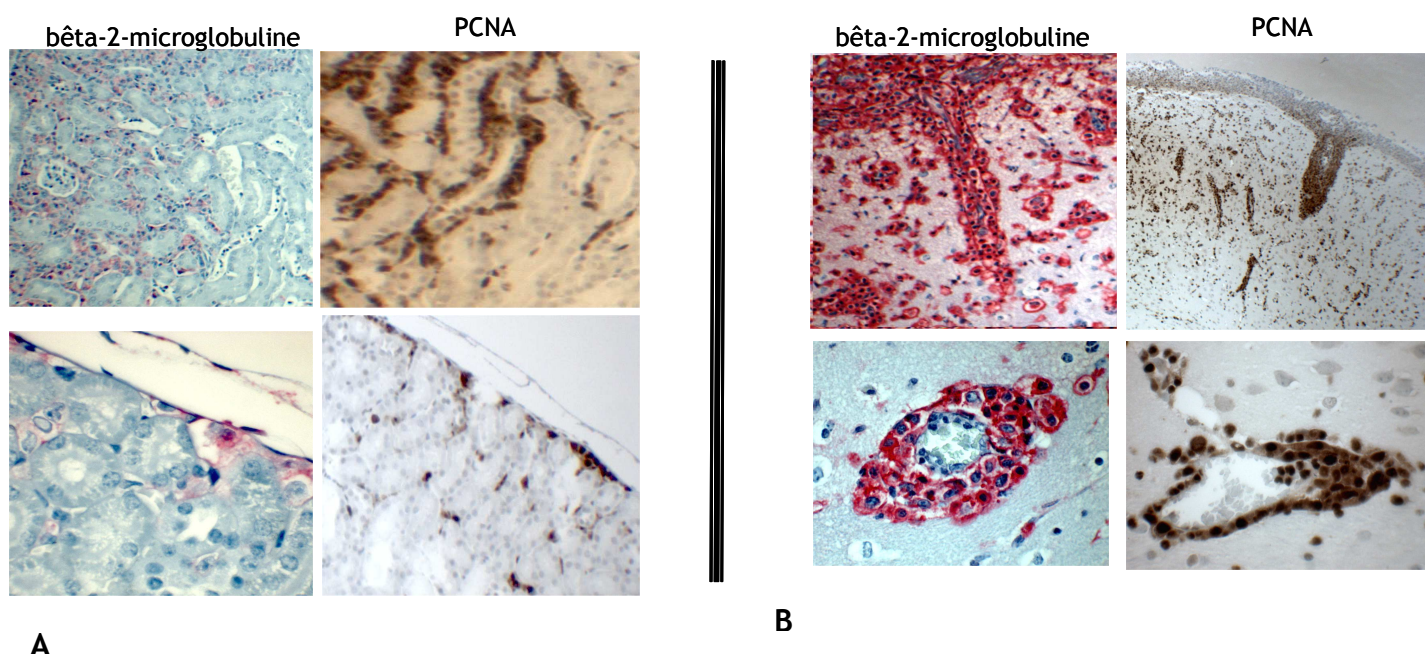


Figure 30 : Marquage immunohistochimique des CSM en prolifération 30 jours post-ICE. Les photos en A et B représentent des marquages immunohistologique de la bêta-2-microglobuline et de PCNA sur coupes successives respectivement de rein et de cerveau prélevés 30 jours post-ICE

Dans les poumons, le cerveau, les reins et l'intestin les CSM isolées de la MO se localisent préférentiellement autour des vaisseaux. Dans le poumon les CSM ont été observées dans l'intima des vaisseaux (Figure 26B). Sur des bases morphologiques nos observations suggèrent que les CSM pourraient acquérir des caractéristiques phénotypiques proches de celui des cellules endothéliales. Ces cellules souches de la MO pourraient donc coloniser

les organes atteints par les irradiations en traversant l'intima des vaisseaux ou rester autour des vaisseaux pour les restructurer.

15. Impact d'une greffe de CSM sur les atteintes radio-induites

L'étude anatomopathologique réalisée sur les coupes d'organes n'a pas révélé d'atteinte tissulaire dans les organes où se sont implantées les CSM. Pour déterminer si la greffe de CSM a un effet bénéfique sur les atteintes multi-organes suite aux irradiations, nous avons observé l'impact d'une greffe sur les variations des paramètres biochimiques du sang, sur l'homéostasie intestinale et l'inflammation.

15.1. Effets d'une greffe de CSM sur les paramètres biochimiques du sang

15.1.1. Rappels des paramètres biochimiques du sang

Dans le but de déterminer si les RI entraînent des variations des taux plasmatiques d'urée, de créatinine, de protéines totales, d'ASAT et d'ALAT. Le tableau XIV rappelle les taux de base des paramètres biochimiques de notre modèle murin NOD/SCID non-irradié.

Tableau XIV: Biochimie du sang du modèle murin NOD/SCID

Urée	7,26 ± 0,18 µmol/ml
Créatinine	27,67 ± 1,15 nmol/ml
Protéines totales	39,33 ± 1,76 mg/ml
ASAT	0,061 ± 0,003 Unité/ml
ALAT	0,021 ± 0,001 Unité/ml

Les dosages biochimiques ont été réalisés sur 5 échantillons de 200 µl de plasma prélevés en intracardiaque.

15.1.2. Biochimie du sang dans le cas d'une greffe de CSM après une ICE

La cinétique du taux plasmatique d'urée réalisée sur 30 jours ayant mis en évidence une diminution significative de ce taux à J7, nous avons choisi d'observer l'effet d'une greffe de CSM post-ICE sur la biochimie du sang à ce temps (Figure 31).

Sept jours post-ICE sans greffe, le taux d'urée plasmatique diminue d'un facteur 1,3 ($p < 0,01$) (Figure 31A). Après greffe de CSM le taux d'urée est légèrement plus faible que dans les plasmas des animaux non-greffés mais cette différence n'est cependant pas significative. Le taux normal d'urée plasmatique 7 jours post-irradiation était normal pour 33% des souris greffées. L'absence de variation de la consommation hydrique et alimentaire de nos animaux, ainsi que la non observation de pertes digestives suggèrent que la diminution du taux d'urée plasmatique est liée à une insuffisance hépatique.

Sept jours après l'irradiation corps entiers, le taux de créatinine semble légèrement augmenté (10% plus élevé que le taux de créatinine des souris non-irradiées (témoins), mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 31B). L'injection de CSM n'a pas entraîné de diminution du taux de créatinine. Le taux plasmatique de créatinine a augmenté significativement de 20% chez les souris irradiées greffées par rapport aux souris témoins). L'addition d'une ICE et d'une greffe semble entraîner une augmentation de ce paramètre pouvant être liée à une défaillance de la fonction rénale puisque la valeur de la créatinémie est le reflet du débit de la filtration glomérulaire. Il faut noter que la concentration plasmatique de la créatinine dépend de l'élimination rénale et de la masse musculaire. Les animaux qui ont été greffés ne perdent pas de poids, suggérant que cette augmentation de la créatinine plasmatique est le reflet d'une perturbation de la filtration glomérulaire.

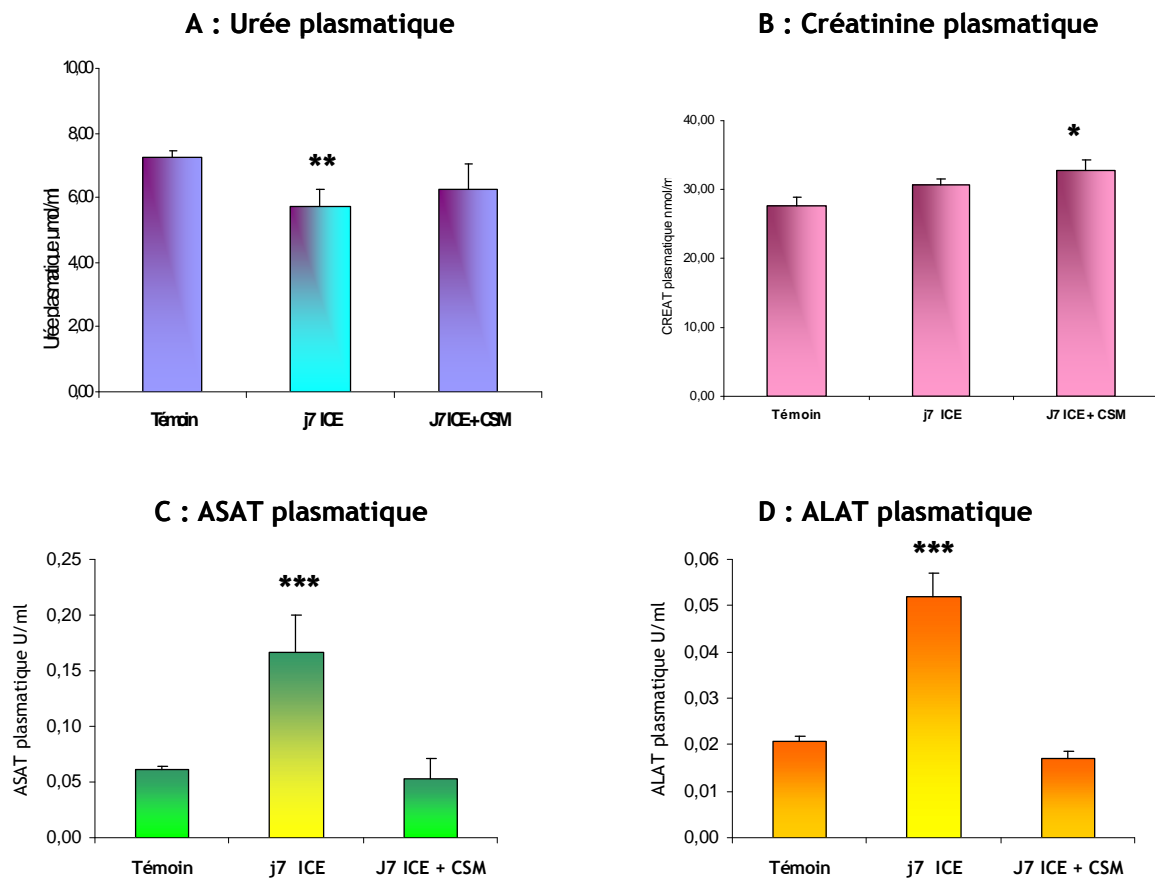


Figure 31 : Dosage plasmatique 7 jours post-ICE à 3,2 Gy. Les dosages biochimiques de l'urée, de la créatinine et des transaminases ont été réalisés sur des échantillons de 200 μ l de plasma prélevés en intracardiaque pour chaque groupe. Les taux plasmatiques des souris irradiées corps entier et des souris irradiées greffées sont comparés aux taux plasmatique des souris non-irradiées et non greffées (les témoins) par test-t.

Pour étudier l'atteinte hépatique mise en évidence par la diminution du taux d'urée plasmatique, nous avons dosé les transaminases (ASAT, ALAT) plasmatiques (Figure 31C et 31D). L'ICE a entraîné une augmentation du taux d'ASAT d'un facteur 2,8 ($p < 0.01$) par rapport aux souris témoins, mettant en évidence une perturbation hépatique post irradiation. Après greffe le taux d'ASAT plasmatique est comparable au taux des souris témoins. La greffe de CSM apparaît comme bénéfique pour les atteintes hépatiques induites par une ICE à 3,2 Gy.

15.1.3. Biochimie du sang dans le cas d'une greffe de CSM après une IA

La cinétique du taux d'urée pendant 30 jours post-IA, nous a permis d'observer que les variations des paramètres biochimiques du sang se situaient entre J1 et J7 post IA. Nous avons choisis d'observer l'effet d'une greffe de CSM sur la biochimie du sang 3 jours post-IA (Figure 32). Au cours de cette expérimentation, le poids des animaux ainsi que leur consommation hydrique et alimentaire sont suivis tous les jours.

En absence de greffe 7 jours post-IA, le taux d'urée plasmatique diminue d'un facteur 1,5 ($p < 0,01$) par rapport au taux des souris témoins (Figure 32A). Après greffe de CSM le taux d'urée est le même que pour les témoins. L'absence de variation de la consommation hydrique et alimentaire de nos animaux suggère que la diminution du taux d'urée plasmatique est liée à une insuffisance hépatique radio-induite. Dans ce cas d'irradiation locale au niveau de l'abdomen, la greffe de CSM semble avoir un effet bénéfique sur cette atteinte tissulaire. Il n'y a pas de différence significative du facteur de diminution du taux d'urée entre J3 post-IA et J7 post-ICE.

Trois jours post-IA, aucune variation du taux plasmatique de créatinine n'a été observée, par contre, l'injection de CSM a entraîné une augmentation du taux de créatinine d'un facteur 1,3 ($p < 0,01$) par rapport aux souris irradiées (Figure 32B). Quelque soit l'irradiation (ICE ou IA), le taux d'augmentation de la créatinine est le même, renforçant l'idée que l'implantation des CSM au niveau du rein peut perturber la fonction rénale.

Pour étudier l'atteinte hépatique mise en évidence par la diminution du taux d'urée plasmatique, nous avons dosé les transaminases plasmatiques (ASAT, ALAT) (Figure 32C et 32 D). Il y a une augmentation isolée et prédominante du taux d'ASAT plasmatiques qui pourrait refléter une souffrance extra-hépatique radio induite. La greffe de CSM ne

diminue pas le taux d'ASAT plasmatique en comparaison au taux des souris irradiées. Les CSM semblent ne pas avoir d'effet bénéfique sur une atteinte extra-hépatique induite par une IA.

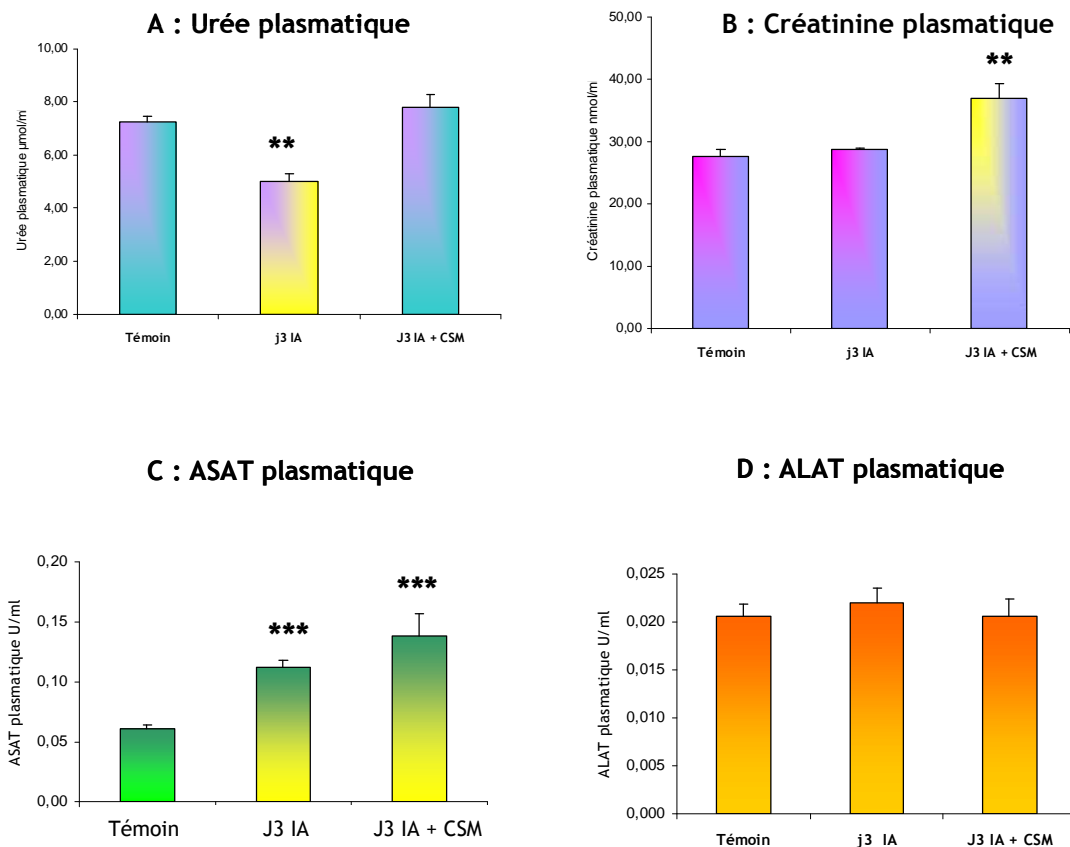


Figure 32: Dosage plasmatique 3 jours post-IA à 8 Gy. Les dosages biochimiques de l'urée, de la créatinine et des transaminases ont été réalisés sur des échantillons de 200 μl de plasma prélevés en intracardiaque pour chaque groupe. Les taux plasmatiques des souris irradiées corps entiers et des souris irradiées greffées sont comparés aux taux plasmatiques des souris non-irradiées et non greffées (les témoins) par un test-t.

Sachant que les souris irradiées au niveau de l'abdomen reçoivent préalablement une ICE à 3,2 Gy, l'addition d'une IA à 4,8 Gy semble avoir modifié les temps d'apparition des atteintes radio-induites et les organes cibles des RI ne semblent plus être les mêmes. L'IA semble entraîner une diminution de l'activité hépatique et une souffrance extra-hépatique qui pourrait être d'origine musculaire tel qu'une atteinte du myocarde. Il semble exister

une perturbation rénale dépendante de la présence des CSM dans cet organe. Pour conclure définitivement sur une atteinte rénale, il faudrait calculer la clairance. Le nécessaire confinement des animaux en cage stérile empêche malheureusement l'utilisation des cages à métabolisme.

15.2. Effets d'une greffe de CSM sur l'homéostasie intestinale après une IA

L'Irradiation abdominale entraîne une variation de la taille des villosités intestinales ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques et proliférantes. Pour déterminer un effet bénéfique d'une greffe de CSM sur les altérations du jéjunum après irradiation, la taille des villosités, le nombre de cellules en apoptose et le nombre de cellules en prolifération ont été quantifiés chez les souris irradiées et greffées et comparés aux souris irradiées.

15.2.1. Effet d'une greffe de CSM sur la taille des villosités intestinales

La mesure de la taille des villosités a été réalisée après marquage trichromique HES des coupes de jéjunum. L'irradiation abdominale a entraîné une diminution significative de la taille des villosités dans les jéjunums prélevés 3 jours post-IA par rapport au jéjunum des souris non-irradiées (témoins). Pour observer un effet de la greffe de CSM sur le jéjunum nous avons mesuré la taille des villosités sur des coupes de jéjunum de souris shams (non-irradiées greffées) et de souris (irradiées -greffées) (Figure 33). La taille des villosités intestinales des souris shams est significativement plus grande que celle des souris témoins (Figure.33 A3). La greffe a entraîné une augmentation d'un facteur 1,4 ($p < 0,001$) de la taille des villosités dans le jéjunum prélevé 24 heures après injection, suggérant que les CSM stimulent l'auto-renouvellement naturel de l'intestin. La taille des villosités intestinales des souris irradiées-greffées est significativement plus grande que celle des souris uniquement greffées (shams) et des souris témoins (Figure 33 A4). Les villosités sont 1,8 fois plus grandes dans le jéjunum des souris irradiées-greffées en comparaison aux

souris témoins et 1,2 fois plus grandes que pour les souris shams. Dans le jéjunum des souris irradiées-greffées des foyers prolifératifs ont été observés (Figure 33 A5). La stimulation de l'auto-renouvellement naturel de l'intestin par les RI semble augmentée chez les souris irradiées-greffées.

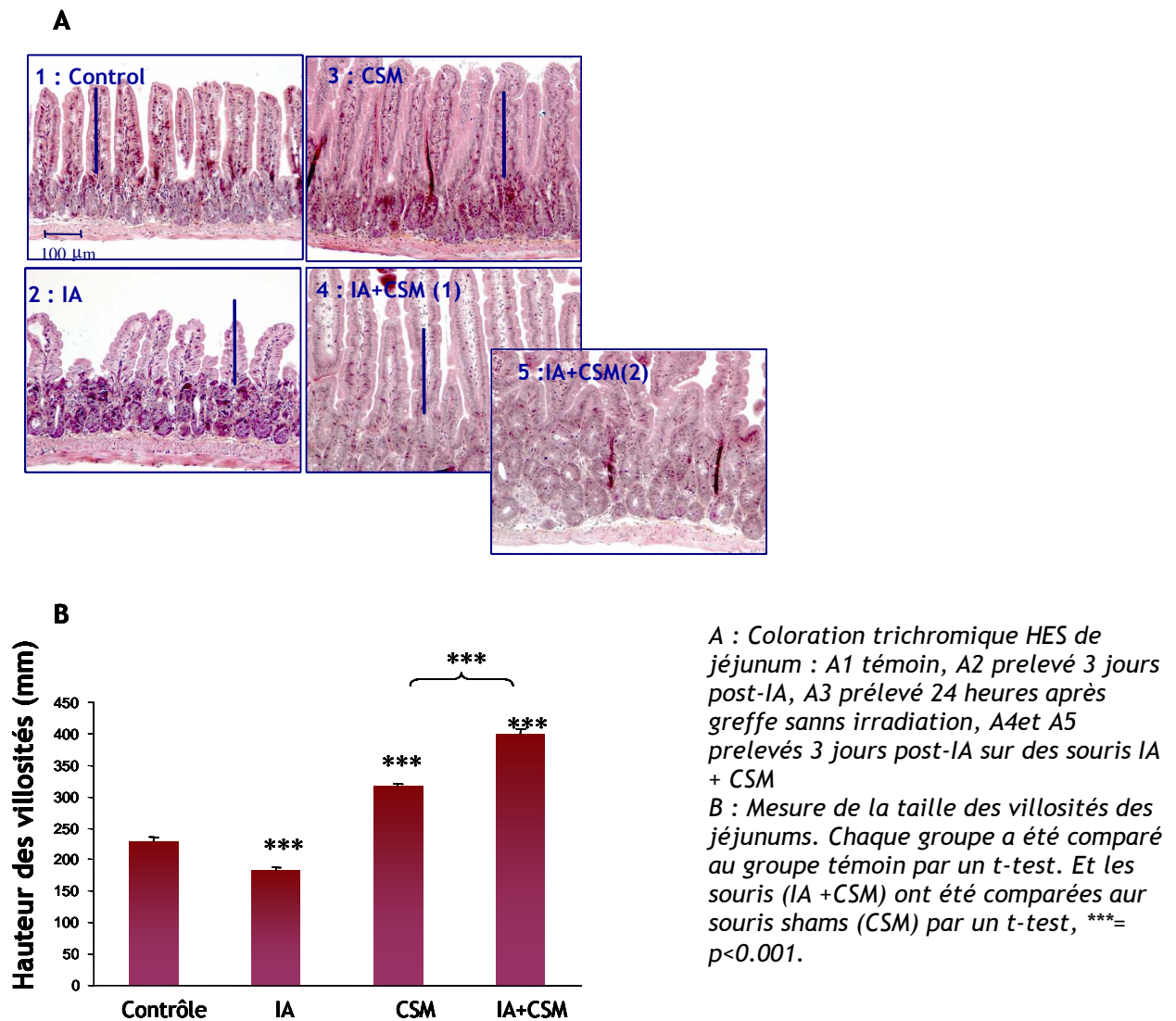


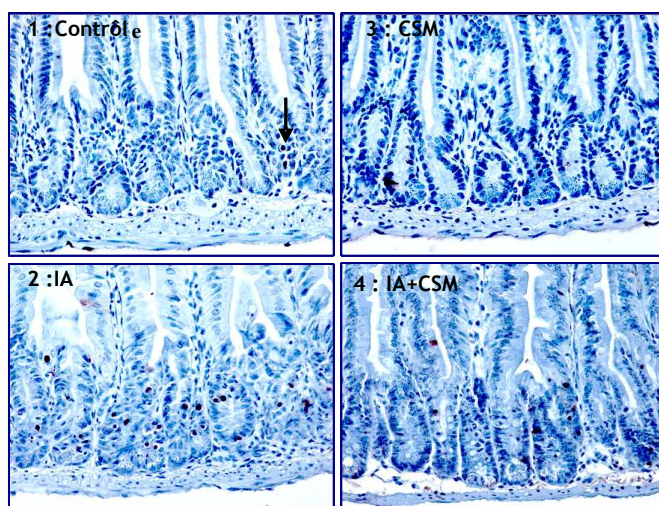
Figure 33 : Effets d'une greffe de CSM sur la taille des villosités intestinales après irradiation abdominale

15.2.2. Effets d'une greffe de CSM sur l'apoptose intestinale

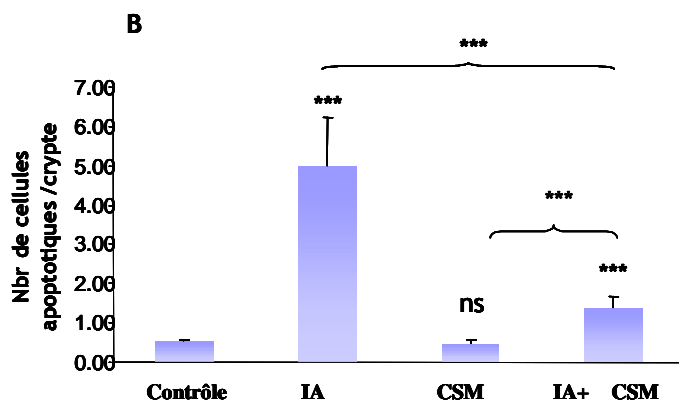
La quantification des cellules apoptotiques a été réalisée après marquage immunohistochimique TUNEL des coupes de jéjunum. L'irradiation abdominale a entraîné

une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques, 3 jours post-IA par rapport aux souris non-irradiées (contrôle). Pour observer un effet de la greffe de CSM sur le jéjunum nous avons quantifié le nombre de cellules apoptotiques dans les cryptes de jéjunum des souris shams (non-irradiées greffées) et de souris (irradiées -greffées) (Figure 34). La greffe de CSM ne modifie pas le taux de cellules apoptotiques par rapport aux souris contrôles. Les CSM ne semblent pas avoir d'effet toxique au niveau de l'intestin (Figure 34A). La greffe de CSM entraîne une diminution significative d'un facteur 2,5 ($p < 0,001$) du taux de cellules apoptotiques dans le jéjunum des souris irradiées en comparaison aux souris irradiées non greffées (IA). Le taux de cellules apoptotique reste significativement plus important chez les souris irradiées-greffées en comparaison aux souris contrôles (Figure 34B). La greffe de CSM semble avoir un effet anti-apoptotique au niveau du jéjunum 3 jours post-IA.

A



B



A : Marquage immunohistochimique TUNEL de jéjunum : A1 témoin, A2 prélevé 3 jours post-IA, A3 prélevé 24 heures après greffe sans irradiation, A4 prélevés 3 jours post-IA sur des souris IA + CSM
 B : Quantification des cellules apoptotiques des jéjunums. Chaque groupe a été comparé au groupe témoin par un t-test. Et les souris (IA +CSM) ont été comparées aux souris shams (CSM) et aux souris shams (CSM) par un t-test, ***= $p < 0.001$. et ns (non

Figure 34 : Effets d'une greffe de CSM sur l'apoptose intestinale après irradiation abdominale

15.2.3. Effet d'une greffe de CSM sur la prolifération cellulaire intestinale

La quantification des cellules en prolifération a été réalisée après marquage immunohistochimique de la protéine Ki67 murine sur des coupes de jéjunum. L'irradiation abdominale a entraîné une augmentation significative du nombre de cellules en prolifération en comparaison aux souris non-irradiées (contrôle) 3 jours post-IA. Pour observer un effet de la greffe de CSM sur la prolifération des cellules murines intestinales nous avons quantifié le nombre de cellules proliférantes dans le jéjunum des souris shams (non-irradiées greffées-CSM) et de souris (irradiées (IA) -greffées-CSM) (Figure 35). Les CSM semblent stimuler la prolifération des cellules murines intestinales le jéjunum non-irradiés. Dans le jéjunum des souris irradiées-greffées il ya 10% en plus de cellules murines proliférantes que dans le jéjunum des souris uniquement greffées. La greffe de CSM semble augmenter l'effet stimulateur de la prolifération cellulaire en partie induite par la réponse intestinale aux RI.

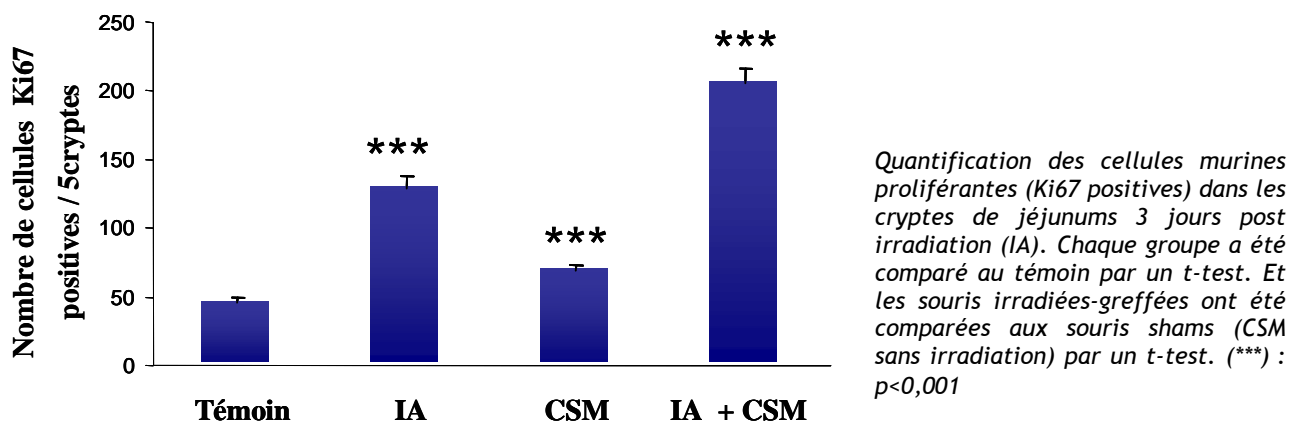


Figure 35 : effet d'une greffe de CSM sur la prolifération intestinale après irradiation abdominale

15.3. Effets d'une greffe de CSM sur la sécrétion de cytokines, chemokines et MMPs 48h post irradiations

Pour étudier l'état inflammatoire et évaluer la mise en place d'un processus d'aide à la migration cellulaire de cellules progénitrices des souris NOD/SCID après d'irradiation, nous avons quantifié les taux de certaines cytokines, chemokines et MMPs circulantes 48 heures post-irradiation et ce pour les 3 configurations étudiées. Tous les dosages ont été effectués par la technique ELISA par le laboratoire Perbio sur 150 µl de sérum.

15.3.1. Effets d'une greffe de CSM sur les taux sériques de cytokines

Les taux sériques de certaines cytokines sont trop faibles pour être détectables même chez les souris irradiées où l'inflammation devait être la plus prononcée. Par exemple les taux sériques de GM-CSF sont inférieurs à 0,8 pg/ml, d'IFN gamma (IFN- γ) inférieurs à 7,8 pg/ml et de TNF-alpha inférieurs à 3,2 pg/ml. Les taux sériques des interleukines étudiées telles qu'Il-1- β , Il-2, Il-4, Il-6, Il-8 et Il-10 sont également inférieurs au seuil de détection (tableau XV). En revanche le taux sérique d'Il-1 α a été détectable dans tous les cas. Pour cette molécule, 48h post-irradiation abdominale à 8Gy, une augmentation d'un facteur 2 ($p < 0,05$) est observable (figure 36A) par rapport aux souris non-irradiées (témoin). La greffe de CSM chez des souris non irradiées n'a pas entraîné de variation significative du taux d'Il-1 α circulante en comparaison aux taux témoins (Figure 36B). Le taux sérique d'Il-1 α 48 h post-IA est comparable au taux témoin qui est de $3,97 \pm 0,47$ pg/ml. La greffe de CSM 24 heures après une IA à 8Gy entraîne une diminution du taux d'IL-1 α circulante en comparaison aux souris irradiées (figure 36B). La greffe semble corriger l'augmentation d'Il-1 α induite par l'irradiation.

Le dosage de l'ostéopontine (OPN) qui est une cytokine pro-inflammatoire et dont l'élévation plasmatique a été corrélé à certaines pathologies vasculaires (Ohsuzu et al 2004) a été réalisée 48 heures post-irradiation. Dans le modèle murin NOD/SCID son taux de base est de 52757 ± 1833 pg/ml. A 48 heures post-irradiation aucune variation

significative du taux d'OPN circulantes n'a été détectée. Avec ou sans exposition aux RI, l'injection de CSM n'a pas modifié le taux sérique d'OPN des souris NOD/SCID.

Tableau XV : Dosage sérique des interleukines

Interleukine	Taux sérique en Pg/ml
IL-1b	< 3,2
IL-2	< 0,8
IL-4	< 7,8
IL-6	< 5,4
IL-8 (KC)	< 1,6
IL-10	< 1,6

Les taux sériques des interleukines ont été mesurés suivant la technique ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48 heures post-irradiation.

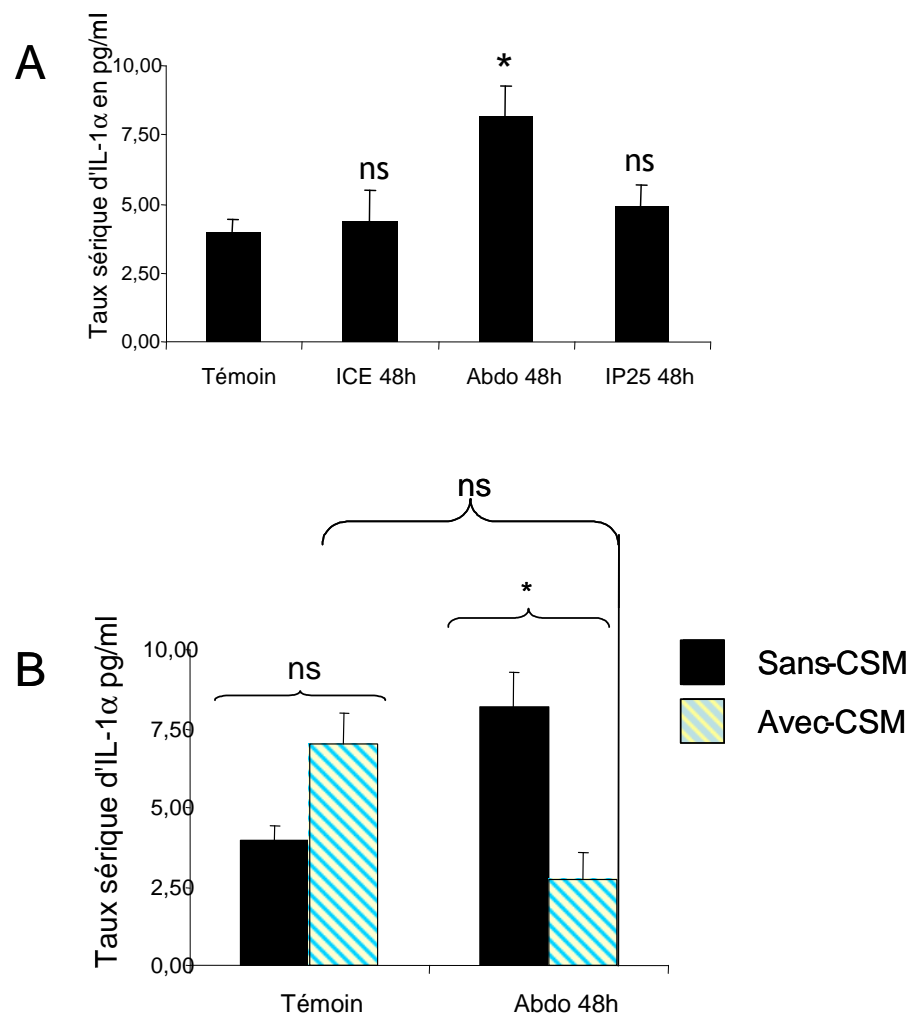


Figure 36 : Effet d'une greffe sur les taux sérique d'IL-1 α 48 heures post-irradiation. Les taux sériques de l'IL- α ont été mesurés suivant la technique ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID.

(A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test.

(B), le taux sérique témoin est comparé aux taux sérique moyen des souris 24 heures après greffe. Le taux sérique moyen des souris irradiées à 8 gy au niveau de l'abdomen (en noir) est comparé aux taux sériques des souris irradiées-greffées (hachuré en bleu) par un t-test.

15.3.2. Effets d'une greffe de CSM sur les taux sériques de chemokines

Nous avons mesuré les taux sériques de SDF-1bêta, TARC, RANTES et MCP-1 murin, 48h après irradiation selon les 3 configurations étudiées. Les taux sériques de MIP1- α (Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha) sont trop faibles pour être détectables même chez les souris irradiées où l'inflammation devait être plus prononcée. Les taux sériques de MIP1- α ne sont pas détectables chez tous les animaux prélevés.

Quelque soit la configuration d'irradiation à 48 heures post-exposition le taux sérique de SDF-1 bêta (Stromal cell-Derived Factor 1) murin ne varie pas significativement et la greffe de CSM ne modifie pas son taux basal de $789,3 \pm 85,7$ pg/ml. Il faut noter que pour ce dosage une grande variabilité inter-souris a été observée, ce qui a pu empêcher l'observation de variations significatives.

En comparaison au taux sérique témoin de TARC ($95,2 \pm 3,5$ pg/ml), seules les souris irradiées en corps entier ont un taux de TARC augmenté et ce d'un facteur 2 ($p < 0,01$) 48 heures post-irradiation. Pour les souris irradiées localement au niveau de l'abdomen ou à la patte droite postérieure, il n'y a aucune variation significative de TARC circulante (Figure 37A). Ce dosage met en avant les différences de réponse du système de chemokines suivant la configuration d'irradiation à un instant t post-irradiation. La greffe de CSM sans irradiation ne modifie pas le taux basal de protéines TARC circulantes. En revanche lorsque les CSM sont injectées 24 heures après une IA, le taux de TARC est le même que celui des souris témoins (Figure 37B). L'injection de CSM semble empêcher la libération de la protéine TARC dans la circulation sanguine.

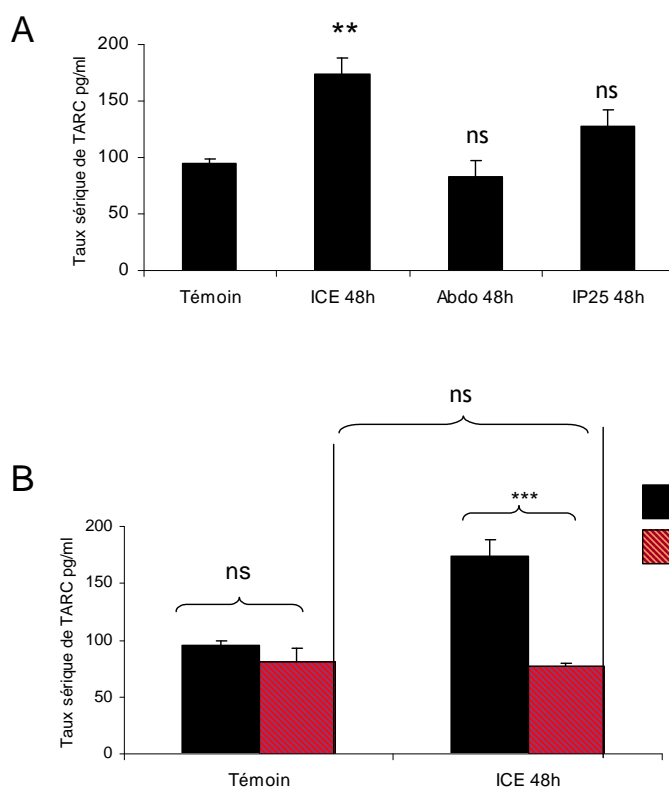


Figure 37 : Dosage sérique de TARC 48 heures post-irradiation. Les taux sériques de TARC ont été mesurés par ELISA sur 150 μ l de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID. (A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test. (B), le taux sérique témoin est comparé aux taux sérique moyen des souris 24 heures après greffe. Le taux sérique moyen des souris irradiées corps entier (TBI)(en noir) est comparé aux taux sériques des souris irradiées-greffées (hachuré en rouge) par un t-test.

En comparaison au taux témoin, quelque soit l'irradiation, le taux sérique de RANTES est significativement augmenté 48 h post-exposition, d'un facteur 5 ($p < 0,001$) après une irradiation corps entier et d'un facteur 3 ($p < 0,05$) dans les 2 configurations d'irradiation localisées (IA et IP), (Figure 38A). Aucune différence significative du taux de RANTES circulantes entre les souris irradiées à l'abdomen ou à la patte postérieure n'a été observée. Par contre le taux sérique est en moyenne 1,6 fois plus élevé 48 h après une ICE à 3,2 Gy qu'après une irradiation localisée (Figure 38A). L'injection seule de CSM a entraînée une augmentation significative du taux de RANTES d'un facteur 2,6 ($p < 0,05$) par rapport au taux sérique basal. Dans le cas d'une greffe de CSM 24 heures après irradiation, il y a un effet opposé de la greffe qui entraîne une diminution d'un facteur 2,7 ($p < 0,001$)

du taux de RANTES dans le cas d'une ICE et celui-ci est comparable au taux témoin ($2,0 \pm 0,3$ pg/ml) (Figure 38B). Il faut noter que RANTES ne retourne pas à son taux basal après greffe de CSM dans le cas des irradiations localisées.

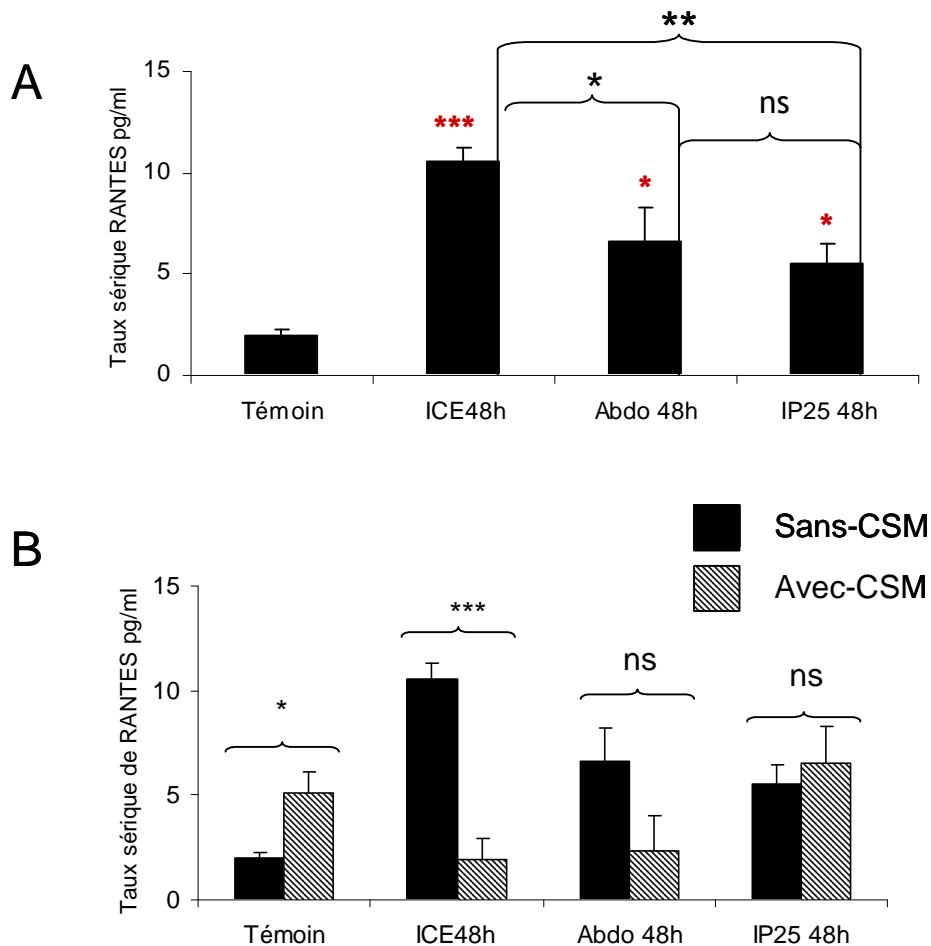


Figure 38 : Dosage sérique de RANTES 48 heures post-irradiation. Les taux sériques de RANTES ont été mesurés par ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID. (A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test. (B), le taux sérique des souris non greffées (en noir) a été comparé aux taux sériques des souris greffées (hachuré) par t-test.

De même que pour RANTES, en comparaison aux taux témoins, le taux sérique de MCP-1 est augmenté significativement 48 heures après les 3 types de configurations (ICE, IA et IP), (Figure 39A). Le Taux de MCP-1 circulantes 48 h après une ICE est 19 fois plus élevé que le taux témoin ($p < 0,001$). Il n'y a aucune différence significative du taux de MCP-1 entre les sérums prélevés 48 h après IA ou après IP. Dans les deux cas d'irradiations localisées, il est augmenté d'un facteur moyen de 12 ($p < 0,01$). Le taux de MCP-1 circulant

48 heures post-exposition aux RI est significativement plus élevé après une ICE à 3,2 Gy en comparaison aux irradiations localisées et ce d'un facteur moyen de 1,6, (Figure 39A). Vingt quatre heures après injection de CSM dans des souris non-irradiées. L'injection de CSM aux souris non-irradiées n'entraîne pas de variation du taux sérique de MCP-1 par rapport aux taux témoins (Figure 39B). En revanche, l'injection de CSM réalisée 24 heures après une ICE ou après une IA entraîne une diminution significative d'un facteur 4 ($P<0,001$) de ce taux en comparaison aux souris irradiées. Ce taux chez les souris irradiées-greffées ne retourne pas à son taux de base de $89,0 \pm 2,7$ pg/ml. En revanche, l'injection de CSM n'entraîne aucune variation significative du taux sérique de MCP-1 après une irradiation localisée de la patte droite postérieure par rapport aux souris irradiées (Figure 40B), celui reste élevé à $1036,4 \pm 49,05$ pg/ml (Figure 39B). Il apparaît une différence d'effet de la greffe de CSM sur le taux de certaines cytokines suivant la configuration d'irradiation.

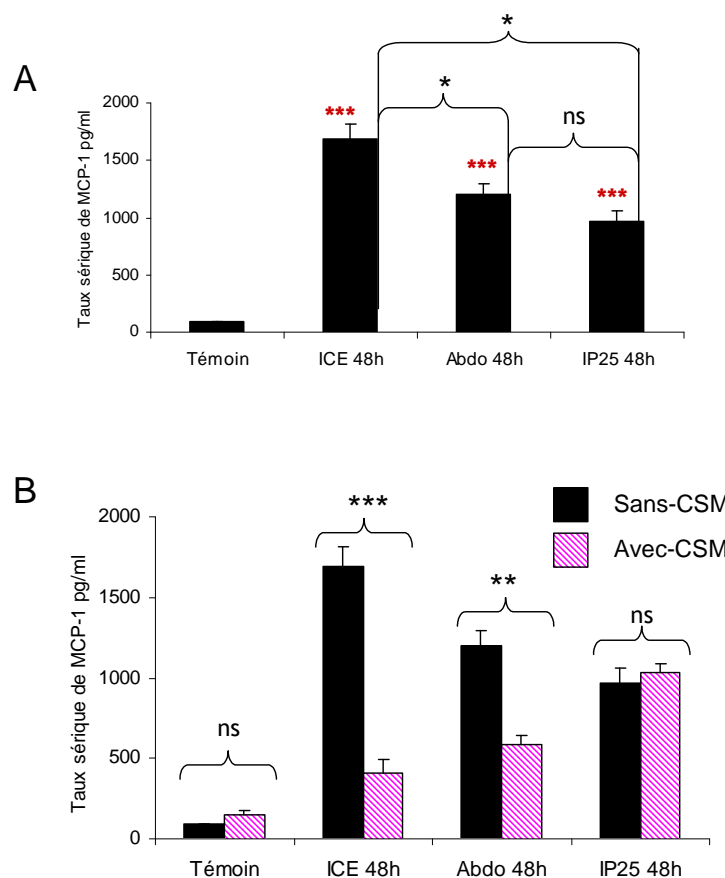


Figure 39 : Dosage sérique de MCP-1 48 heures post-irradiation. Les taux sériques de MCP-1 ont été mesurés par ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID. (A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test. (B), le taux sérique des souris non greffées (en noir) a été comparé aux taux sériques des souris greffées (hachuré) par t-test.

15.3.3. Effets d'une greffe de CSM sur les taux sériques de métalloprotéinases

La migration cellulaire met en œuvre deux familles d'enzymes hydrolytiques : les sérines et les métalloprotéases matricielles (MMPs). Pour étudier la mise en place d'un processus d'aide à la migration cellulaire de cellules progénitrices pour aller vers les sites altérés, nous avons choisi de mesurer les taux sériques de MMP9 et MMP2 (Figure 40 et 41). Les taux sériques de MMP9 et de MMP2 chez les souris NOD/SCID non traitées sont respectivement de $9213,8 \pm 1695,3$ pg/ml et $94329,6 \pm 12722,0$ pg/ml. Chez les souris témoins, on observe qu'il y a significativement plus de MMP2 ($p < 0,01$) circulantes que de MMP9 circulantes ($p < 0,01$). A 48 heures post-irradiation, un pic de MMP9 circulantes s'observe de manière significative uniquement après une ICE à 3,2 Gy et non après une irradiation localisée de l'abdomen ou de la patte postérieure en comparaison au taux témoin. Le taux sérique augmente d'un facteur 3 ($p < 0,01$), 48 heures post-ICE (Figure 40A). Par contre, dans le cas d'une ICE, 24 heures après l'injection on observe une diminution significative du taux de MMP9 en comparaison au taux sérique des souris irradiées (Figure 40B). Les souris irradiées en corps entier et greffées ont un taux sérique de MMP9 comparable au taux témoin. La greffe de CSM sans irradiation n'entraîne pas de variation du taux sérique de MMP9 (Figure 40B). La greffe de CSM semble atténuer l'augmentation du taux sérique de MMP9 induite par une irradiation corps entier.

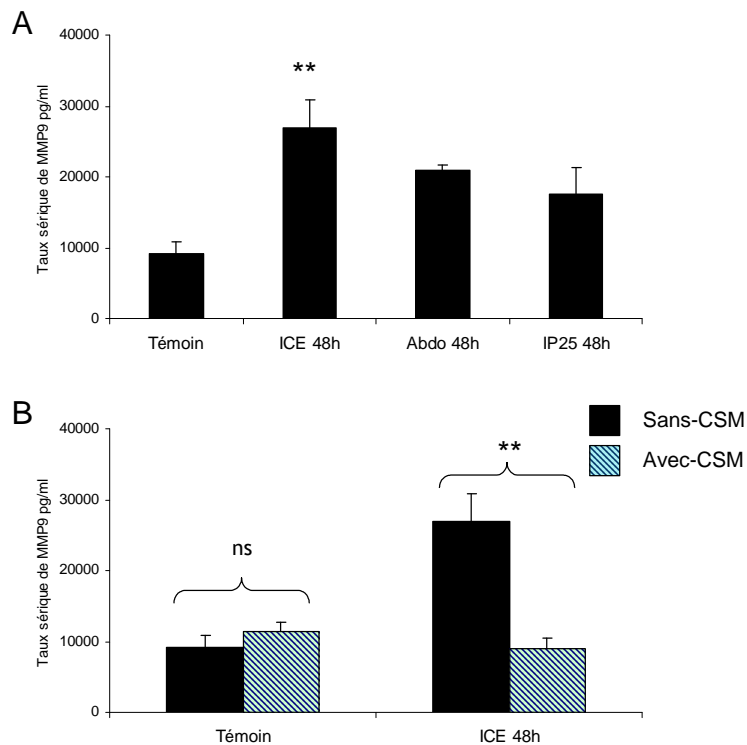


Figure 40 : Dosage sérique de MMP9 48 heures post-irradiation

Les taux sériques de MMP9 ont été mesurés par ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID.

(A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test.

(B), le taux sérique des souris non greffées (en noir) a été comparé aux taux sériques des souris greffées (hachuré en bleu) par t-test.

Quarante huit heures post-irradiation, on peut observer une augmentation significative du taux de MMP2 circulantes pour les 3 configurations étudiées en comparaison aux taux témoins, celui-ci a augmenté d'un facteur 1,7 ($p < 0,05$) dans le cas d'une ICE à 3,2 Gy, d'un facteur 2 ($p < 0,01$) le cas d'une IP 25 Gy et d'un facteur 2,4 ($p < 0,01$) dans le cas d'une IA à 8 Gy (Figure 41A). La comparaison des taux sériques de MMP2 entre les 3 configurations d'irradiation ne met en évidence aucune différence significative entre ces taux. La greffe de CSM dans les souris non irradiées n'entraîne pas de variation significative du taux de base de MMP2 circulantes en comparaison au témoin (Figure 41B). La greffe de CSM n'a pas d'effet sur le taux de MMP2 sériques des souris irradiées localement à l'abdomen ou à la patte postérieure. En revanche l'injection de CSM 24 heures après une ICE entraîne une diminution du taux de MMP2 d'un facteur 1,6 ($p < 0,05$) par rapport au taux sérique des souris irradiées, et celui-ci est comparable au taux témoin (Figure 41B).

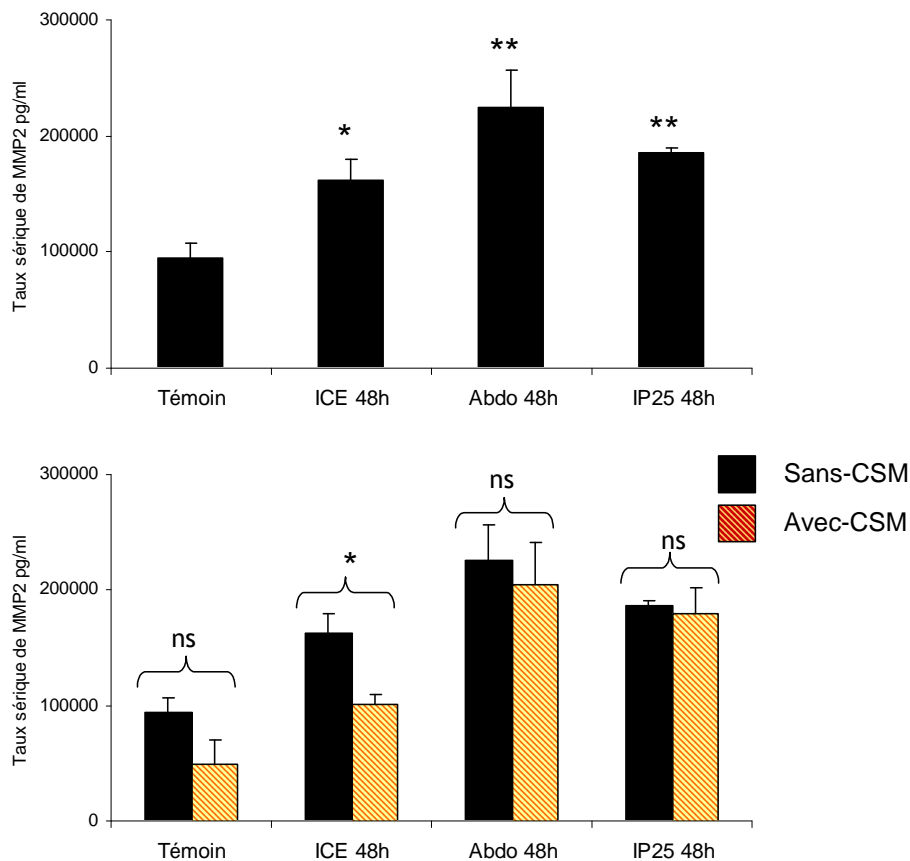


Figure 41 : Effets d'une greffe de CSM sur le taux sérique de MMP2 après irradiation. Les taux sériques de MMP2 ont été mesurés par ELISA sur 150µl de sérum prélevé 48h post-irradiation chez la souris NOD/SCID.

(A), chaque taux moyen obtenu après irradiation est comparé au taux moyen témoin par un t-test.

(B), le taux sérique des souris non greffées (en noir) a été comparé aux taux sériques des souris greffées (hachuré en bleu) par t-test.

Le tableau XVI illustre l'effet modulateur d'une greffe de CSM sur la sécrétion de cytokines, chemokines et MMPs dans la circulation sanguine des souris NOD/SCID irradiées. D'après le tableau XVI, les profils des protéines circulantes sont différents suivant les configurations d'irradiations 48 heures après exposition. L'effet d'une greffe de CSM apparaît différent pour les 3 configurations d'irradiation.

Tableau XVI : Effet modulateur d'une greffe de CSM sur le taux de cytokines, chemokines et MMPs circulantes.

Protéines sériques	Témoin	Non irradié greffé	ICE	ICE +CSM	I A	IA +CSM	IP	IP +CSM
IL-1 α	4,0 \pm 0,5 pg/ml	0	0	0	+	-	0	0
TARC	95,2 \pm 3,5 pg/ml	0	+	-	0	0	0	0
RANTES	2,0 \pm 0,3 pg/ml	+	+	-	+	+	+	+
MCP-1	89,0 \pm 2,7 pg/ml	0	+	-	+	-	+	+
MMP2	94329,6 \pm 12721 pg/ml	0	+	-	0	0	0	0
MMP9	9213,7 \pm 1695,3 pg/ml	0	+	-	+	+	+	+

Les effets d'une greffe de CSM les les taux de cytokines, chemokines et MMP sériques (+) : une augmentation du taux sérique de la protéine dosée, (-) une diminution du taux sérique et (0) aucune variation

Dans le cas d'une ICE à 3,2 Gy

Quarante huit heures post-ICE, on observe une augmentation du taux des chemokines circulantes (TARC, RANTES, MCP-1) ainsi que des métalloprotéases (MMP2 et MMP9) par rapport aux souris non irradiées. Il semble que l'organisme irradié corps entier à une dose sublétales a activé ses systèmes d'attraction et de migration des cellules progénitrices. En présence de CSM, les chemokines et MMPs qui étaient sécrétées en plus grande quantité 48 heures post-irradiation sont redescendues à des valeurs comparables aux taux témoins.

Dans le cas d'une irradiation localisée

Quarante huit heures post-irradiation, le taux d'IL-1 α circulante est plus élevé dans le cas d'une IA que dans le cas d'une IP. La greffe de CSM entraîne une diminution de ce taux sérique d'interleukine IL-1 α à 48 heures post-IA. Dans les 2 configurations d'irradiations localisées le taux de TARC et de MMP9 circulantes est le même que sans irradiation. En revanche, 48h après les irradiations localisées on observe une augmentation significative des taux sériques de RANTES, MCP-1 et MMP2 en comparaison aux taux témoins. La greffe

de CSM n'a aucun effet sur l'augmentation de RANTES et MMP2 à ce temps. Le temps d'observation pourrait être trop précoce pour mettre en évidence un effet de la greffe sur le taux sérique de ces protéines. En revanche suite à une IA, 24 h après greffe de CSM, il y a une diminution significative du taux sérique de MCP-1 en comparaison aux taux des souris irradiées à l'abdomen et non greffées.

Ces dosages sériques réalisés 48 heures post-ICE, nous ont permis d'observer le maximum d'effet modulateur des CSM sur les chemokines et MMP étudiées.

15.3.4. Conclusions

Ces expériences montrent que la migration des CSM dépend de la configuration, de la dose et du temps post-irradiation. L'injection par voie intraveineuse de $5 \cdot 10^6$ CSM humaines est suffisante pour leur permettre de s'implanter dans un grand nombre d'organes irradiés et de rétablir l'homéostasie intestinale 3 jours post-IA. La biodistribution des CSM après irradiation suggère une migration dose-dépendante préférentielle des CSM vers les organes de la zone surexposée. L'implantation des CSM autour des axes péri-vasculaires et dans des unités fonctionnelles, ainsi que la diminution de l'expression de certains gènes spécifiques des CSM, suggèrent une modulation phénotypique tissu-spécifique.

DISCUSSION

DISCUSSION

Le travail réalisé au cours de cette thèse avait pour but d'évaluer la capacité des CSM à coloniser et rétablir l'homéostasie tissulaire après irradiation. Nous avons utilisé le modèle de greffe de CSM humaines dans des souris immunotolérantes (NOD/SCID) irradiées. Pour ce faire, des modèles d'irradiation corps entier et localisées ont été développés. La localisation et la différenciation des cellules humaines implantées au sein des organes murins ont été explorées. La modulation de l'inflammation radio induite par des CSM dans le processus de réparation tissulaire après irradiation corps entiers ou locale aiguë sur le modèle murin NOD/SCID a été étudiée. L'impact d'une greffe de CSM sur la reprise fonctionnelle et la régénération des organes ont été évalués. L'étude de la biodistribution et la localisation *in situ* des CSM a représenté une partie importante de ce travail

16. La greffe de CSM comme stratégie thérapeutique pour le traitement des atteintes tissulaires radio-induites

Le concept d'une mise en place progressive du dysfonctionnement de plusieurs organes comme conséquence d'une irradiation sévère est apparu avec le retour d'expérience des accidents de Neshvitzh ou Tokai-Mura (Hirama et al. 2003). Dans cette approche, l'issue fatale du SAI n'est plus causée par la défaillance d'un seul organe mais est la conséquence de l'atteinte de plusieurs organes interdépendants incapables de maintenir leurs fonctions homéostasiques, et qui conduisent à terme à un syndrome de défaillance multi-organes. Cette physiopathologie impliquant la combinaison de diverses atteintes fait que le traitement d'une victime d'irradiation accidentelle à forte dose reste très délicat. L'atteinte des compartiments souches de l'organisme étant trop importante, la capacité de régénération tissulaire devient insuffisante et la perte de fonctionnalité est irréversible. Il est donc capital de compenser la déplétion des compartiments souches qui semble être la principale cause du SAI. La thérapie cellulaire propose le remplacement ou la régénération des cellules non fonctionnelles par des cellules saines et fonctionnelles.

Les cellules souches mésenchymateuses isolées de MO possèdent un potentiel important d'auto-renouvellement et de différenciation multiple ainsi que des propriétés de régulations immunologiques et inflammatoires. Chez l'homme il a été montré que les CSM participaient au soutien hématopoïétique et à la reprise fonctionnelle des organes après lésions (Barry *et al.* 2004). La thérapie cellulaire basée sur la greffe de CSM semble une approche particulièrement prometteuse et innovante pour le traitement des irradiations accidentelles et même des effets tardifs liés à la radiothérapie.

17. Implantation des CSM dans les tissus irradiés.

L'irradiation abdominale de 4.8 Gy a été surajoutée à une ICE de 3,2 Gy dans le but de réaliser une IA d'une dose totale de 8 Gy. Les atteintes radio-induites et leur temps d'apparition semblent différents entre une ICE et une IA, suggérant que la surexposition de la sphère abdominale a modifié la réponse initiale de l'organisme à l'ICE. L'étude du profil de sécrétion des protéines pro-inflammatoires 48h post-irradiation a permis d'observer des différences entre une ICE, une IA et une IP. Il y a une plus grande quantité de TARC, RANTES, MCP-1, MMP2 et MMP9 sériques dans le cas d'une ICE en comparaison à une IA et une IP à ce temps post-exposition. L'IL-1 α joue un rôle essentiel dans l'inflammation, la synthèse des protéines hépatiques de l'inflammation et la production d'ACTH (Dinarello 1996). L'augmentation du taux sérique de cette interleukine pléiotrope a été observée dans le cas d'IA et non après une ICE et une IP, suggérant que suivant la configuration d'irradiation à un instant donné, l'organisme irradié n'a pas les mêmes processus inflammatoires activés.

L'injection intraveineuse de $5 \cdot 10^6$ CSM humaines dans le modèle murin NOD/SCID irradié et non irradié n'a pas été associée à la perte d'animaux, ni à une perte de poids, suggérant que la greffe de CSM n'induit pas de toxicité importante. La non toxicité de la greffe de CSM avait déjà été évaluée chez l'homme (Koc *et al.* 2000; Le Blanc *et al.* 2004) et chez les souris NUDE non-conditionnées (Allers *et al.* 2004).

La biodistribution des CSM dans les souris NOD/SCID non-irradiées révèle à 14 jours post-injection que les CSM sont présentes dans tous les organes prélevés à l'exception de l'estomac. C'est uniquement à J15 que la biodistribution des CSM humaines semble maximale dans le modèle murin NOD/SCID. Nos résultats de biodistribution des CSM paraissent en désaccord avec ceux obtenus chez la souris NUDES (Allers et al. 2004), où la biodistribution des CSM est importante dans les 180 premières minutes suivant l'injection, puis de 1 semaine à 3 mois les CSM sont localisées dans peu d'organes et l'implantation devient maximale entre 4 et 13 mois. A 15 jours post-injection dans le modèle nude, les CSM sont présentes uniquement dans la rate et la moelle osseuse des souris nude. La différence de biodistribution des CSM pourrait être liée à la concentration de CSM injectées et aux modèles immunodéficients murins utilisés. La mise en évidence de l'implantation des CSM dans des organismes non-conditionnés pourrait fournir un avantage supplémentaire à la thérapie cellulaire en évitant la partie du conditionnement des patients nécessaire à l'amélioration de la prise de greffe. Il reste cependant à étudier le devenir phénotypique des CSM implantées et leur devenir à long terme dans un organisme non-conditionné avant de ne plus réaliser de pré conditionnements (ICE) des patients avant greffe.

En comparaison avec les souris NOD/SCID non-irradiées, l'irradiation augmente significativement le nombre de sites colonisés et le taux d'implantation des CSM, suggérant une augmentation de leur migration vers les sites altérés par les rayonnements ionisants. Les irradiations localisées que nous avons mises au point sur les souris NOD/SCID ont entraîné la colonisation par les CSM des organes de la zone la plus exposée, mais aussi des organes de des animaux qui n'ont reçus que l'irradiation corps entier. La mise en évidence de la colonisation d'organes des zones non lésées par les CSM a été également observée lors d'une injection systémique de ces cellules après ischémie cardiaque (Kraitchman *et al.* 2005). De plus, l'interaction entre les différents organes a déjà été observée avec d'autres types de lésions sévères : c'est ainsi que des dysfonctionnements gastro-intestinaux et pulmonaires ont été mis en cause dans les conséquences de brûlures thermiques, de chocs

hémorragiques (Messick et al. 1994; Kuebler et al. 2003) et dans des situations cliniques consécutives à divers traumatismes (mécaniques, chimiques, infectieux...) ou suite à un état de choc (Deitch et al 2001). L'ischémie cardiaque et l'exposition aux RI pourraient déclencher la mise en place d'un continuum d'effets secondaires pouvant aboutir à la défaillance progressive de différents organes.

En absence d'irradiation, les CSM sont retrouvées à des taux élevés 14 jours post-injection. L'irradiation augmente significativement la colonisation de la moelle osseuse murine par les CSM humaines. La barrière d'espèce ne semble pas empêcher l'implantation des CSM. Le suivi des NFS des souris NOD/SCID irradiées n'a pas révélé de chute du nombre des cellules sanguines, nous empêchant de révéler l'impact de notre greffon sur la reprise hématopoïétique. Cependant, dans une étude antérieure, nous avons observé que la sous-population de CSM STRO-1⁻ a un meilleur impact sur la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques que les CSM STRO-1⁺ (Bensidhoum et al. 2004). Cette observation, ainsi que les nombreux travaux réalisés sur les co-greffes de CSM et de CSH mettent en évidence le rôle primordial des CSM dans le maintien du microenvironnement hématopoïétique (Douay et al. 2005). Dans les quelques heures qui suivent une irradiation corporelle, une baisse brutale des progéniteurs hématopoïétiques est observée et la capacité de récupération hématopoïétique d'un sujet irradié sera donc liée au nombre de cellules souches hématopoïétiques survivantes (Drouet et al. 2004).

La courbe de survie réalisée pour des doses d'ICE de 3 à 4 Gy sur les souris NOD/SCID a révélé une DL₅₀ de 30 jours pour une dose de 4Gy. Pour évaluer l'impact de notre greffon sur la reprise hématopoïétique, il faudrait réaliser des ICE à plus forte dose, permettant d'avoir une DL₅₀ de 7 à 12 jours.

L'irradiation corps entier des souris NOD/SCID à une dose sublétales a entraîné une augmentation du taux d'implantation des CSM dans le cœur, la peau, le cerveau, le foie et la moelle. Nous avons observé des taux d'implantation variant de 0,05 à 0,4% bien que nous ayons injecté 200.10⁶ CSM/kg. En revanche une étude menée sur trois primates non-

humains a révélé des taux d'implantation variant de 0,1% à 2,7% de CSM après ICE à une dose létale. Les CSM ont été injectées par voie systémique à une concentration de 22.10^6 CSM/Kg et se sont implantées dans le tractus digestif, les reins, les poumons, le foie, le thymus et la peau (Devine et al. 2003). Au cours de notre étude sur la biodistribution des CSM 6 semaines après une IP à 25 Gy, nous avons observé des taux d'implantation des CSM variant de 0,04% à 10,23 %. Bien que le travail de Devine ne soit réalisé que sur 3 animaux, les différences observées pourraient être dues à la dose d'irradiation et au modèle de greffe utilisé. Les greffes autologues ou allogéniques de CSM-eGFP réalisées sur les 3 primates non-humain n'ont pas permis une localisation *in situ*. La xéno greffe que nous avons réalisée a permis une étude histologique de la localisation des CSM humaines injectée. Notre système de greffe semble plus approprié pour suivre le devenir *in vivo* des CSM injectées. La localisation *in situ* des CSM dans le poumon après irradiation, permet d'observer des plages cellulaires autour des axes vasculaires de cet organe. (Figure 27A). La quantification des cellules humaines en zone périvasculaire a permis de démontrer qu'il y avait $45 \pm 2\%$ de cellules positives pour la bêta-2-microglobuline humaine et que ce résultat était beaucoup plus important que celui révélé par l'étude quantitative par PCR. Les faibles taux d'implantation déterminés par amplification du gène de la β -Globine humaine sont représentatifs d'une partie plus large de l'organe. Etant donné que nous n'avons pas observé d'autres sites d'implantation des cellules humaines dans le poumon, il apparaît normal que la détection par PCR soit plus faible puisque qu'elle prend en compte de l'organe dans sa totalité.

Au cours de ces expériences nous avons détecté peu de CSM humaines dans le sang périphérique des souris NOD/SCID et l'irradiation n'a pas entraîné de variation significative du taux de CSM circulantes. L'injection systémique et l'implantation des CSM dans le cœur et les poumons 48 heures post-injection, suggèrent que les CSM humaines circulent dans le sang périphérique des souris NOD/SCID avant d'intégrer leurs différents sites. La détection des CSM dans la circulation sanguine des mammifères a déjà été décrite (Kuznetsov *et al.* 2001). L'analyse histologique de la localisation des CSM a révélé une implantation

préférentielle de ces cellules autour des axes péri-vasculaires dans de nombreux organes après irradiation. Les CSM semblent traverser la paroi vasculaire. Elles ont été localisées dans l'intima qui est constituée en particulier de l'endothélium formant une barrière de perméabilité sélective entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales activées assurent le bon déroulement du processus inflammatoire (adhésion et diapédèse des leucocytes du sang vers les tissus) et thrombotique (adhésion et agrégation des plaquettes) nécessaires à la restauration cellulaire et tissulaire (Michiels *et al* 2003). Suite à un stress ou à une exposition aux rayonnements ionisants, les processus inflammatoires et thrombotiques sont induits précocement dans les vaisseaux et notamment dans les micro-vaisseaux qui sont plus radiosensibles. Les cytokines et chemokines jouent un rôle majeur dans la réparation tissulaire et la migration des cellules souches. Nous avons détecté très peu de CSM dans la circulation 72 heures post-exposition aux RI. Ce résultat recoupe les observations concernant les CSH qui seraient en circulation de 1 heure à 2 jours post-stress avant de traverser la barrière endothéliale et s'implanteraient dans les compartiments souches par activation des interactions entre les molécules d'adhésion (VCAM-I, ICAM-I) nécessaires à leur prolifération (Lapidot *et al.* 2005). Le gradient positif de SDF-1 du sang périphérique vers les tissus et notamment la MO pourrait participer à la capture des cellules souches par les organes. Il a été montré précédemment que le SDF-1 participe à la migration transendothéliale des cellules CD34⁺ CXCR4⁺ (Peled *et al.* 2000). Les cytokines inflammatoires activeraient les cellules endothéliales et les CSM, augmentant leur expression de molécules d'adhésion permettant ainsi l'adhésion entre ces deux types cellulaires. Ce phénomène favoriserait la localisation préférentielle des CSM autour des vaisseaux. Les cytokines TNF- α et IL-1 β augmenteraient l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Mantovani *et al.* 1992). La migration transendothéliale des CSM CXCR4⁺ serait guidée par le gradient positif de SDF-1 du sang périphérique vers le tissu altéré. L'adhésion des CSM circulantes aux cellules endothéliales de la microvascularisation cardiaque a été décrite chez le rat après ischémie cardiaque (Segers *et al.* 2005). L'ensemble des facteurs impliqués dans la migration des cellules souches vers les tissus altérés reste encore à élucider. Les molécules modulant le

phénomène peuvent varier selon l'organe cible. Ainsi, le SDF-1 serait impliqué dans la transmigration des CSM dans l'endothélium vasculaire et la MO, de plus son taux est également augmenté dans le foie après irradiation ou inflammation. Par ailleurs l'HGF, cytokine pléiotrope, serait impliquée dans la migration et la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires (Forte *et al.* 2005). Au niveau intestinal le TCF-4 (T-cell factor) pourrait agir sur la migration des cellules souches (Booth *et al.* 2000). L'étude par immunomarquage du CXCR4 humain sur les CSM implantées autour des vaisseaux de la souris NOD/SCID et le dosage de SDF-1 dans les tissus et le sang devraient permettre de documenter le mécanisme de migration transendothéliale des CSM injectées après irradiation.

Pour déterminer si la multipotentialité des CSM (haute capacité proliférative et multi-différenciation) est modulée par leur implantation dans les différents tissus irradiés, nous avons étudié la capacité proliférative de ces cellules et l'expression de leur marqueurs spécifiques (SH2, SH3 et α -SMA) au sein des différents tissus 30 jours post-irradiation. Le marquage immunohistochimique de la PCNA a permis d'observer que les CSM humaines implantées entre les tubules rénaux, autour des veinules du cerveau et dans la pie-mère semblent conserver leur haut pouvoir prolifératif. Les études préliminaires des variations phénotypiques des CSM implantées ont révélé une restriction d'expression des marqueurs SH3 et α -SMA, suggérant une perte de leur caractère de CSM plus ou moins importante suivant le site d'implantation. Les CSM semblent moduler leur phénotype suivant le tissu dans lequel elles s'implantent. Dans un organe donné (par exemple rein, cerveau) elles pourraient conserver leur caractère souche dans certains types de tissus et dans d'autres se différencier. Le pouvoir de prolifération observé pourrait être également conservé par les CSM humaines qui se logent dans les niches tissulaires. La localisation de ces cellules proliférantes ne semblent cependant pas confirmer cette hypothèse. Peu d'études ont été menées sur l'état prolifératif des CSM *in vivo* en fonction de leur différenciation dans les tissus afin d'évaluer leur impact en médecine régénérative (Barry *et al.* 2004).

Bien que nous n'ayons pas observé de tumeurs dans notre modèle, les CSM humaines pourraient, dans certaines conditions, s'immortaliser et acquérir un pouvoir tumorigène (Kassem et al 2005, Zhu *et al.* 2005). Il a été également suggéré qu'elles pourraient favoriser la croissance tumorale (Djouad *et al.* 2003). Les mécanismes d'action des CSM sur les cellules cancéreuses et les conditions favorisant leur éventuelle transformation ne sont pas connus, et il devient primordial de déterminer ces conditions avant d'établir un protocole clinique en radiothérapie anti-cancéreuse.

Les CSM implantées semblent moduler leur phénotype dans les tissus irradiés. L'étude histologique de l'implantation des CSM a permis d'observer qu'elles pourraient se localiser dans les vaisseaux du tissu rénal irradié et acquérir une morphologie proche de celle des cellules endothéliales. De plus, les CSM ont été localisées dans des zones fonctionnelles telles que la pie-mère, le glomérule rénal et des tissus de soutien, suggérant que les CSM pourraient moduler leur phénotype de façon à maintenir l'architecture du tissu irradié. Morphologiquement, l'aspect des CSM implantées autour des vaisseaux, dans le glomérule rénal, et dans les tissus de soutien évoque une possible différenciation cellulaire *in vivo*. L'étude histologique approfondie de la localisation des CSM dans le corpuscule de Malpighi a permis d'observer que les CSM sont implantées dans la capsule de Bowman et dans le pôle vasculaire. Dans la capsule de Bowman les CSM pourraient acquérir la morphologie de cellule de la membrane pariétale suggérant une différenciation des CSM en cellules épithéliales. L'ensemble de ces observations microscopiques suggère que les CSM pourraient préférentiellement se différencier en cellules endothéliales ou épithéliales au sein des tissus irradiés. Les CSM conserveraient alors une partie de leur potentiel de différenciation multiple bien qu'il soit restreint au tissu. Cette hypothèse est renforcée par les observations d'autres équipes sur la différenciation des CSM en cellules endothéliales, en cellules épithéliales et en cellules musculaires au cours d'expériences menées sur d'autres organes et d'autres atteintes (Silva *et al.* 2005) (Nakagawa *et al.* 2005) (Wang *et al.* 2005). L'étude du transcriptome des CSM *in vivo* et la réalisation de marquages immunohistochimiques d'antigènes tissu-

spécifique, tels que VCAM-1, PECAM ou facteur Von Willebrand permettraient la mise en évidence de la différenciation des CSM implantées autour des vaisseaux par exemple.

Dans les tissus murins irradiés nous avons également observé des cellules humaines dont la morphologie sphérique suggère une absence de différenciation. Une observation similaire a été rapportée au cours de l'analyse histologique de cerveaux après ischémie locale, bien que la xénogreffe de CSM ait amélioré les fonctions sensorimotrices des rats (Zhao et al. 2002). La reprise fonctionnelle, en absence de différenciation des CSM, suggère un potentiel de vecteur protéique des CSM. Les CSM sécrèteraient des facteurs qui stimuleraient la réparation tissulaire pour que la reprise fonctionnelle soit observable.

Au sein du tissu irradié les CSM pourraient avoir deux modes d'action différents : la différenciation et l'apport de facteurs protéiques. Ces deux mécanismes pourraient co-exister dans un même tissu.

L'étude de l'impact d'une greffe sur la reprise fonctionnelle d'un organisme irradié a commencé par l'analyse des paramètres biochimiques du sang des souris irradiées greffées. Par comparaison aux souris uniquement irradiées corps entiers, la greffe de CSM a permis le maintien des taux plasmatiques de base de l'urée, des ASAT et des ALAT. Ce maintien semble moindre dans le cas d'une IA, suggérant que les CSM peuvent jouer un rôle protecteur jusqu'à une certaine dose d'irradiation et uniquement dans le cas d'atteintes hépatiques. Dans le cas d'une ICE, les CSM semblent empêcher l'apparition d'une diminution de l'activité hépatique pouvant être liée à une cytolysse des hépatocytes. De récents travaux ont mis en évidence la différenciation hépatocytaire des CSM en co-culture avec des hépatocytes (Zhang *et al.* 2005). Les CSM implantées pourraient ainsi se différencier en hépatocytes lorsqu'elles sont en contact avec ce type cellulaire. Cette différenciation pourrait être le résultat d'une fusion cellulaire ou d'une reprogrammation des CSM en fonction de leur environnement, mais de récents résultats suggèrent que cette différenciation n'est pas liée à une fusion cellulaire (Sato *et al.* 2005). Pour confirmer la différenciation des CSM humaines en hépatocytes après une ICE, des marquages

immunohistochimiques et l'étude de l'expression des ARNm de protéines spécifiques des hépatocytes telles que la cytokératine 19 (CK19), cytokératine 18 (CK18) et le récepteur à l'asialoglycoprotéine (AGPR) sont à effectuer.

Les cellules souches mésenchymateuses possèdent une multipotentialité et des propriétés de régulation immunologique et inflammatoire. De plus, ces cellules souches adultes sont impliquées dans la reprise fonctionnelle de certains organes après lésions (Barry et al. 2004). Nous avons consacré la dernière partie de cette thèse à étudier l'impact d'une greffe de CSM humaines sur l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'inflammation après irradiation. La greffe de CSM humaines a permis de diminuer l'apoptose et d'augmenter la prolifération cellulaire au niveau du jéjunum 3 jours après irradiation. Les CSM semblent rétablir l'homéostasie intestinale que l'irradiation abdominale avait perturbée. L'apoptose est modulée par l'expression de certains ARNm. Un excès d'expression des ARNm *bax* et *bak* va entraîner la mort cellulaire par apoptose alors qu'un excès d'expression des ARNm *bcl2* et *bcl-xl* va protéger la cellule de l'apoptose (Dietrich et al 1997; Hirama et al. 2003). Il a été suggéré que les CSM seraient capables de promouvoir l'expression de *Bcl2* dans les zones ischémiées suite à un infarctus du myocarde chez le rat (Tang *et al.* 2004), diminuant l'apoptose dans cette zone. Dans l'intestin des souris NOD/SCID 3 jours post-IA, les CSM humaines pourraient augmenter l'expression de *bcl2* et/ou de *bcl-xl*. La surexpression de ces protéines pourrait empêcher les cellules appartenant au tissu irradié de rentrer dans le processus de mort par apoptose. Dans ce contexte, les CSM sécrèteraient des facteurs stimulant l'expression de ces protéines anti-apoptotiques. *In vitro*, l'apoptose est réduite en cas de contact entre cellules lésées et CSM (Mourcin *et al.* 2005). Dans l'hypothèse d'une adhésion entre les cellules endothéliales et les CSM, celles-ci pourraient protéger les vaisseaux des irradiations en empêchant l'apoptose des cellules endothéliales. La protection de l'endothélium par la greffe de CSM aura pour conséquence la conservation de l'intégrité de cette barrière de perméabilité sélective et le maintien des échanges entre le sang et les tissus.

L'analyse histologique des tissus murins (intestin, peau) suggère, que lors des irradiations, la prolifération cellulaire augmente. En présence de CSM, la prolifération cellulaire radio-induite des cellules murines intestinales a été augmentée significativement, suggérant que les cellules humaines greffées stimulent ce processus. Le dosage sérique de certaines protéines pro-inflammatoires a permis d'observer qu'une greffe de CSM 24 heures après irradiation permettait le maintien des taux de bases d'IL-1 α , TARC, RANTES et MCP-1. Bien que le modèle murin NOD/SCID présente une forte diminution des lymphocytes T, entraînant certaines contraintes pour évaluer l'inflammation radio-induite. La diminution des taux sériques d'IL- α et de MCP-1 après greffe de CSM suggère que les CSM ont un effet anti-inflammatoire en réprimant la sécrétion de ces protéines pro-inflammatoires. Ces premiers résultats sur l'effet des CSM sur l'inflammation radio-induite sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle anti-inflammatoire des CSM (Aggarwal *et al.* 2005).

18. Les trois Voies d'action des CSM dans un organisme irradié

L'irradiation corps entier et la surexposition d'un grand nombre d'organes entraînent une atteinte multi-viscérale et, parallèlement, une augmentation de la présence des CSM dans un grand nombre d'organes. L'exposition aux rayonnements ionisants gamma paraît être un modèle approprié pour étudier un grand nombre de sites d'implantation des CSM. Le modèle de greffe xénogénique développé a permis de localiser les CSM au sein de nombreux tissus. Les CSM pourraient être impliquées dans au moins trois mécanismes d'actions différents pour rétablir l'homéostasie tissulaire et protéger l'organisme des effets des RI. Les CSM pourraient s'implanter dans le tissu, proliférer et se différencier en fonction de leur environnement. Les CSM pourraient s'implanter dans les niches des différents tissus et acquérir le rôle de progéniteurs tissu-spécifiques. Les CSM pourraient s'implanter pour sécréter des protéines stimulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs tissu-spécifiques. Ces trois mécanismes pourraient co-exister dans l'organisme irradié.

1- Les CSM s'implanteraient pour se différencier en cellules fonctionnelles

2- Les CSM augmenteraient la prolifération et la différenciation des progéniteurs tissu-spécifiques

- En se différenciant en progéniteurs tissu-spécifiques
- En sécrétant des protéines stimulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs pré-existants

19. Perspectives d'études de la migration des CSM vers les organes lésés

Les mécanismes par lesquels les CSM traversent la barrière endothéliale (migration transendothéliale), ainsi que leur migration vers la niche ou la zone altérée restent encore à définir. Une liste de récepteurs de chemokines présents à la surface des CSM isolées de la MO au second passage a été récemment publiée. Les CSM isolées de MO expriment entre autres : CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6 (Honczarenko *et al.* 2005). La liaison des ligands correspondants pourrait être à l'origine de la migration des CSM vers les différents organes et de leurs effets biologiques. Comme nous l'avons vu précédemment, le gradient positif de SDF-1 du sang vers le tissu semble responsable de la migration des CSM CXCR4⁺ vers la MO et le cœur. D'une manière comparable, la migration des CSM vers d'autres organes pourrait être liée à la présence de récepteurs spécifiques.

La liaison CCR1-CCL1 semble impliquée dans l'inflammation pulmonaire pour le recrutement des éosinophiles (Gupta *et al.* 2005). La migration des CSM dans le poumon pourrait dépendre de la liaison CCR1-CCL-1. Les liaisons CCR7 avec CCL19 et CCL21 semblent impliquées dans la migration des macrophages vers la rate et semblent les protéger de l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-2 *via* la phosphorylation de la protéine Akt (Kim *et al.* 2005). Les CSM pourraient migrer dans la rate par un gradient

positif de ces chemokines et leurs liaisons pourraient protéger les cellules de l'apoptose. Les chemokines RANTES, MIP- α 1 et MIP- β 1 sont des ligands du récepteur CCR5 (Sun *et al.* 2004). Les CSM pourraient capturer ces protéines pro-inflammatoires et donc diminuer l'inflammation, expliquant la diminution du taux de RANTES que nous avons observée après greffe dans le cas d'une ICE. CCL20, qui se lie à CCR6, semble impliquée dans l'inflammation intestinale, suggérant qu'il pourrait faciliter la migration des CSM CCR6+ vers ce tissu. La liaison CCL20 à CCR6 joue un rôle dans la migration, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin (Brand *et al.* 2005). Ces études récentes appuient l'hypothèse que la migration des CSM est liée à l'état inflammatoire des tissus. Dans cette hypothèse, la biodistribution des CSM apparaît comme le reflet de l'état inflammatoire de l'organisme irradié. Pour approfondir cette hypothèse, il serait intéressant de doser les ligands des récepteurs CCR1, CCR5, CCR6 et CCR7 dans les différents organes prélevés après irradiation et d'observer si il existe une différence tissu-spécifique.

Les CSM ayant migrées dans les tissus après irradiation pourraient augmenter la prolifération et la différenciation des progéniteurs soit en acquérant un phénotype de progéniteurs, ou bien en stimulant les progéniteurs déjà existants par sécrétion de facteurs et de cytokines. Pour mettre en évidence une différenciation des CSM en progéniteurs tissu-spécifiques, il faudrait caractériser phénotypiquement ces cellules et les localiser au sein des tissus. Actuellement, de nombreuses études portent sur la caractérisation des progéniteurs et de leurs niches (Fehrer *et al.* 2005). Les CSM expriment de nombreux ARNm de protéines impliquées dans la stimulation et la prolifération de nombreux types cellulaires (Kim *et al.* 2005). L'hypothèse de l'existence de progéniteurs dans chaque type tissulaire, implique qu'ils possèdent des profils de facteurs et protéines stimulatrices spécifiques qui restent à caractériser.

ARTICLE

Local irradiation induces not only homing of human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution following irradiation damages

Local irradiation induces not only homing of human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution following irradiation damages

Sabine François^a, Morad Bensidhoum^b, Moubarak Mouiseddine^a, Christelle Mazurier^b, Bénédicte Allenet^a, Alexandra Semont^a, Johanna Frick^a, Amandine Saché^a, Sandrine Bouchet^b, Dominique Thierry^a, Patrick Gourmelon^a, Norbert-Claude Gorin^{b,c}, Alain Chapel^a

a-Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Radioprotection Accidentelle, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), BP n° 17, F-92262 Fontenay aux Roses CEDEX, France

b- EA 1638, Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Radioprotection Accidentelle, Faculté de Médecine Saint Antoine, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, 27 rue de Chaligny- 75012 Paris, France

c- Service d'Hématologie et de Thérapie cellulaire, Hôpital Saint Antoine, 75012 Paris, France.

Short title: specific homing of hMSC to injured tissues.

Key Words: MSC, Injured Tissues, Homing, Transplantation, Irradiation

Acknowledgements: We wish to thank Patrice Richard and Magali Leroy for their helpful contributions.

Corresponding author:

IRSN, DRPH/SRBE/LTCRA

BP17 Fontenay aux Roses CEDEX 92262, FRANCE.

Tel 33 1 58 35 95 46

Fax 33 1 58 35 84 67

e-mail: alain.chapel@irsn.fr

Word counts of abstract: 563 words.

Word counts of text: 6313 words.

Footnotes :

Correspondance : IRSN, DRPH/SRBE/LTCRA BP17 FAR 92262 FRANCE

e-mail: alain.chapel@irsn.fr

This study was supported by grants from Electricité de France and the Région Ile de France

ABBREVIATIONS

MSC: Mesenchymal Stem Cell

TBI: Total Body Irradiation

Gy: Gray

ABSTRACT:**Background and rationale:**

Mesenchymal Stem Cells (MSC) have been shown to migrate to various tissues. There is little information on the fate and potential therapeutic efficacy of the reinfusion of MSC following total body irradiation (TBI). We addressed this question using human MSC (hMSC) infused IV to NOD/SCID mice submitted to total body irradiation. Further, we tested the impact of additional local irradiation superimposed to TBI, as a model of accidental irradiation. We compared additional local irradiation to one limb and to the abdomen.

Material and methods:

Forty NOD/SCID mice, divided in four groups (n=10 per group), were transplanted with $5 \cdot 10^6$ hMSC.

Group 1 was not irradiated before receiving hMSC infusion.

Groups 2, 3 and 4 received TBI at a sublethal dose of 3.5 Gray, before hMSC infusion, as follows: Group 2 received TBI only; Group 3 received local irradiation to the abdomen at a dose of 4.5 Gray in addition to TBI; and Group 4 received local irradiation to the right posterior leg at 26.5 Gray in addition to TBI. Each group had its own control of 5 animals that did not receive hMSC. The animals were sacrificed 15 days after irradiation and the quantitative and spatial distribution of the hMSC was studied through PCR and immunohistology analysis.

Results:

Histological analysis of mouse tissues confirmed the presence of radio-induced lesions in the irradiated fields. Following their infusion into non-irradiated animals, hMSC homed at a very low level to various tissues. Human DNA accounted for engraftment of 0.06% MSC in lungs, 0.14% in bone marrow and 0.07% in quadriceps muscle. No significant hMSC engraftment was found in the brain, kidneys, liver, gut, stomach, heart, skin, muscle and peripheral blood.

Total body irradiation induced an increase on engraftment levels of hMSC of 2.8 fold in the brain ($p < 0.05$), 3 fold in the heart ($p < 0.05$), 2.5 fold in the liver ($p < 0.05$), 2.6 fold in bone marrow ($p < 0.001$) and 1.7 fold in muscles ($p < 0.05$). No increase was detected in the lungs (0.04%).

Both local irradiations in addition to TBI, increased hMSC engraftment rate at the sites of local irradiation. Abdominal irradiation as compared to right leg irradiation increased hMSC engraftment in the exposed area by 2 fold in the gut ($P < 0.001$), 2.3 fold in the liver and 9.3 fold in the spleen. Right hind leg irradiation as compared to abdominal irradiation increased hMSC engraftment in the exposed area by 5 fold in

the skin ($P < 0.05$), and 3 fold in quadriceps muscles ($P < 0.001$). An important finding was an increase of hMSC engraftment in organs outside the fields of the local additional irradiation: following abdominal irradiation as compared to right leg irradiation, hMSC engraftment was increased by 1.8 fold in bone marrow, and 11.6 fold in lungs ($P < 0.05$). Conversely, following right leg irradiation as compared to abdominal irradiation, hMSC engraftment was increased by 2.2 fold in the brain ($P < 0.05$).

Conclusion:

This study shows that engraftment of systemically administered hMSC in NOD/SCID mice increases significantly in response to tissue injuries produced by total body irradiation with or without additional localised irradiation. Additional localised irradiation induces an increase in engraftment locally as well as at sites outside the local irradiation field, suggesting a distant (abscopal) effect of radiation damage. This work supports the use of MSC infusion to repair damaged tissues following accidental irradiation and possibly in patients submitted to controlled radiotherapy for the treatment of solid tumors.

INTRODUCTION:

Mesenchymal stem cells (MSC) have been identified in the bone marrow as multipotent progenitor cells that differentiate into osteocytes, chondrocytes, adipocytes and stromal cells^{1,2}. Irradiation can induce severe complications, hemopoietic stem cell depletion, multi organ failure and death. Inflammation due to irradiation can mobilize haematopoietic stem cells into the circulation also; irradiation can activate molecular pathways that increase the release of tissue chemokines, which attract stem cells to tissues where they may home and differentiate³. Therefore stem cell therapy may be a promising therapeutic approach to improve radiotherapy-induced tissue damages.

In several animal models, it has been shown that syngeneic or xenogeneic MSC administered intravenously (IV) are able to engraft into the bone marrow and other tissues in animals with⁴⁻⁶ or without a pretransplant total body irradiation (TBI)^{7, 8}. However, the levels of engraftment in these two different settings have not been compared. MSC engraft *in vivo* in several injured tissues⁹⁻¹⁴ such as the liver^{15, 16} moreover primary researches showed that MSC can graft themselves in muscles^{17,18} and myocardium¹⁹. In human, the use of MSC is being tested for tissue remodelling including cardiovascular repair, treatment of lung fibrosis, spinal cord injury, bone and cartilage repair, for review see^(17, 20). Regarding radio-induced lesions, multiple studies have shown engraftment of MSC at the site of injury²¹⁻²³ but very few have evaluated MSC engraftment in other tissues (outside the irradiation field). The amount of Mesenchymal stem cells detected in most tissues is exceedingly low. The signalling pathways responsible for their directed migration still remain unknown although recent reports have suggested a role for chemokines in hMSC migration³. Several studies have begun to elucidate the mechanisms by which stem cells are mobilized from bone marrow to a particular organ and the molecular mediators that orchestrate this process^{24, 25, 26}.

For these studies, xenogenic models are powerful but somewhat controversial models. Essential signals such as cytokine/receptor interactions may be hampered by species differences. Although the xenogeneicity does not prevent the differentiation, it decreases slightly the migratory ability of the MSC towards different tissues. This decrease seems to be the result of weak connection between the receptors and ligands of different species¹⁹. Although it was described that both human and murine MSC are immunosuppressive, major differences exist between MSC from the 2 species. Murine MSC, unlike their human equivalent, lack MHC class II expression²⁷. The host's crippled immune system could also somehow hinder engraftment but

transplant rejection can occur in xenogenic models. However, when transplanted into an immunoincompetent host, adult hMSC showed persistent engraftment ²⁸.

The first challenge in therapeutic MSC transplantation is efficient delivery to the sites of intended action. In this paper, we describe a xenogeneic experimental transplant model we built to evaluate the full potential of hMSC engraftment, and compared total body irradiation with and without additional localised exposures (leg and abdominal areas). In this study we used mice NOD/SCID model to evaluate the engraftment of hMSC in irradiated and to have the minimum of animals developing a transplant rejection. Our results showed that hMSC after transplantation into adult unconditioned mice, not only migrate in bone marrow and lungs as previously reported but also into muscle tissues ⁶. Total body irradiation increased hMSC implantation in bone marrow and muscle and further, led to engraftment in brain, heart, and liver. Local irradiation, in addition to TBI, increased both specific homing of injected cells to the injured tissues and to other tissues outside the local irradiation field. We feel these observations may be relevant to several clinical situations such as TBI given as a pretransplant conditioning regimen, radiotherapy for the treatment of cancer, and accidental irradiation, in promoting the use of MSC infusion as part of the therapeutic scheme.

MATERIEL AND METHODS

Isolation, purification and expansion of human MSC (hMSC)

Bone marrow cells were obtained from iliac crest aspirates from healthy volunteers after informed consent and were used in accordance with the procedures approved by the human experimentation and ethic committees of Hopital St Antoine. As previously described ⁷, 50 ml of bone marrow (BM) were taken from different donors over heparin (choay® de Sanofi-synthélabo). Low-density mononuclear cells were separated on Ficoll Hypaque density gradient (d: 1.077). Mononuclear cells (MNC) were plated at a concentration of 10^7 cells /10ml of dexter medium (McCoy's 5A medium) in T-75 cm² tissue culture flasks (supplemented with 12.5% fetal calf serum, 12.5% horse serum), 1% sodium bicarbonate, 1% sodium pyruvate, 0.4% MEM non essential amino acids, 0.8% MEM essential amino acids, 1% MEM vitamin solution, 1% L-glutamine (200 mM), 1% penicillin-streptomycin solution (all from Invitrogen®, Groningen, The Netherland), 10^{-6} M hydrocortisone (Stem Cell Technologies®), 2 ng/ml human basic recombinant fibroblast growth factor (R&D System, Abington, UK)] and incubated at 37°C in humidified, 5% CO₂ atmosphere. After 1 week, non-adherent cells were (washed and) removed (and replaced) with (the same) complete fresh medium (without Hydrocortisone) and hMSC at first passage (P1 hMSC) were plated at a density of $4 \cdot 10^5$ per T-75 cm² flask, at second passage (P2 hMSC) when reaching 80% of confluence the cells were collected and counted, viability was assessed by trypan blue assay. Prior transplant a sample of the hMSC prepared was taken for FACS analysis.

FACS analysis

Following trypsin EDTA treatment, the human cells were washed and resuspended in PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA) in aliquots of 2×10^5 cells. Stainings were done with phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody against CD105 (SH2), CD73 (SH3), and CD45 (Becton-Dickinson®) for 30 minutes at 4°C followed by two washes in PBS containing 0.5% BSA Cells were resuspended in 200µl of PBS 0.5% BSA, and analyzed at 10000 events /test by FACScalibur™ BD Pharmingen. Mouse igG1 were used as isotopic controls (IOTest®).

HMSC infusion into NOD/SCID mouse model

All experiments and procedures were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation (Act n° 87-847 October 19th, 1987, modified May, 2001). NOD-LtSz-*scid/scid* (NOD-SCID) mice, from breeding pairs originally purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA), were bred in our pathogen-free unit and maintained in sterile micro isolator cages. A total of 60 eight-week-old mice, divided in 5 groups, were used for this study. The hMSC were delivered intravenously (i.v) by tail vein injection into each mouse with Myjector syringe of 1ml, TERUMO™ 29G X ½. 24 hours after radiation exposure (using a ¹³⁷Cs source), four groups of these NOD/SCID mice were transplanted with a dose of 5.10⁶ P2 hMSC (hMSC) in 100 µl of PBS 1X; (the fifth group was used as a control group and did not received hMSC infusion). On average, one bone marrow was used to inject 5 mice. Group 1 was not irradiated before receiving hMSC infusion. Groups 2, 3 and 4 received TBI at a sublethal dose of 3.5 Gray, before hMSC infusion, as follows: Group 2 received TBI only; Group 3 received local irradiation to the abdomen (IA) at a dose of 4.5 Gray in addition to TBI; and Group 4 received local irradiation to the right posterior leg (Irradiation leg) at 26.5 Gray in addition to TBI. Each group had its own control of 5 animals that did not receive hMSC. The animals were sacrificed 15 days after irradiation and the quantitative and spatial distribution of the hMSC was studied through PCR and immunohistology analysis. Peripheral blood, Bone marrow (femur), heart, lungs, liver, kidneys, spleen, stomach, gut, brain, right and left posterior legs, quadriceps muscles, tibias and skin were collected. Before infusion when hMSC at second passage were collected, the rates of viability to blue trypan were of 98%.

Detection and quantitative analysis of engrafted hMSC: DNA extraction and PCR analysis.

The biological samples were submitted to DNA extraction and PCR analysis to detect the presence of human cells in mice recipients. Genomic DNA for PCR analysis was prepared from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit Qiagen®. Amplifications were performed following the standard recommended amplification conditions (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described by Heid and colleagues²⁹. The value of DNA contained in each somatic cell (diploid) is 6,16pg with two copies of non-repeated gene. This value was used to calculate how many gene copies contain a certain amount of human or mouse DNA (measured by PCR). Therefore DNA and copy number are proportional to the number of cells. The ratio of human DNA on mouse DNA gives directly the number of human cell in mouse cell tissues. Amplification of

human beta-GLOBIN gene was used to quantify the amount of human DNA in each sample of mouse tissue after DNA extraction. Endogenous mouse RAPSYN gene (Receptor-Associated Protein at the Synapse) was also amplified, as an internal control. Absolute standard curves were generated for the human beta-GLOBIN and mouse RAPSYN genes and used to quantify the amount of human DNA in each mouse tissue. Evaluation of human specificity of human beta-GLOBIN amplification was demonstrated using tenfold dilution for 100 ng to 0.05 ng of hMSC DNA with mouse DNA, without cross reactivity, to quantify human cells in mouse tissue. One hundred nanograms of purified DNA from various tissues were amplified using TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems). The primers and probe for human beta-GLOBIN were forward primer 5'GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA3' and reverse primer 5'CCTTGATACCAACCTGCCAGG3', the probe labelled with fluorescent reporter and quencher was: 5'FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3'. The primers and probe for mouse RAPSYN gene were forward primer 5'ACCCACCCATCCTGCAAAT3' and reverse primer 5'ACCTGTCCGTGCTGCAGAA3'. In order to determine the efficiency of amplification and the assay precision, calibration curves for human beta-GLOBIN and mouse RAPSYN genes were constructed with a 0,99 correlation (r^2) and efficiency superior to 98%. a 100% efficiency correspond to a slope of -3,32 as determined by the following equation: Efficiency = $(10^{(-1/\text{slope})}-1)$. Mouse DNA was isolated from the identical tissues of non-transplanted NOD/SCID mice and used as a negative control. As well, human DNA was isolated from hMSC culture and used as a positive control. The results were expressed in number of human cells per 100 mouse cells in each tissue (directly related to the numbers of copies of human beta-GLOBIN and mouse RAPSYN genes).

Immunohistochemistry

After para-formaldehyde fixation, the organs were rinsed with distilled water and dehydrated. Blocks were cut at 5 μm on a rotary microtome (LEICA®). For immunohistochemical staining of the paraffin embedded samples, microtomed sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through ethanol baths and PBS. The sections were dip into PBS-triton in order to increase tissue permeability, and after being rinsed with distilled water bath during 5 minutes. The sections were digested with 2% trypsin for 30 minutes, thus exposing masked epitopes. The polyclonal anti- α -2-microglobuline antibody (product NCL-B2Mp, Novocastra) was added at a dilution of 1:50. Negative controls were incubated with rabbit IgG diluted to 1: 100. Detection of bound primary antibody was carried out with biotinylated secondary antibody. The biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody composed

were diluted to 1:200, in PBS1x, and applied for 8 minutes. The slides were subsequently incubated with 6 solutions Ventana kit to make alkaline phosphatase reaction with FARED substrate for 30 minutes. For antibody detection the Ventana kit was used, followed by counterstaining with hemalyn for 4 minutes. This procedure was controlled by NEXES 8 software. On successive sections we carried out a HES staining.

Statistical analysis

To determine the effect of exposure radiation on engraftment of hMSC, the rates of implantation were compared; statistical significance was calculated using t-test. Significance for all analysis was set at $P < 0.05$. We have used sigmastats software. All values were expressed as the mean and SEM (standard error of the mean). Each irradiation group was constituted of 10 animals (n=10). Non irradiated control group was of 5 animals (n=5).

RESULTS

Isolation and characterization of hMSC expanded from BM

Phenotypic analysis shown that hMSC used in these experiments were strongly positive for the specific surface antigens SH2 and SH3, respectively $37.3 \% \pm 4.0$ and $72.9 \% \pm 3.7$. Almost no contamination ($0.2 \% \pm 0.1$ CD 45+ cells) by haematopoietic cells was evidenced in the samples (Figure 1). *In vitro* culture experiments showed that the cells were still able to differentiate into the osteoblasts, chondrocytes and adipocytes lineages (data not shown).

For the different bone marrow samples studied, amplification factor from MNC to grafting sample cells as been estimated ex vivo to ranged from 3443 to 20663. From the second and up to the 15th passage, the published doubling time of the cultured hMSC is 1.7 days³⁰.

Irradiation induces tissue injuries in the untransplanted NOD/SCID controls as shown by histological analysis

Fifteen days following a 3.5 Gy TBI, cellular depletion was observed in the spleen (figure 2A) and haemorrhage in the bone marrow (figure 2B). Following 8 Gy abdominal irradiation, villus atrophy, marked crypt loss and inflammatory infiltrate

(figure 2C, green arrow) of the sub mucosal layer were observed. Local irradiation of the leg induced ulcerated zones and a modification of the thickness of dermis (figure 2D, black arrow) of the skin. No injury was observed in non-irradiated tissues (figures 2E, 2F, 2G and 2H).

Infused hMSC are moderately present in unconditioned (non-irradiated) NOD/SCID mice tissues.

Quantitative PCR analysis evidenced that hMSC following their infusion into non-irradiated animals ($n=10$), homed to various tissues, albeit at a very low level. Human DNA accounted for engraftment of 0.06% hMSC in lungs (figure 3B), 0.14% and in bone marrow (figure 5D). No significant hMSC engraftment was found in the brain (figure 3A), kidneys (figure 4B), liver (figure 4A), gut (figure 4E), stomach, heart (figure 4C), skin (figure 5A), muscle (figure 5B), bone (figure 5C) and peripheral blood.

hMSC are present to a higher level and in more organs following TBI.

Higher percentages of hMSC were found in the brain (0.07%, figure 3A), heart (0.05%, figure 3C), liver (0.11%, figure 4A), bone marrow (0.37%, figure 5D) and muscles (0.12%, figure 5B). Total body irradiation induced a 2.8 fold increase on engraftment levels of hMSC in the brain ($p<0.05$), 3 fold in the heart ($p<0.05$), 2.5 fold in the liver ($p<0.05$), 2.6 fold in bone marrow ($p<0.001$) and 1.7 fold in muscles ($p<0.05$), when compared with non-irradiated transplanted mice. Total body irradiation did not increase significantly hMSC frequency in the lungs (0.04 %, (figure 3B)). We detected human beta-GLOBINE gene in lung and heart, suggesting a blood vessel circulation of infused hMSC after TBI and 14 days after infusion.

hMSC are found preferentially in areas of the body that have received the highest irradiation dose.

Figure 4 indicates the levels of hMSC engraftment in abdominal tissues and figure 5 indicates the quantitative engraftment hMSC in leg tissues. Mice have received localized irradiation to the abdomen or the right leg in addition to TBI. Abdominal irradiation, as compared to right leg irradiation, increased hMSC engraftment in the exposed area by 2 fold in the gut ($P<0.001$)(figure 4E), 2.3 fold in the liver and 9.3 fold in the spleen (respectively figure 4A and 4D). In organs outside the abdomen, hMSC engraftment was increased by 1.8 fold in bone marrow (figure 5D) and 11.6 fold in the lungs (figure 3B) ($P<0.05$).

Conversely, right leg irradiation, as compared to abdominal irradiation, increased hMSC engraftment in the exposed area by 5 fold in the skin ($P < 0.05$) and 3 fold in quadriceps muscles ($P < 0.001$), (respectively figure 5A and 5B).

Both localized irradiations did not significant modify hMSC engraftment in stomach (figure 4C), kidney (figure 4B) and heart tissues (figure 3C).

Theses greater hMSC engraftments, in particular in the brain (figure 3A), following a 30 Gy irradiation of leg than an 8 Gy irradiation of the abdomen (2.2 fold, $p < 0.05$) suggest a distant (absopal) effect of radiation damage.

Localization of hMSC in engrafted tissues by immunohistology and comparison with PCR analysis

To localize human cells in engrafted tissues, we performed immunohistologic experiments using a human beta-2-microglobulin specific antibody. Staining was carried out on spleen of conditioned mice recipients and on lungs of animals irradiated locally. Cells expressing the human beta-2-microglobulin were either insulated or gathered in clusters in spleen. This positive result was related to 10% of the cells which recolonized the spleen on the total section, 14 days after hMCS graft (figure 6A). In the lungs, after abdominal exposure to radiation, we observed clusters of human beta-2-microglobulin positive cells. These aggregations were localized in peri-vascular position (figure 6B). Moreover we observed the migration of human cells through the vascular wall and an intravascular colonization under intima. Figures 6C and 6D show a negative control corresponding at the spleen and lung. In limited peri-vascular areas of the lung, up to 45 ± 2 % of the cells stained positive for the human beta-2-microglobulin. Nevertheless in other lung areas no human cell was detected. In contrast to immunohistochemistry analysis, quantitative PCR analysis evidence lower level of engraftment as it is representative of larger sections of tissues encompassing some with high level of implantation of hMSC but also areas with only mouse cells results with PCR analysis for xenogenic engraftment research. We have not observed a large inter animal variability for hMSC engraftment in brain and heart. In some tissues such as the liver the variability was slightly more important as shown in figure 7.

DISCUSSION

There has been in the past decade a considerable interest in the capacities of MSC to increase haematopoietic recovery and contribute to tissue repair in human. There have been reports on infusion of MSC in patients with osteogenesis imperfecta, and animal models with myocardial infarction^{31, 32, 33}. Other studies have addressed the contribution of the infusion of total bone marrow that combines haematopoietic stem cells and MSC.

We addressed the question of the potential therapeutic impact of the infusion of MSC in the context of irradiation damage. We questioned the distribution of MSC when infused intravenously (IV), to various tissues, in relation to the dose and the distribution of irradiation.

In an effort to answer this question, we built a preclinical model in which hMSC were infused to NOD/SCID mice, without previous irradiation, and following irradiation. Irradiation consisted of sublethal total body irradiation at 3.5 Gray in all animals. To test the impact of localized additional lesions such as potentially occurring in human following accidental irradiation (heterogeneous fields); one group was subjected to irradiation of the right hind leg (30 Gy) and another group to irradiation of the abdomen (8 Gy).

We checked by histology the presence of the expected radio-induced lesions in the irradiation fields. We quantified engraftment by PCR for human beta-GLOBINE gene and identified human cells in engrafted tissues by immunohistology using a human beta-2-microglobulin specific antibody.

Our first observation was that, in the absence of irradiation, hMSC engrafted, albeit at a very low level in the lungs and bone marrow. Previous studies have shown detection of MSC in multiple tissues (bone, lungs, heart, liver, kidneys and spleen) from the first hours to 7 days after systemic injection of murine MSC, in the absence of previous irradiation, in nude mice and rats^{4, 34}. However, in these studies, two weeks after infusion MSC were only detectable in bone marrow and spleen. In our study, using hMSC in NOD/SCID mice, we were able to detect hMSC 14 days post-infusion in various organs: the highest levels of MSC engraftment were detected in the lungs, muscles and bone marrow. Such results in bone marrow are expected, as it is the primary residence site for MSC. A detectable engraftment of MSC in the lungs might pertain to the incapacity of the larger MSC to pass through the lung capillaries and/or to attach to endothelial cells in a receptor-mediated process³³

Our second observation was that total body irradiation preceding hMSC infusion increased the levels of engraftment in several tissues as expected, although not all.

When dealing with additional irradiation at the two local sites (right hind leg and abdomen), the primary observation was that the hMSC infused IV engrafted in all tissues involved by the local additional irradiation, at the highest levels observed. In this study we have detected a maximum rate of 0.94 % of hMSC in the spleen for animals receiving additional abdominal irradiation and 0.16 % in the skin, 0.08 % in the quadriceps muscle and 0.12 % into bone marrow for animals receiving additional irradiation of the right hind leg. Previous studies have designed different models with local injuries generated, in mice, by means other than irradiation, such as: chemical damage to alter lungs ³⁵ or muscle ^{18, 36}, coronary ligation to induce myocardial infarction ^{19, 20,31,37,38}, partial hepatectomy with 2-acetyl-aminofluorene to prevent hepatocyte division ^{14,38}, spinal cord surgical injury ¹¹ or use of genetically deficient animals ^{9, 10, 12, 13, 40}. In all these models, with the exception of the work by Bolno and al, MSC have been administered locally and not IV and in addition have been of murine and not human origin ³. These studies have shown local engraftment of MSC in injured tissues and their contribution to tissue repair by differentiation ^{6, 39, 41}.

The most relevant observation is that, following additional local irradiation, not only the levels of hMSC engraftment increased at the sites of local irradiation, as mentioned above, but the levels of engraftment increased in all distant organs or tissues tested outside the local irradiation fields as well. This suggests mobilisation induced by cytokines and potentially specific homing induced by chemokines, all released by inflammation ^{42, 43}.

In the described experiments following irradiation and hMSC transplant most of the implanted human cells were found in weakly damaged areas. In a different set of experiments we conducted in a non-human primate model submitted to mixed gamma-neutron irradiation and infused with green fluorescent protein (GFP) labelled non-human primate MSC, we observed that MSC engrafted preferentially in regenerating tissues ⁴⁴. These results suggest that MSC may participate to the preservation of the targeted tissues. Whether MSC engraftment in irradiated tissues improves their functional recovery remains to be studied. For these future studies, the knowledge of the influence of the pluripotentiality, replicative capacity, or stemminess of the stroma derived cells or their engraftment potential are a prerequisite. The comparison of the engraftment of cell populations with various differentiation abilities will bring important knowledge concerning the future of the clinical use of MSC.

This work supports in our view the use of MSC infusion to repair damaged tissues in patients following accidental irradiation and may be used in patients submitted to controlled radiotherapy for the treatment of solid tumors.

LEGENDS

Figure 1: FACS analysis

Determination of frequency of positive cells for specific markers of hMSC at second passage, SH2 (CD105) and SH3 (CD73) and positive cells for CD45 (haematopoietic cell marker), Representative FACS plot analysis of the graft sample.

Figure 2: Histological examination

Histological examination of radiation exposed tissues by HES staining: (A): Spleen with cellular depletion, (B): Bone marrow with haemorrhage (black arrow), (C): Gut with villus atrophy and inflammatory infiltrates of the sub mucosal layer (green arrow) and (D): modification of the thickness of dermis of irradiated right hind leg (black arrow). Non-irradiated controls: spleen (E), bone marrow (F), gut (G), skin (H).

Figure 3: Comparison of implantations of hMSC in brain, lung and heart tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, right posterior leg exposure or non irradiated control mice).

hMSC engraftment rate was significantly increased in brain following irradiation, when compared to controls (figure 3A). Abdominal irradiation significantly increased hMSC engraftment in lung when compared to other settings (figure 3B). hMSC engraftment in heart tissues was significantly higher following irradiation of all type than in non-irradiated controls (figure 3C).

All values were expressed as the mean and SEM (standard error of the mean).

Significance for all analysis was set at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and non significance was noted by (ns). Each group was constituted of 10 animals (n=10).

Figure 4: Comparison of implantations of hMSC in abdominal tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, and right posterior leg exposure) or non-irradiated control mice.

hMSC engraftment rate was significantly increased in liver when compared to controls (figure 4A). Significantly increased hMSC engraftment was observed in kidney or stomach following both local irradiations, when compared to TBI or non-irradiated controls (figure 4B, 4C). Significantly increased hMSC engraftment was observed in spleen following abdominal irradiation when compared to TBI alone, right hind leg exposure or non-irradiated controls (figure 4D). Significantly increased hMSC engraftment was observed in gut following right leg exposure or abdominal irradiation

when compared to TBI or non irradiated control, (figure 4E). All values were expressed as the mean and SEM (standard error of the mean).

Significance for all analysis was set at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and non significance was noted by (ns). Each group was constituted of 10 animals (n=10).

Figure 5: Comparison of implantation of hMSC in right posterior leg tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, right posterior leg exposure) or non-irradiated control mice.

HMSC engraftment rate was significantly increased in skin (figure 5A) or muscle (Figure 5B) following TBI or right leg exposure when compared to IA or non-irradiated controls. HMSC engraftment rate in bone was significantly increased following posterior leg exposure when compared to other irradiation protocols or non-irradiated controls (figure 5C). HMSC engraftment rate was significantly increased in the bone marrow following TBI or abdominal irradiation when compared to right hind leg exposure or non-irradiated controls (Figure 5D). All values were expressed as the mean and SEM (standard error of the mean).

Significance for all analysis was set at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), non significance (ns). Each group was constituted of 10 animals (n=10).

Figure 6: human beta-2-microglobuline immunostaining in lung and spleen

The human cells expressing the human beta-2-microglobulin are stained in red. (A): in spleen 15 days after TBI. Human cells were insulated (white arrow) or gathered in cluster (black arrow) in contact with conjunctive structure of spleen. (B): in lung after localised radiation exposure, clusters of positive cells in perivascular position (black arrow) and passage of human cells through the vascular wall and an intravascular colonization. Figure 6C and 6D represents negative controls (respectively spleen and lung, 15 days after TBI)

Figure 7: Inter animal variability for hMSC engraftment

PCR analysis of % hMSC engraftment in the brain, the heart and the liver of 10 animals. Percentage of hMSC engrafted 15 days after TBI.

References

1. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-884.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
3. Paul B, Bolno MD DMP, Andrew Wechsler MD and J. Yasha Kresh. Chemokine induced migration of human mesenchymal stem cells: A strategy for directing cardiac repair. *Journal of the American college of Surgeons*. 2004;199(3):33.
4. Erices AA, Allers CI, Conget PA, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant*. 2003;12(6):555-561.
5. Almeida-Porada G, Zanjani ED. A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32(1):77-81.
6. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, et al. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*. 2004;78(4):503-508.
7. Bensedhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*. 2004;103(9):3313-3319.
8. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003;101(8):2999-3001.
9. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. Mar 1999; 5(3): 309-313
10. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther*. 1999;10(15):2539-2549.
11. Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000;11(13):3001-3005.
12. Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 2002;59(4):514-523.
13. Jin HK, Carter JE, Huntley GW, et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1183-1191.
14. Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol*. 2002;161(2):565-574.
15. Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* Jul 15 2005; 106(2): 756-763.
16. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
17. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-584.
18. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-1530.

19. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-98.
20. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
21. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*. 2005;11(1):96-104.
22. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-156.
23. Mahmud N, Pang W, Cobbs C, et al. Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model. *Exp Hematol*. 2004;32(5):494-501.
24. Abbott JD, Huang Y, Liu D, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110(21):3300-3305.
25. Neuss S, Becher E, Woltje M, et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*. 2004;22(3):405-414.
26. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9):973-981.
27. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve antigen specific T-cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003; 101: 3722-9
28. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. may 2004; 127(5): 1293-1300. \$
29. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-994.
30. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14(4-6) :311-324.
31. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109(12):1543-1549.
32. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1919-1925; discussion 1926.
33. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*. 2004;117(1):3-10.

34. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):12-20.
35. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8407-8411.
36. Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2004;300(2):418-426.
37. Min JY, Sullivan MF, Yang Y, et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg*. 2002;74(5):1568-1575.
38. Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khaldi A, et al. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24(3):393-398.
39. Satoh H, Kishi K, Tanaka T, et al. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant*. 2004;13(4):405-412.
40. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30(8):896-904.
41. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*. 2004;14(6):1035-1041.
42. Van der Meeren A, Mouthon MA, Vandamme M, et al. Combinations of cytokines promote survival of mice and limit acute radiation damage in concert with amelioration of vascular damage. *Radiat Res*. 2004;161(5):549-559.
43. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2001;345(2):93-97.
44. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with haematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003;5(12):1028-1038.

Figure 1:

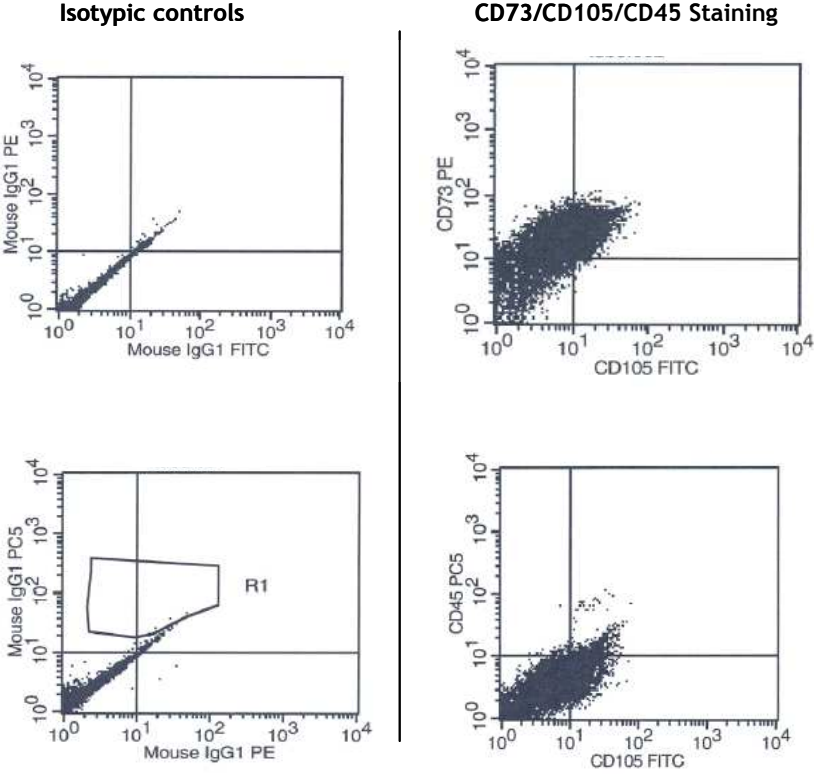


Figure 2:

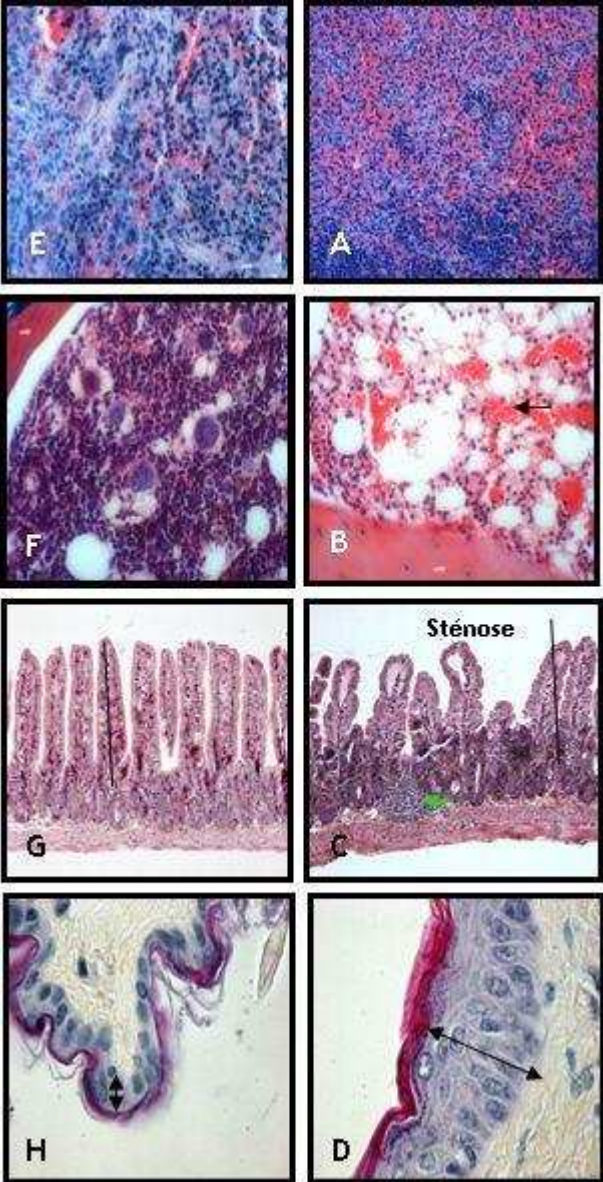


Figure 3:

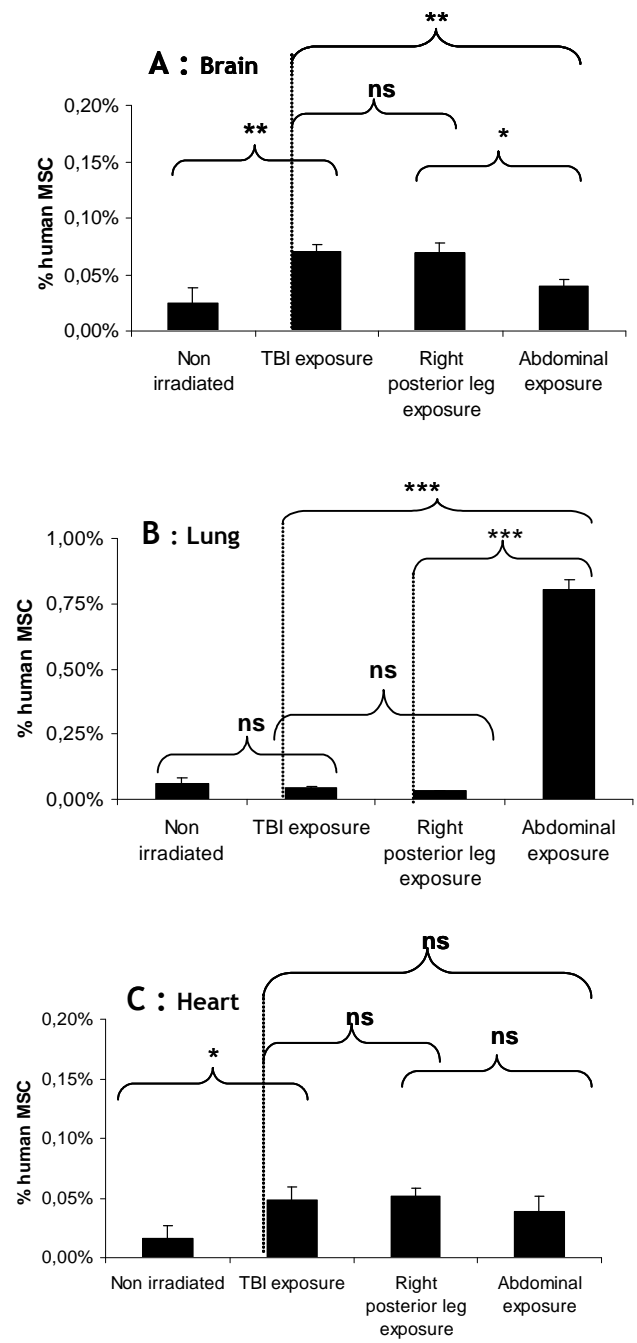


Figure 4:

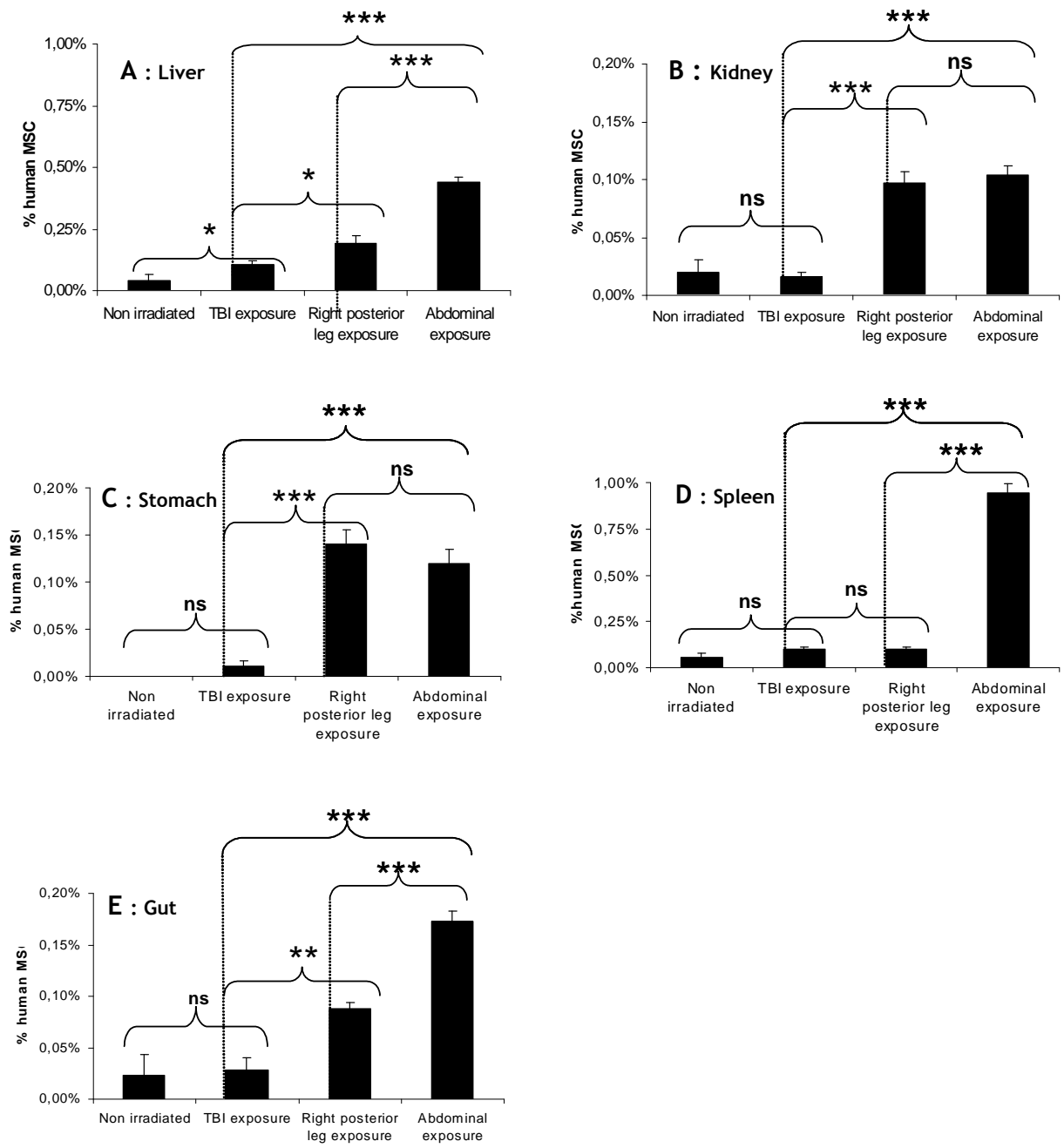


Figure 5:

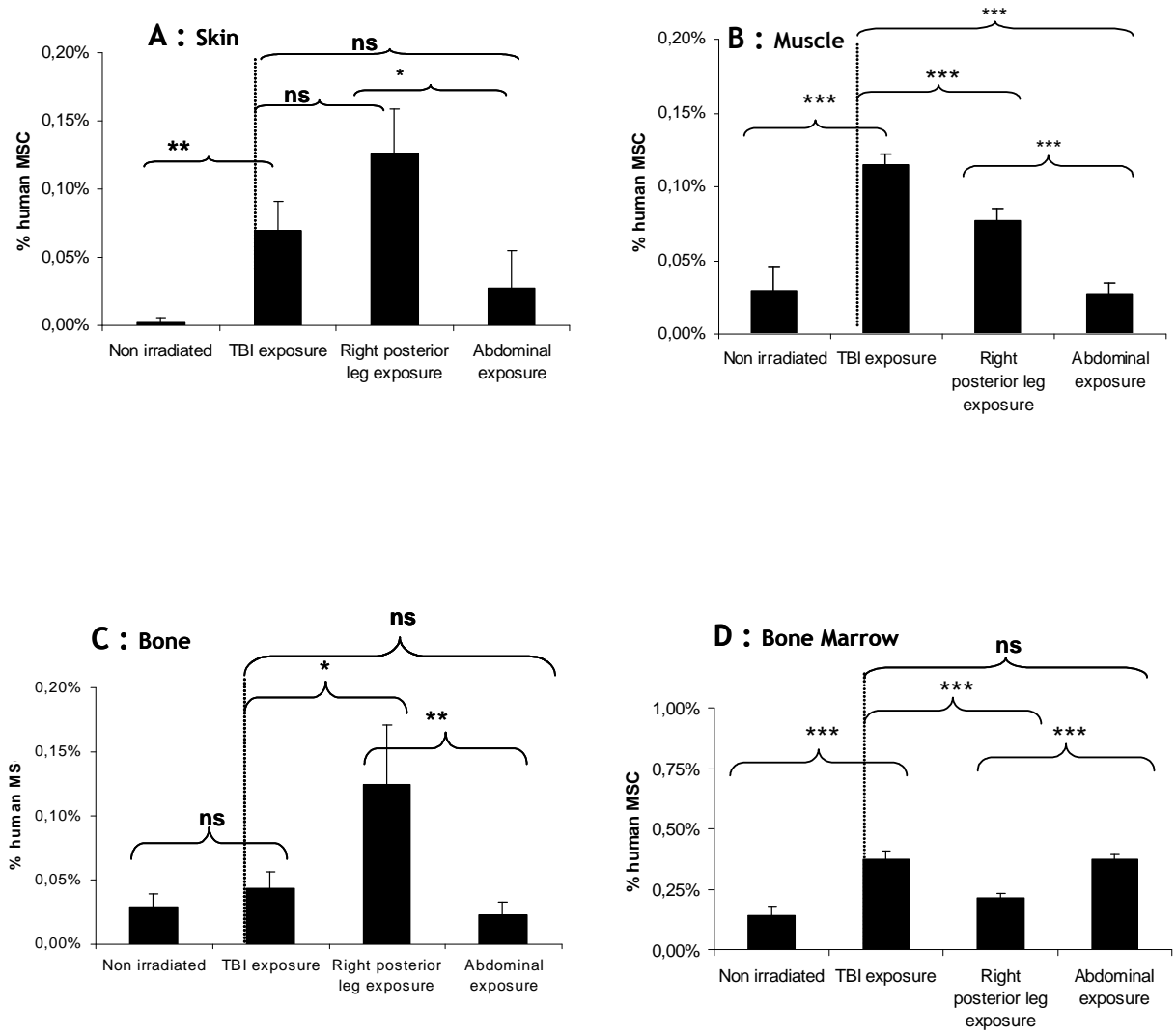


Figure 6:

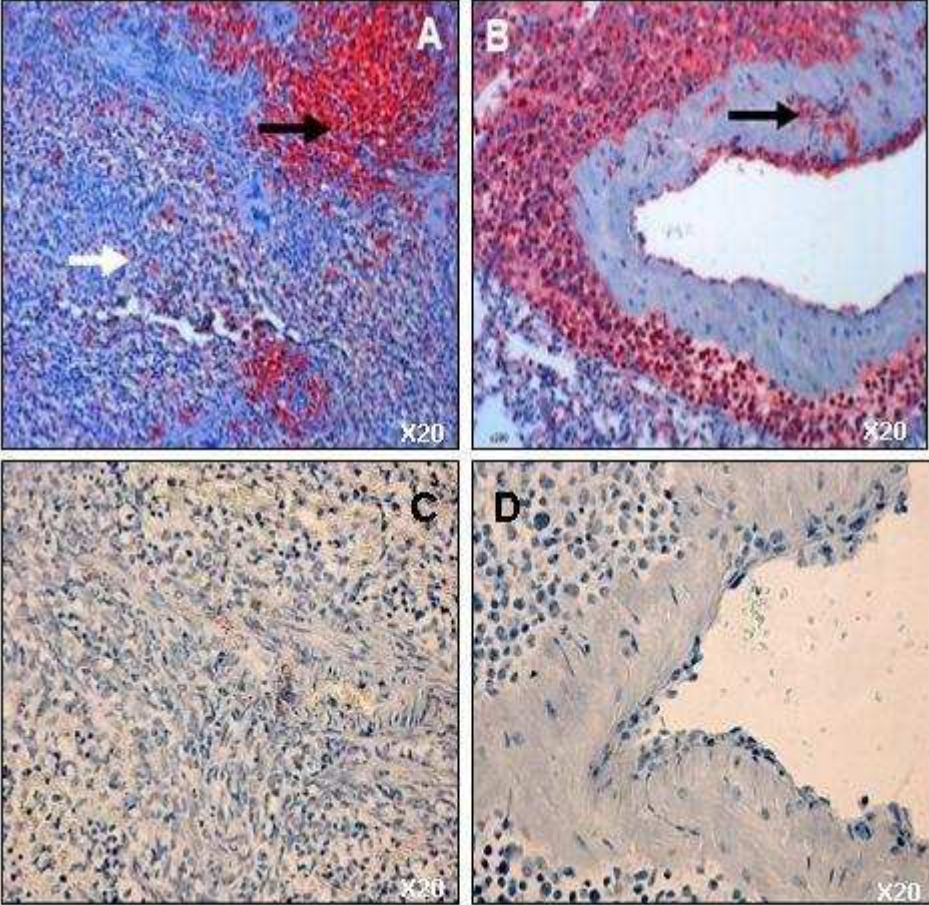
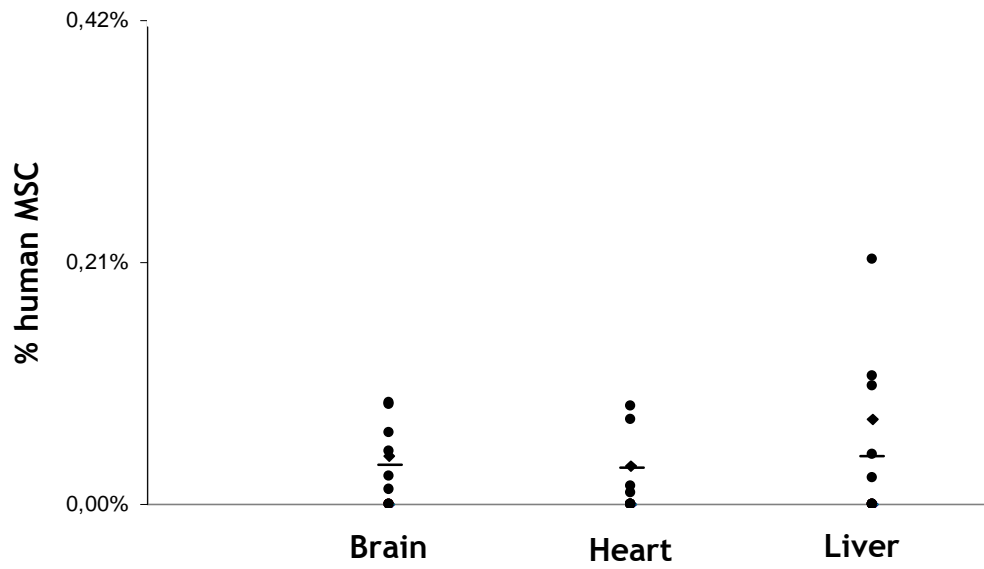


Figure7:



ANNEXES

Annexe 1 : Mise en culture des Cellules Souches Mésenchymateuses à partir d'échantillon de Moelle Osseuse humaine

JO : Moelle osseuse totale -> Obtention des CMN -> Culture en milieu dexter (McCoy's A)

J X : (de 3 à 5 jours) : Déplétion des cellules non adhérentes = CSM en P0

Au 3^{ème} jour de culture il faut vérifier la présence de cellules adhérentes et changer le milieu de culture (il est possible d'attendre jusqu'à 5 jour si nécessaire)

J X + 1 passage (de 6 à 15 jours) := CSM en P1

Il est impératif de vérifier la confluence des cellules jusqu'à 70-80% (entre 6 et 15 jours de culture) moment auquel il faut passer les cellules.

Rincer les cellules adhérentes avec du PBS 1X. Trypsiner (Trypsine Gibco®) les cellules (1,5 ml / flasques T75) et réensemencer directement dans du milieu neuf à 4.105/flasque, une flasque de CSM donne 2 à 3 flasques à chaque passage.

Composition du milieu de culture des CSMhumaine : Pour 400 ml de milieu DEXTER :

Sérum de cheval décomplémenté Gibco®	50 ml	Conservé à 20° C
Sérum de vœu foetal décomplémenté Gibco®	50 ml	Conservé à 20° C
L-Glutamine 200mM 100X liquide Gibco®	4 ml	Conservé à 20° C
Antibiotiques antimitotique 100X gibco®	4 ml	Conservé à 20° C
MEM Vitamine Solution 100X gibco®	4 ml	Conservé à 20° C
Bicarbonate de sodium 7,5 % liquide gibco®	4ml	Conservé à 20° C
MEM aa solution avec L-Glu 50X gibco®	4ml	Conservé à +4° C
Pyruvate de sodium liquide 100mM 100X gibco®	4ml	Conservé à +4° C
MEM aa essentiels liquide 100X gibco®	4ml	Conservé à +4° C
Milieu MacCoy's 5A 1X gibco®	276 ml	Conservé à +4° C

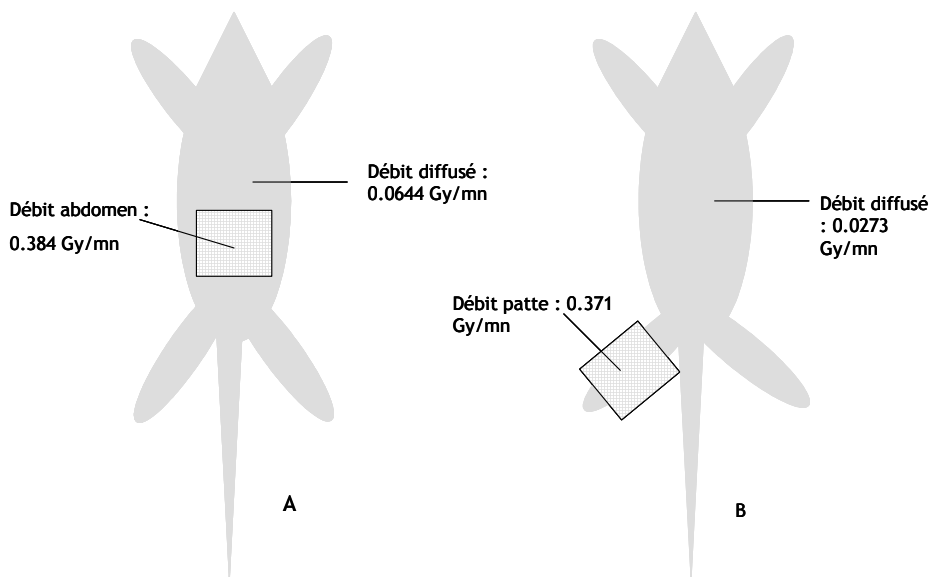
- Ajouter extemporanément de l'hydrocortisone (HC) Sigma® d'HC en poudre, Durant la première semaine de culture ajouter 10⁻⁶M d'HC qui inhibe les macrophages. Peser 8 mg d'HC Sigma® en poudre et dissoudre dans 165 µl de milieu (10⁻¹M) (se conserve à +4° C). Faire une dilution 1/1000^{ème} (10 µl +990 µl de milieu)= 10⁻³M. Filter et ajouter 1µl d'HC 10⁻³M pour 1 ml de milieu DEXTER.

- Ajouter extemporanément 1 ng de basic-FGF R&Dsysteme® / ml de milieu de culture et ce tout au long de la culture des CSMhu. On peut également ajouter 2 ng de FGF \square / ml pour augmenter la prolifération cellulaire.

Annexe 2 : Dosimétrie et configurations d'irradiations localisées

1-Dosimétrie :

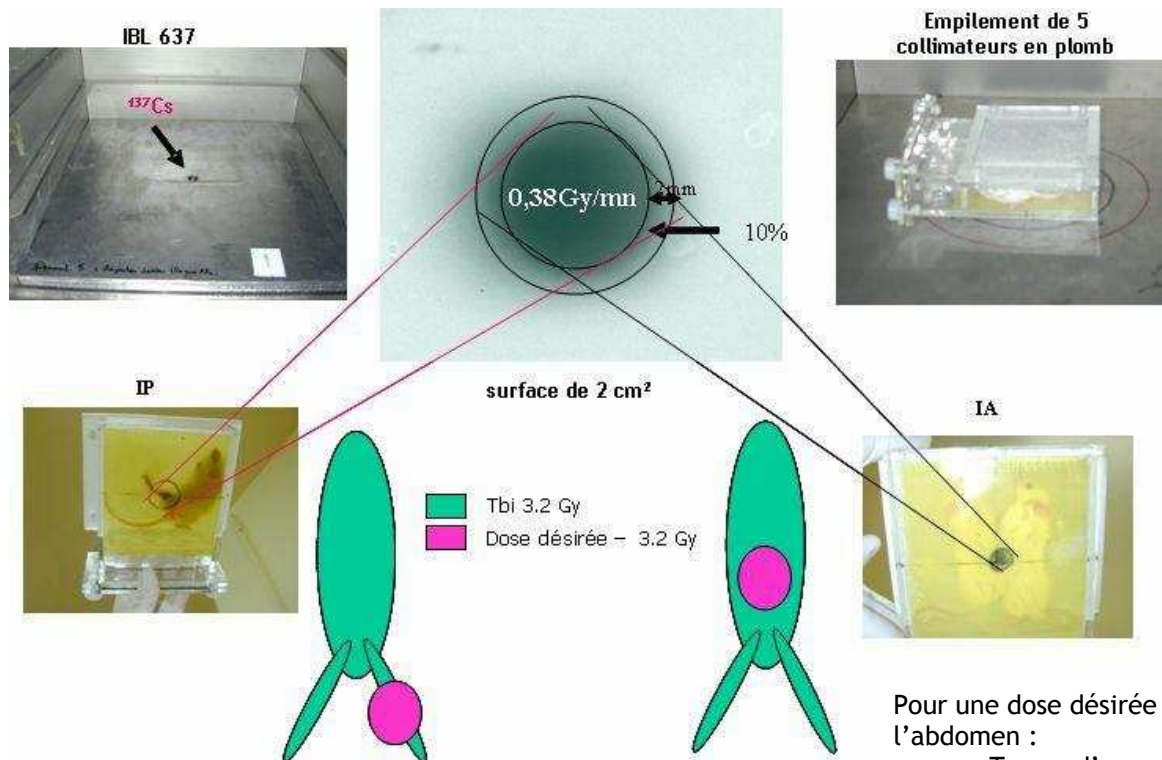
La figure suivante illustre les résultats de la dosimétrie réalisée en chambre d'ionisation pour les configurations d'irradiations localisées



A : Irradiation abdominale à 8 Gy

B : Irradiation de la patte droite postérieure de 15 à 30 Gy

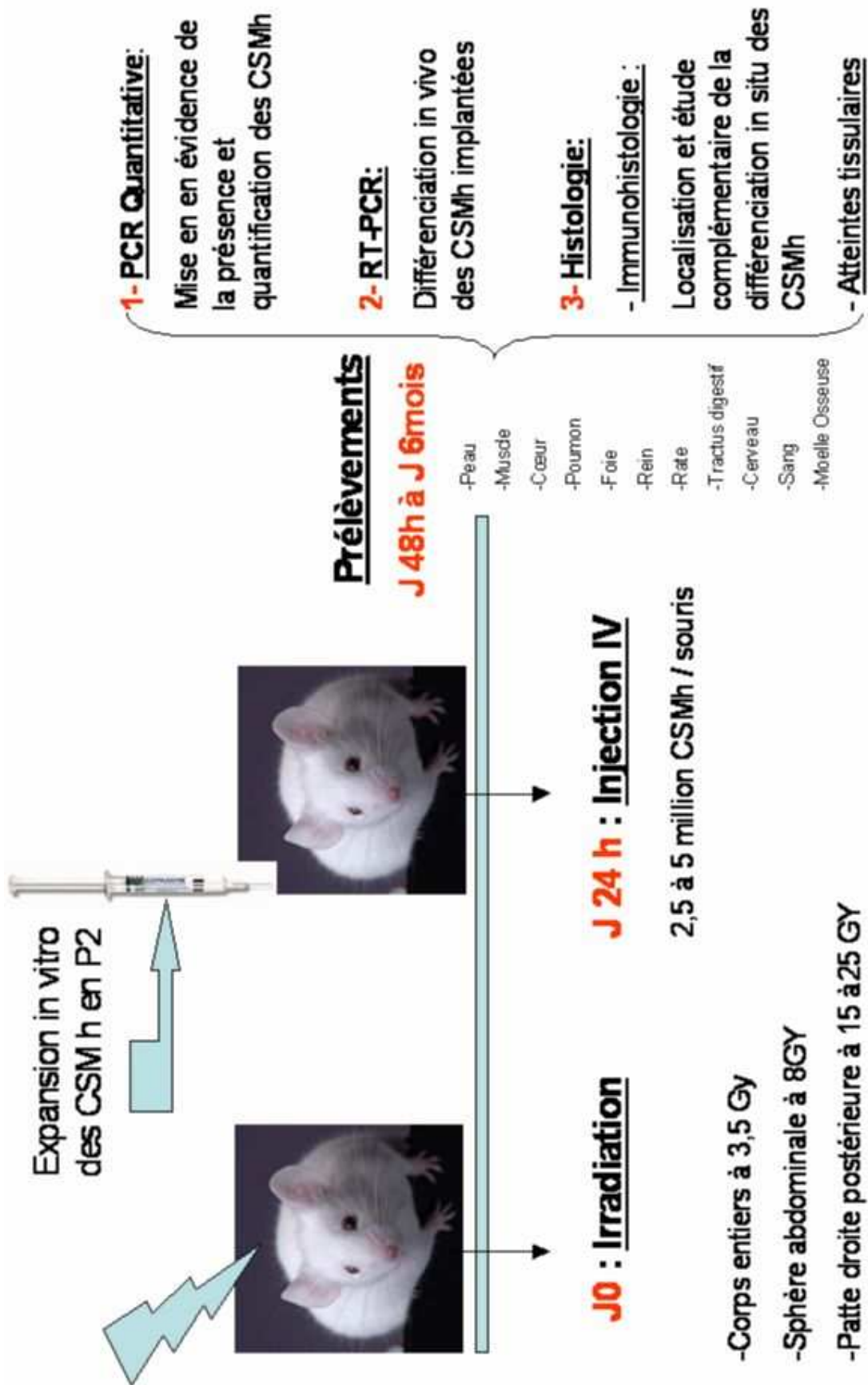
2-Illustration des configurations d'irradiations localisées IA et IP



Pour une dose désirée de 8 gy à l'abdomen :

- Temps d'exposition de l'abdomen : 15 minutes
- Temps d'exposition de l'ICE : 57 secondes

Dose désirée à la patte droite en Gy	Temps d'exposition de la patte droite en minutes	Temps d'exposition de l'ICE en seconde
15	36	57
20	48	57
25	60	57



Annexe 4 : Lyse de Globules rouges

Préparation Tampon de lyse :

Peser :

- Chlorure d'ammonium sigma®	NH ₄ Cl = 2.1 g
- Bicarbonate de sodium sigma®	NaHCO ₃ = 0.25 g
- Acide Ethylène diamine tetra acétique sigma®	EDTA = 0.01 g

Dissoudre dans 250 ml d'eau distillée et conserver à 4 °C pendant 1 semaine

Procédure de lyse des globules rouges :

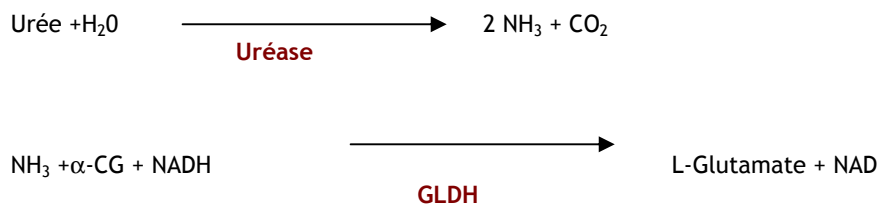
Cette procédure doit être réalisée sur un échantillon de sang fraîchement prélevé.

- 1-Préchauffer le tampon lyse à 37° C au bain marie
- 2-Mesurer le volume de sang à lyser et ajouter 9 volumes de tampon pour 1 volume de sang (pour 200µl de sang ajouter 1.8 ml de tampon de lyse bien homogénéisé manuellement)
- 3-Incuber 7 minutes au bain marie à 37° C
- 4-Arrêter la réaction par addition de volume à volume soit 2 ml de PBS 0,5% froid
- 5-Centrifuger 3 minutes à 13000 tours/minute
- 6-Reprenre le culot dans du PBS 0,5% froid, bien homogénéiser
- 7-Centrifuger 3 minutes à 13000 tours/minute
- 8-Enlever le surnageant et faire un culot sec et congeler à - 80° C

Annexe 5 : Dosage plasmatique de l'urée

Principe de la procédure Thermo clinical Labsystems Konelab 20®:

L'urée est hydrolysée en présence d'eau et d'uréease pour donner naissance à de l'ammoniac et à du dioxyde de carbone. En présence de glutamate déhydrogénase (GLDH) et de nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite (NADH), l'ammoniac se combine à l' α -cétoglutarate (α -CG) pour former du L-glutamate.



La diminution de l'absorbance à 340 nm qui en résulte, suite à la conversion du NADH en NAD est proportionnelle à la concentration en urée de l'échantillon. Les résultats sont calculés automatiquement par l'analyseur Konelab à l'aide d'une courbe de calibrage réalisée avec le produit calibrateur I. Il faut utiliser des échantillons de contrôle de qualité après chaque calibrage et à chaque fois qu'un nouveau flacon de réactif est ouvert (Nortrol, et Abtrol). Toute dilution est préalablement enregistrée et est automatiquement prise en compte par l'analyseur Konelab

- Stockage du réactif de 4 à 8 °C jusqu' à la date de péremption
- Analyse réalisée sur des échantillons d'urine, de sérum, de plasma hépariné ou prélevé sur EDTA, ne pas utiliser de sérum conservé avec du fluorure
- Les échantillons d'urine doivent être dilués avec de l'eau distillée.
- Critère d'acceptation des valeurs dans la limite de $\pm 10\%$ des valeurs initiales
- La limite de détection est de 1,1 mmol/l

Composition du réactif :

α -cétoglutarate	7,5 mmol/l
NADH	> 0,20 mmol/l
GLDH	> 5000U/l
Tampon tris	100 mmol/l
Agents de remplissage, stabilisants	
PH : 8,5	

Annexe 6 : Dosage plasmatique de la créatinine

Principe de la procédure Thermo clinical Labsystems Konelab 20®:

Le test est basé sur la méthode de Jaffé, où la créatinine génère une coloration rouge en présence d'une solution alcaline de picrate. Cette méthode modifiée mesure la vitesse à laquelle la créatinine produit un complexe coloré, ce qui réduit par conséquent les effets des substances interférentes. L'intensité colorée du complexe formé est mesurée à 510 nm. Les résultats sont calculés automatiquement par l'analyseur Konelab à l'aide d'une courbe de calibrage réalisée avec le produit calibrateur I. Il faut utiliser des échantillons de contrôle de qualité après chaque calibrage et à chaque fois qu'un nouveau flacon de réactif est ouvert (Nortrol, et Abtrol). Toute dilution est préalablement enregistrée et est automatiquement prise en compte par l'analyseur Konelab au cours du dosage

- Stockage du réactif de 4 à 8 °C jusqu' à la date de péremption
- Analyse réalisée sur des échantillons d'urine, de sérum, de plasma hépariné, ne pas utiliser de plasma prélevé sur EDTA
- Les échantillons d'urine doivent être dilués avec de l'eau distillée.
- Critère d'acceptation des valeurs dans la limite de $\pm 10\%$ des valeurs initiales
- La limite de détection est de 5 $\mu\text{mol/l/l}$

Composition du réactif A et réactif B:

Ajouter 30 ml du réactif B dans le flacon du réactif A.

Réactif A :

Acide picrique 14,2 mmol/l

Réactif B :

NaOH 520 mmol/l

Tampon phosphate 21 mmol/l

Stabilisants

Annexe 7 : Dosage plasmatique des transaminases AST et ALAT

1-Principe de la procédure du dosage de l'ASAT par le Thermo clinical Labsystems Konelab 20®:

L'AST catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate vers l'oxoglutarate avec formation de glutamate et d'oxalacétate. Ce dernier produit est réduit en malate par la déshydrogénase (MDH).



Au cours de cette réaction une quantité équivalente de NADH est oxydée en NAD. La diminution de l'absorbance à 340 nm qui en résulte est suivie et est directement proportionnelle à l'activité de l'ASAT dans le sérum. Les résultats sont calculés automatiquement par l'analyseur Konelab de la manière suivante.

Activité en U/l = DA/min * facteur

Facteur = $-\frac{(VT \cdot 1000)}{(6,3 \cdot VE \cdot L)}$

VT = volume total de réaction en ml

VE = Volume d'échantillon en ml

6.3 = Coefficient d'extinction du NADH à 340 nm

L = Longueur du trajet de la cuvette = 1

Il faut utiliser des échantillons de contrôle de qualité après chaque calibrage et à chaque fois qu'un nouveau flacon de réactif est ouvert. (Nortrol, et Abtrol). Toute dilution est préalablement enregistrée et est automatiquement prise en compte par l'analyseur Konelab

Dosage uniquement sur du sérum ou du plasma hépariné non hémolysé

Stockage du réactif de 4 à 8°C jusqu'à la date de péremption

Critère d'acceptation des valeurs dans la limite de $\pm 10\%$ des valeurs initiales

La limite de détection est de 2 à 3 U/l

Composition du réactif A et réactif B:

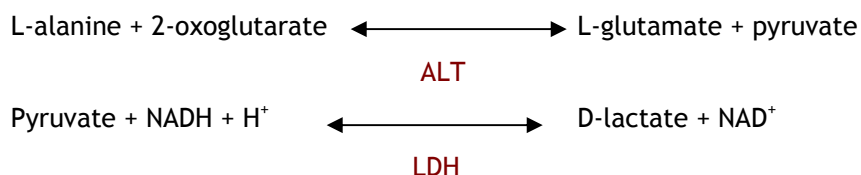
Ajouter le contenu du réactif B dans le flacon de réactif A :

Réactif A : Réactif enzymatique (tampon tris PH 7.8 à 110 mmol/l, L'aspartate à 325 mmol/l, LDH à >810 U/l, MDH à >810 mmol/l et du $\text{NaN}_3 < 0.1\%$)

Réactif B : Substrat (2-oxoglutarate à 65 mmol/l, NADH à 1.0 mmol/l et $\text{NaN}_3 < 0.1\%$)

2-Principe de la procédure du dosage de l'ALAT par le Thermo clinical Labsystems Konelab 20®:

L'ALT catalyse le transfert du groupe amine de l'alanine vers l'oxoglutarate avec formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate est réduit en lactate par la lactate déhydrogénase (LDH).



Au cours de cette même réaction, une quantité équivalente de NADH est oxydée en NAD. La diminution de l'absorbance à 340nm qui en résulte est suivie et est directement proportionnelle à l'activité de l'ALT dans l'échantillon. Les résultats sont calculés automatiquement par l'analyseur KONELAB™ de la manière suivante :

Activité en U/l = dA/min * facteur Facteur de conversion = $\mu\text{Kat/l} = (\text{U/l}) / 60$
Facteur théorique = - ((VT * 1000) / (6,3 * VE * L))

VT = Volume réactionnel total en ml

VE = Volume d'échantillon en ml

6.3 = Coefficient d'extinction moléculaire de NADH à 340 nm

L= Longueur du trajet optique de la cuvette de lecture = 1

Il faut utiliser des échantillons de contrôle de qualité après chaque calibrage et à chaque ouverture de nouveau flacon de réactif, (Nortrol et Abtrol). Toute dilution d'échantillon doit être préalablement enregistrée pour être prise en compte par l'automate lors de son analyse.

- Dosage uniquement sur sérum ou plasma hépariné limpides
- Stockage des réactifs de 4°C à 8°C jusqu'à la date de péremption
- Critère d'acceptation des valeurs dans la limite de $\pm 10\%$ des valeurs initiales
- La limite de détection est de 2 à 3 U/l
-

Composition du réactif A et B :

Ajouter le contenu du réactif B dans le flacon du réactif A

Réactif A : Réactif enzymatique (tampon tris PH 7,5 137,5 mmol/l ,L-Alanine 700 mmol/l,LDH >1650 U/l, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$) **Réactif B :** Substrat (2-oxoglutarate 82,5 mmol/l, NADH 1,0 mmol/l, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$)

Annexe 8 : Procédure d'extraction d'ADN à partir de tissu et d'échantillon de sang

1-Procédure d'extraction d'ADN à partir de tissu kit QIAamp DNA mini Qiagen®

Stockage du kit à température ambiante pendant 9 mois après ouverture

Après obtention des lysats tissulaire

- 1- Ajouter 200 µl de **tampon AL**, vortexer 15 secondes et centrifuger 1 minutes à 8000 tours/minute
- 2- Ajouter 200 µl d'**ethanol 70%**, vortexer 15 secondes et centrifuger 1 minute à 8000 tours/minute
- 3- Prélever le volume et le déposer sur **colonne QIAspin** du kit, centrifuger 1 minute à 8000 tours/minute
- 4- Placer les colonnes QIAspin dans de nouveaux tubes de 2 ml et jeter les lysats.
- 5- Ajouter 500 µl de **tampon AW1** sur les colonnes, centrifuger 1 minute à 8000 tours/minute
- 6- Placer les colonnes QIAspin sur dans de nouveaux tubes de 2 ml.
- 7-Ajouter 500 µl de **tampon AW2**, centrifuger 3 minutes à 14000 tours/minute
- 8- Placer les colonnes QIAspin sur de nouveaux tubes de 1,5 ml (Ependorf)
- 9- Ajouter 100 µl de **tampon AE**, laisser 1minute puis centrifuger 1 minute à 8000 tours/minute.
- 10- Répéter cette dernière étape.
- 11- Mesurer les volumes finaux et lire l'absorbance à 260nm.

2-Procédure d'extraction d'ADN à partir d'échantillon de sang Kit : Paxgene Blood DNA test®

Stockage du kit à température ambiante pendant 9 mois après ouverture

1- Préparation du mixte protéase-BG3

- La protéase se trouve sous forme lyophilisée, la dissoudre dans 1,4 ml de Buffer BG3 et aliquoter en aliquots de 100 µl et stocker à - 20°C.
- Pour chaque échantillon de sang ajouter 500 µl du mixte protéase-BG3 (5µl de protéase + 455 µl de BG3) , soit dilution 1/ 100 de la protéase dans du buffer BG3. Préparer le mixte en fonction de la quantité d'échantillon.

2- Extraction de l'ADN

Les culots secs d'ADN de sang doivent toujours être fait dans des tubes eppendorff de 2 ml.

- Reprendre le culot dans 1,25 ml de buffer BG1 et bien homogénéiser manuellement.
- Centrifuger 5 minutes à 10000 rpm, enlever délicatement le surnageant.
- Ajouter 500 µl de mixte protéase-BG3, vortexer immédiatement pendant 5 secondes et laisser incuber 10 minutes au bain marie à 65°C.
- Centrifuger 3 minutes à 10000 tours/minute, enlever le surnageant délicatement
- Ajouter 500 µl d'isopropanol (précipitation de l'ADN) bien homogénéiser manuellement
- Centrifuger 3 minutes à 10000 tours/minute, enlever le surnageant délicatement
- Faire sécher le culot au moins 5 minutes de manière à ne pas avoir de trace d'isopropanol
- Ajouter 500 µl Ethanol 70% vortexer pendant 5 secondes
- Centrifuger 3 minutes à 10000 tours/minute, enlever le surnageant, recentrifuger pae 1 pulse pour avoir un culot sec.
- Faire sécher le culot pendant 5 à10 minutes pour ne plus avoir de trace d'ethanol
- Ajouter 100 µl de buffer BG4, homogénéiser manuellement, laisser incuber 1h à 65°C, stocker à - 20°C ou bien laisser 30 minutes à température ambiante avant de lire l'absorbance à 260 nm.

Annexe 9 : Procédure d'extraction d'ARN à partir de tissu et synthèse d'ADNc

1-Extraction des ARN totaux

Après lyse tissulaire les ARN sont extraits selon le kit Rneasy Mini Kit de Qiagen®
Cette technique permet de préparer 100µg d'ARN total, utilisant les propriétés selective de liaison de la membrane de silical-gel-based. Seul les ARN ayant plus de 200 bases seront retenus sur la membrane, les ARN 5.8S, 5S et les ARNt ne se lieront pas à cette membrane.

Après obtention des lysats tissulaire

- 1- Ajouter 350 µl de tampon RLT + 10 µl de β-Mercapto, vortex, passer sur colonne QUIAshreder QUIAgen® et centrifuger 3 minutes à 14000 tours/minute
- 2- Mesurer le volume et Ajouter 1 volume 1/1 d'Ethanol 70% bien homogénéiser
- 3- Prélever le volume et le déposer sue colonne Rneasy du kit, centrifuger 15 minute à 10000 tours/minute
- 4- Récupérer la colonne et ajouter 700µl de Tampon RW1, centrifuger 15 secondes à 10000 tours/minute
- 5- Récupérer la colonne et ajouter 500µl de Tampon RPE, centrifuger 60 secondes à 10000 tours/minute
- 6- Récupérer la colonne et ajouter 500µl de Tampon RW2, centrifuger 120 secondes à 13500 tours/minute
- 7-récupérer la colonne et ajouter 20µl d'eau Rnase free, centrifuger 60 secondes à 10000 tours/minute
- 8- Répéter cette dernière étape.
- 9- Mesurer les volumes finaux et lire l'absorbance à 260nm.

2-Synthèse ADN complémentaire (ADNc), Superscript II RNase H Reverse Transcriptase Invitrogen®

Les ARN totaux sont stockés, après extraction à - 80°C, il faut les mettre dans la glace avant utilisatio et pendant toute la durée de la manipulation.

Décongeler les réactifs suivant au bain marie à 37°C :

- Les Amorces aléatoires : Random Primers
- Le mixte dNTP invitrogen®
- Le tampon first-stand 5X invitrogen®
- DTT invitrogen®

Garder la Rnase OUT™ set la superscript II™ dans un bloc à - 20°C

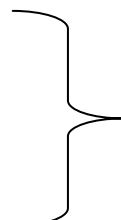
A-Dénaturation des ARN totaux :

- Incuber les échantillons d'ARN totaux dans un bain marie à 65°C pendant 5minutes (permettant la dénaturation des structures en tige-boucle)
- Remettre immédiatement après les échantillons dans la glace pour éviter la renaturation
- Préparation des échantillons : Il faut 1 µg d'ARN par réaction de retro-transcription, donc déterminé le volume nécessaire d'après la concentration d'ARN totaux connue. Le volume final est de 20 µl donc 10 µl de mixte du kit, les ARNs sont repris dans un volume d'eau RNase free inférieure ou égale à 10µl. Exemple : pour 1,1 µg d'ARN dans 11µl d'eau pour s'affranchir de 10% de perte de volume

B-Préparation du mixte invitrogen®

Déterminer le nombre d'échantillons en comptant 1 blanc sans ARN pour connaître le volume de mixte à préparer (compter un échantillon de plus pour avoir une marge d'erreur de pipetage)

- 1 µl de Random Primers
- 1 µl de mixte dNTP
- 4 µl de tampon First-Stand 5X
- 2 µl de DTT
- 1 µl de Rnase OUT™
- 1 µl de Superscript II™



10 µl pour un échantillon

C-Procédure de synthèse des ADNc

- Diluer les échantillons d'ARN totaux dans de l'eau distillée RNase free
- Dénaturer les ARN totaux à 65 °C dans un bain marie pendant 5 minutes
- Mélanger 10 µl d'ARN totaux dilué à 10 µl de mixte préparé
- Déposer les tubes dans le thermocycleur Biometra® préalablement programmé, pour hybrider les amorces, élonger les brins d'ADNc, dénaturer les enzymes. A la fin de ces cycles, stocker les ADNc à - 80°C

D-Procédure du Thermocycler BIOMETRA®

Le thermocycleur est constitué de 3 blocs indépendants, les programmations sont préenregistrées de 1 à 10.

Le programme :

10 minutes à 25°C = Hybridation des amorces sur les ARN

1 heure à 42°C = Elongation des brins d'ADNc

10 minutes à 92°C = Dénaturation de l'enzyme

24 heures à 4°C = Stockage des ADNc

Programmation :

L'appareil affiche Edit Sto : taper 1 (programme 1 = Bloque 1)

Taper enter pour visualiser les températures et les temps

Température 1 : 25°C Temps 1 = 10 minutes

Température 2 : 42 °C Temps 2 = 1 heure

Température 3 : 92°C Temps 3 = 10 minutes

Température 4 : 4°C Temps 4 = 24 heures maximum

End prog : Vérifier le nombre d'étapes = 4 steps

Pour démarrer, l'appareil affiche start : taper « start1 » pour bloque 1

Block 1 Sto : Appuyer sur enter

Attention vérifier que l'appareil soit bien à 25°C au départ

Annexe 10: Détermination du pourcentage de cellules positives en PCR

1-Procédure de PCR quantitative : chimie Taq-Man

a- Reconstitution des amorces à 1mM

Les amorces sont sous forme lyophilisées, les reconstituer à 1 mM dans H₂O distillée RNase free

- primer RAPSYN 1964F (sens) à 46,9 nmoles, resuspendre dans 469 µl H₂O
- Primer RAPSYN 1836R (anti-sens) à 58,5 nmoles resuspendre dans 585 µl H₂O
- Primer β-Globine 354F (sens) à 53,1 nmoles resuspendre dans 531 µl H₂O
- Primer β-Globine 455R (anti-sens) à 68,5 nmoles resuspendre dans 685 µl H₂O

b- Préparation d'1 solution amorces sens et anti-sens à 300 mM

Mixte sens et anti-sens RAPSYN

15 µl de primer sens (1964F)

+

15 µl de primer anti-sens (1836R)

+

470µl d' H₂O distillée RNase free

Aliquoter les mixtes à 100 µl et stocker à - 20° C

Mixte sens et anti-sens βGlobine :

15 µl de primer sens (354f)

+

15 µl de primer anti-sens (455r)

+

470µl d' H₂O distillée RNase free

1- Préparation des Sondes (Rapsyn et β-Globine)

Les sondes sont sous forme lyophilisées, les réhydrater dans 600µl distillée RNase free, aliquoter à 50 µl et stocker à - 20° C.

2- Préparation des gammes d'étalonnage d'ADN (murin et humain)

Gamme ADN humain : concentration de la solution mère : $DO_{260nm} * 50 * \text{Facteur de dilution}$

Exemple : [Sol JTE48] = 396,8ng

Dilution 1/10 = 2 µl solution mère dans 10 µl de solution d'ADN de spz de saumon

Obtention d'une solution fille à 39,68 ng/µl

Gamme de 100 ; 10 ; 1 et 0,1 ng par puits en duplicate :

Dilution en cascade :

sol 1 (100 ng) : 10 µl de solution fille + 24 µl sol ADN de spz

sol 2 (10 ng) : 3,4 µl de sol1 + 30,6 µl sol ADN de spz

sol 3 (1 ng) : 3,4 µl de sol2 + 30,6 µl sol ADN de spz

sol 4 (0,1ng) : 3,4 µl de sol3 + 30,6 µl sol ADN de spz

} Bien homogénéiser
entre chaque dilution

3- Préparation des échantillons d'ADN à 100ng

Dans chaque puits de plaque de PCR (96 puits) il faut toujours déposer 15,5 µl de mixte + 8,5 µl de solution d'ADN.

(8,5 µl en duplicate) + 1 (par précaution) = 8,5 * 3 = 25,5 µld'ADN dans lequel on souhaite avoir 300 ng d'ADN de l'échantillon.

Exemple :

Estomac [ES] : 18,95 ng d'ADN/µL

Pour avoir 300 ng d'ADN, prélever $(300/18,5) = 15,8$ µl de cette solution d'ADN , à laquelle on ajoute $(25,5 - 15,8) = 9,7$ µl de solution de spz de saumon.

4- Préparation des mixtes :

- **Mixte RAPSYN :**
 - 0,5 µl de sonde rapsyn
 - +
 - 2,5 µl de primers (sens et antisens :1964F,1836R)
 - +
 - 12,5 µl de tampon Taqman à 2X
 - =
 - 15.5µl de Mixte RAPSYN par puits

- **Mixte β-Globine :**
 - 0,5 µl de sonde rapsyn
 - +
 - 2,5 µl de primers (sens et antisens :354F, 455R)
 - +
 - 12,5 µl de tampon Taqman à 2X
 - =
 - 15.5µl de Mixte β-Globinepar puits

Pour calculer le volume de mixte nécessaire, compter le nombre de puits avec une précaution de 10%

2- La détermination du pourcentage de cellules positives en PCR est calculer à partir du nombre de copies contenue dans une certaine quantité dans d'ADN de souris ou d'homme :

1 copie de génome contient 3×10^9 paires de base et $1 \text{ bp} = 618 \text{ g/mol}$.

1 copie de génome = $(3 \times 10^9) \times (618 \text{ g/mol/bp}) = 1.85 \times 10^{12} \text{ g/mol}$

$(1,85 \times 10^{12} \text{ g/mol}) \times (1 \text{ mole} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ (le nombre d'Avogadro)}) = 3.08 \times 10^{12} \text{ g}$

Chaque cellule somatique contient 6,16pg d'ADN (diploïde).

Donc, 100 ng d'ADN génomique contient : $10000 \text{ pg de ADN} / 3.08 \text{ pg} = 33000 \text{ copies}$

Un ng d'ADN contient 330 copies

Il ya 2 copies du gène RAPSYN et du gène Bêta-globine par génome

Donc un ng d'ADN représente 165 cellules

Dans notre cas le Seuil pour bêta-globine est 0,01ng

0,01ng représentent $165 \times 0,01 = 1,65$ des cellules

Ces cellules humaines ont été détectées dans 100ng d'ADN de souris ($100 \text{ ng} \times 165 \text{ cellules} = 16500 \text{ cellules}$). Nous pouvons conclure que notre seuil est de 1,65 cellules humaines dans 16500 cellules de souris, une cellule humaine est détectée dans 10000 cellules de souris.

Le rapport direct d'ADN humain sur l'ADN de souris donne le même résultat par la simplification de la fraction :

$0,01 \text{ ng ADN humain} / 100 \text{ ng ADN de souris} = 0,0001$

Annexe 11- procédure de PCR sur ADN complémentaire

Pour la synthèse des ADNc se référer à l'annexe , on travaille sur 1µg d'ARN, mais ne connaissant pas l'efficacité de cette réaction on est contraint de considérer qu'il y a au final 1µg d'ADNc dans 20 µl : soit une solution à 50 ng d'ADNc/µl

Gamme d'ADNc de 10 ; 1 ; 0,1 ; 0,01 ng d'ADNc apportés par 5 µl d'échantillon dans un **volume réactionnel total de 25 µl par puits**

Solution fille : 2 µl de la solution mère (ADNc synthétisé)+ 48 µl d'eau RNase Free = Solution à 2 ng/µl soit 30 ng dans 15 µl (10 ng/ 5 µl dans chaque puits en duplicate + 1 par précaution)
Ensuite faire une dilution en cascade de 10 en 10 et bien homogénéiser entre chaque dilution

Témoin NAC : contenant 20 µl de mixte et 10 ng d'ARN non transcrit pour vérifier le taux de contamination par l'ADN génomique.

Témoin NTC : contenant 20 µl de mixte et 5 µl d'H₂O RNase free pour vérifier la contamination du mixte.

Composition du puits :

- 12,5 µl de tampon Taqman
- 2,5 µl de solution de sonde + amorce 18 S
- 5 µl H₂O RNase free
- 5 µl d'ADNc dilué à la concentration souhaitée

Recouvrir la plaque de 96 puits d'un papier transparent évitant toute contamination extérieure, centrifuger quelques secondes à vitesse modérée pour bien faire tomber les gouttes au fond du tube, placer la plaque dans l'appareil PCR et lancer le run.

Annexe 12: Procédure VIP tissue Tek®

Procédure de fixation et de déshydratation et d'imprégnation des organes par le programme 3 du VIP-Tissue-Tek™

Après prélèvements les organes sont incubés pendant 12 h dans du paraformaldéhyde 4% à température ambiante avant d'être déshydratés.

Ce programme VIP permet la déshydratation progressive des organes après fixation dans le formol et l'imprégnation de la paraffine (par une succession de bains d'éthanol, de butanol, de toluène, de xylène et de paraffine) pour conserver les organes dans des blocs de paraffine sur lesquels des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur sont effectués pour les analyses histologiques

Ce programme se déroule en 3 grandes étapes :

1- Une déshydratation progressive à 35 °C:

- | | |
|------------------------|------------|
| 1) Paraformaldéhyde 4% | 10 minutes |
| 2) Ethanol 80% | 10 minutes |
| 3) Ethanol 80% | 25 minutes |
| 4) Ethanol 95% | 10 minutes |
| 5) Ethanol 95% | 25 minutes |
| 6) Ethanol absolu | 25 minutes |

2- Un éclaircissement des organes à 35 °C :

- | | |
|------------|------------|
| 7) Butanol | 15 minutes |
| 8) Butanol | 15 minutes |

3- Une imprégnation de la paraffine dans les tissus

Une pré-imprégnation à 35 °C:

- | | |
|------------|------------|
| 9) Toluène | 40 minutes |
| 10) Xylène | 40 minutes |

Une imprégnation définitive de la paraffine à 58 °C :

- | | |
|---------------|------------|
| 11) Paraffine | 15 minutes |
| 12) Paraffine | 30 minutes |
| 13) Paraffine | 60 minutes |
| 14) Paraffine | 90 minutes |

Annexe 13: coloration tricromique HES

Les colorations HES accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différentes structures tissulaires. Cette coloration trichromique alliant une laque nucléaire (hematoxyline basique) un colorant cytoplasmique (éosine acide) et un colorant du collagène (safran)

Technique :

1. Déparaffinage (bains successifs de Xylène et d’Ethanol)
2. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
3. Incubation des lames dans un bain d’hemalyn pendant 5 minutes
4. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
5. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
6. Incubation des lames dans bain d’Ethanol-Hcl 1% pendant 1 minute
7. Passage des lames dans eau courante pendant 30 secondes
8. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
9. Incubation des lames dans une solution de carbonate de lithium
10. Passage des lames dans eau courante pendant 30 secondes
11. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
12. Incubation des lames dans une solution d’Erythrosine 1%
13. Passage des lames dans eau courante pendant 30 secondes
14. Passage des lames dans eau courante pendant 2 minutes
15. Incuber les lames dans un bain d’Ethanol 100% pendant 1 minute
16. Incuber les lames dans un bain d’Ethanol 100% pendant 1 minute
17. Incuber les lames dans une solution de safran pendant 8 minutes
18. Déshydratation des sections (bains successifs d’Ethanol et de Xylène)
19. Montage des lames

Pour chaque type tissulaire et à chaque coloration réalisée faire un essai pour déterminer les temps d’incubation du safran, de l’éosine et de l’hemalyn.

Filtrer les colorants avant utilisation

Annexe 13: Procédure de marquage immunohistologique de l'apoptose technique TUNEL

kit *In Situ* Cell Death ,POD de Roche Applied Science®

Principe : La réaction de TUNEL marque spécifiquement les coupures des brins d'ADN à l'extrémité libre 3'-OH, ceci permettant de distinguer l'apoptose de la nécrose

Les 3 grandes étapes du test :

1-Réaction de tunel : marquage des coupures des brins d'ADN par une terminal-deoxynucleotidyl-transférase (TdT) catalysant la polymérisation des nucléotides-FITC (marqués) en extrémité 3'OH des brins d'ADN.

2- L'incorporation des nucléotides FITC est détectée par un anticorps anti-FITC couplé à une peroxydase (POD)

3- Apport du substrat chromogène de la POD, le DAB qui au contact de l'enzyme entraîne un produit coloré marrow.

Technique :

1-déparaffinage

2- Incubation 10 minutes dans méthanol H₂O₂ 3% (Inhibition des peroxydases endogènes) sous agitation et sous hotte

3-Démasquage antigénique à la protéinase K (20µg/µl) pendant 10 minutes

50 ml Tris-HCl 10 mM PH 7,6 + 65 µl protéinase K

4- Saturation des sites de liaisons non spécifique au DaKo X0909 pendant 15 minutes puis rincer avec PBS 1X

5- déposer 50 µl du mixte (TDT + nucléotide-FITC) dilué au 1/7 par section et laisser incubé 60 minutes à 37°C sous faible agitation. Pour 10 section préparer 8 µl d'enzymz DNT + 72 µl de nucléotides-FITC + 480 µl de PBS 1X

6- Rincer 3 fois au PBS 1X

7- Incubation de 30 minutes de l'anticorps couplé à la POD dilué au 1/7

8- Rincer 3fois au PBS 1X

Révélation DAB, incubé les sections pendant 3 minutes sous agitation à l'abri de la lumière en présence du substrat (solution DAB)

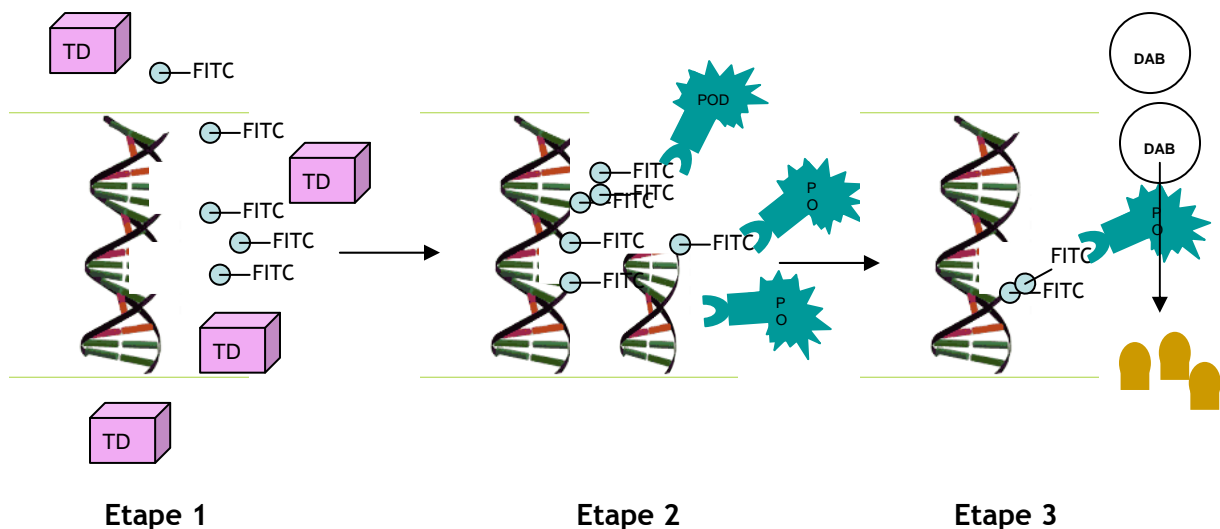
Contre coloration à l'hémalyne, incubation 3 minutes dans de l'hemalyn

Passage à l'eau courante 5 minutes

Incubation dans 3 bains d'Ethanol absolu

Incubation dans 3 bains de Xylène

Montage des lames



Annexe 14 : Procédure de marquage immunohistologique de Ki 67 murin.

Principe : Marquage de l'antigène Ki67 qui est exprimé durant toute la durée du cycle cellulaire, permet d'évaluer la fraction cellulaire en phase de croissance.

Anticorp anti-Ki67 murin sous forme lyophilisé, dissoudre dans 2 ml d'eau distillée et stocker à 4 °C jusqu'à la date de péremption.

Technique :

- 1- déparaffinage
- 2- Perméabilisation membranaire par incubation des lames dans du PBS 1X + triton 0,1, pendant 10 minutes sous agitation, Rincer 5 minutes sous eau courante.
- 3- Démasquage en bain marie à 99 °C pendant de 15 à 30 minutes suivant le tissu étudié dans du tampon citrate PH 6, incubé ensuite les lames dans un bain d'eau distillée pendant 5 minutes sous agitation
- 4- Inhibition des peroxydases endogènes, en incubant les lames dans du méthanol H₂O₂ 3% sous agitation et sous hotte
- 5- Passage des lames sous eau courante puis 3 rinçages dans tampon TBS sous agitation pendant 5 minutes
- 6- Entourer les sections de tissu avec du dakopen
- 7- Saturer les sites de liaisons non spécifiques en incubant toute la nuit les lames avec une goutte de Tris/BSA 4% par section à 4 °C sous faible agitation en chambre humide.
- 8- Saturation des avidines et des peroxydases endogènes :
 - 1 goutte de Blocker A ventana®, incubé 10 minute à 37 °C sous agitation
 - Rinçer en tampon TBS pendant 5 minutes
 - 1 goutte de Blocker B ventana®, incubé 10 minute à 37 °C sous agitation
 - Rinçer en tampon TBS pendant 5 minutes
- 9- Incubation des lames avec 150 µl d'anticorps primaire (M7249) dilué au 1/100 ème en tris BSA 1%, pendant 1 heure à 37 °C sous agitation.
- 10- Rinçer les lames 3 fois 5 minutes avec du tampon TTC
- 11- Incubation des lames avec 150 µl d'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (M0468) dilué au 1/200 ème en tris BSA 1%, pendant 1 heure à 37 °C sous agitation.
- 12- Rinçer les lames 3 fois 5 minutes avec du tampon TTC
- 13- Déposer 100µl du mixte ABC par section et incubé 30 minutes, sous agitation à température ambiante
 - 1 µl de la solution A + 1 µl de la solution B + 98 µl eau distillée pour 100µl de mixte
- 14- Laver 2 fois les lames pendant 5 minutes dans du tampon TTC
- 15- Laver 1 fois les lames pendant 5 minutes dans du tampon TBS
- 16- Déposer 100 µl de la solution DAB , incubé de 2 à 4 minutes à l'obscurité, sous agitation
- 17- Rincer à l'eau courante pendant 5 minutes
- 18- Contre coloration à l'hémalyne, incubation 3 minutes et rincer à l'eau courante
- 19- 3 bains d'ethanol absolu de 5 minutes
- 20- 3 bains de xylène de 5 minutes
- 21- Montage des lames

Tampon citrate 10 mM PH 6 :

Solution A : 10,5 g d'acide citrique dissout dans 500 ml d'eau distillée

Solution B : 29,41 g de C₆H₅O₇Na₃2H₂O dissout dans 1000 ml d'eau distillée

Pour 200 ml de tampon citrate PH 6 : 3,6 ml de solution A + 16,4 ml de solution B +180 d'eau distillée.

Tampon Tris 10X (0,5 M PH 7,6):

60,55g Tris + 376g de HCl à dissoudre dans 500 ml d'eau distillée

Tampon TBS (Tris 50 mM) :

100 ml de tampon tris 10X

9 g de NaCl

900 ml d'eau distillée

Annexe 15 : Procédure de marquage immunohistologique du marqueur prolifératif PCNA

Kit PCNA NOVOCASTRA®

Principe : Marquage de l'antigène PCNA qui est exprimé durant toute la durée du cycle cellulaire, permet d'évaluer la prolifération cellulaire.

Anticorps anti-PCNA sous forme lyophilisé, dissoudre dans 2 ml d'eau distillée et stocker à 4°C jusqu'à la date de péremption.

Technique :

- 1- déparaffinage
- 2- Perméabilisation membranaire par incubation des lames dans du PBS 1X + triton 0,1, pendant 10 minutes sous agitation, Rincer 5 minutes sous eau courante.
- 3- Démasquage en bain marie à 99°C pendant de 15 à 30 minutes suivant le tissu étudié dans du tampon citrate PH 6, Incuber ensuite les lames dans un bain d'eau distillée pendant 5 minutes sous agitation
- 4- Inhibition des peroxydases endogènes, en incubant les lames dans du méthanol H₂O₂ 3% sous agitation et sous hotte
- 5- Passage des lames sous eau courante puis 3 rinçages dans tampon TBS sous agitation pendant 5 minutes
- 6- Entourer les sections de tissu avec du dakopen
- 7- Saturer les sites de liaisons non spécifiques en incubant pendant 10 minutes les sections une goutte de Normal Rabbit Serum du kit à température ambiante en chambre humide.
- 8- Enlever l'excès de sérum (sans rincer)
- 9- Incubation des lames avec 150 µl d'anticorps primaire non, pendant 1 heure à 37°C sous agitation.
- 10- Rincer les lames 2 fois 5 minutes avec du tampon TBS
Incubation des lames avec 150 µl d'anticorps secondaire biotinylé) dilué au 1/500 ème en tampon TBS et incuber 30 minutes à 37°C sous agitation. Pendant ces 30 minutes préparer le réactif ABC du kit, 1 µl de la solution A + 1 µl de la solution B + 98 µl eau distillée pour 100µl de mixte
- 11- Laver 2 fois les lames pendant 5 minutes dans du tampon TBS
- 12- Déposer 100 µl de la solution DAB, incuber de 2 à 4 minutes à l'obscurité, sous agitation
- 13- Rincer à l'eau courante pendant 5 minutes
- 14- Contre coloration à l'hémalyne, incubation 3 minutes et rincer à l'eau courante
- 15- 3 bains d'éthanol absolu de 5 minutes
- 16- 3 bains de xylène de 5 minutes
- 17- Montage des lames

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abedin, M., Y. Tintut, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." Circ Res **95**(7): 671-6.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-22.
- Ailhaud, G. (1990). "Extracellular factors, signalling pathways and differentiation of adipose precursor cells." Curr Opin Cell Biol **2**(6): 1043-9.
- Alhadlaq, A., M. Tang, et al. (2005). "Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction." Tissue Eng **11**(3-4): 556-66.
- Allers, C., W. D. Sierralta, et al. (2004). "Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice." Transplantation **78**(4): 503-8.
- Almeida-Porada, G., A. W. Flake, et al. (1999). "Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero." Exp Hematol **27**(10): 1569-75.
- Alsalamah, S., R. Amin, et al. (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(5): 1522-32.
- Angelopoulou, M., E. Novelli, et al. (2003). "Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice." Exp Hematol **31**(5): 413-20.
- Anno, G. H., S. J. Baum, et al. (1989). "Symptomatology of acute radiation effects in humans after exposure to doses of 0.5-30 Gy." Health Phys **56**(6): 821-38.
- Armstrong, R. J. and C. N. Svendsen (2000). "Neural stem cells: from cell biology to cell replacement." Cell Transplant **9**(2): 139-52.
- Bach, S. P., A. G. Renehan, et al. (2000). "Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm." Carcinogenesis **21**(3): 469-76.
- Baksh, D, L. Song, R.S. Tuan. "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy." (2004) J Cell Mol med **8** (3): 301-16
- Banfi, A, G. Bianchi, et al (2002)"Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells" Tissue Eng **8** (6): 901-10
- Barry, F. P. and J. M. Murphy (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 568-84.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol. **30**:42-48
- Bennaceur-Griscelli, A., C. Pondarre, et al. (2001). "Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history." Blood **97**(2): 435-41.

- Bensidhoum, M., A. Chapel, et al. (2004). "Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment." Blood **103**(9): 3313-9.
- Bergonie, J. and L. Tribondeau (2003). "Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906." Yale J Biol Med **76**(4): 181-2.
- Bertho, J. M., M. Prat, et al. (2005). "Application of autologous hematopoietic cell therapy to a nonhuman primate model of heterogeneous high-dose irradiation." Radiat Res **163**(5): 557-70.
- Bianchi, G, A. Banfi, et al (2003). "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2". Exp cell Res **287** (1): 98-105
- Booth, C. and C. S. Potten (2000). "Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells." J Clin Invest **105**(11): 1493-9.
- Bosma, G. C., R. P. Custer, et al. (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." Nature **301**(5900): 527-30.
- Brand, S., T. Olszak, et al. (2005). "Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells." J Cell Biochem.
- Bruder, S. P., N. Jaiswal, et al. (1997). "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation." J Cell Biochem **64**(2): 278-94.
- Buckwalter, J. A. (1998). "Do intervertebral discs deserve their bad reputation?" Iowa Orthop J **18**: 1-11.
- Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." Clin Plast Surg **21**(3): 429-35.
- Caplan, A. I. and S. P. Bruder (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century." Trends Mol Med **7**(6): 259-64.
- Cattoretti, G., M. H. Becker, et al. (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." J Pathol **168**(4): 357-63.
- Chapel, A., J. M. Bertho, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome." J Gene Med **5**(12): 1028-38.
- Chen, L. B., X. B. Jiang, et al. (2004). "Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells." World J Gastroenterol **10**(20): 3016-20.
- Cheng, L., P. Qasba, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." J Cell Physiol **184**(1): 58-69.
- Colter, D. C., R. Class, et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3213-8.

- Colter, D. C., I. Sekiya, et al. (2001). "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7841-5.
- Conget, P. A. and J. J. Minguell (2000). "Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells." Exp Hematol **28**(4): 382-90.
- Corti, S., S. Strazzer, et al. (2002). "A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse." Exp Cell Res **277**(1): 74-85.
- Coulombel, L. (2003). "[Adult stem cells: seing is not being]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 683-94.
- Cruickshank, A. M., F. C. Ballantyne, et al. (1988). "Negative interference in a kinetic Jaffe method for serum creatinine determination." Ann Clin Biochem **25** (Pt 1): 112-3.
- Cuevas, P., F. Carceller, et al. (2004). "Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair." Neurol Res **26**(2): 230-2.
- Dainiak, N. (2002). "Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation." Exp Hematol **30**(6): 513-28.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age." Arthritis Rheum **44**(1): 85-95.
- Deitch, E. A. (2001). "Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure." Curr Opin Crit Care **7**(2): 92-8.
- Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-45.
- Dennis, J. E., J. P. Carbillet, et al. (2002). "The STRO-1+ marrow cell population is multipotential." Cells Tissues Organs **170**(2-3): 73-82.
- Devine, S. M., C. Cobbs, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates." Blood **101**(8): 2999-3001.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-43.
- Dicker, A., K. Le Blanc, et al. (2005). "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue." Exp Cell Res **308**(2): 283-90.
- Dietrich, J. B. (1997). "[Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family]." Arch Physiol Biochem **105**(2): 125-35.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-147.
- Direkze, N. C., S. J. Forbes, et al. (2003). "Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice." Stem Cells **21**(5): 514-20.
- Djouad, F., P. Ponce, et al. (2003). "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals." Blood **102**(10): 3837-44.

- Douay, L. and M. C. Giarratana (2005). "The cultured red blood cell: a study tool with therapeutic perspectives." Cell Cycle 4(8): 999-1000.
- Drouet, M., F. Mourcin, et al. (2004). "Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukin-3 in combination soon after irradiation prevents nonhuman primates from myelosuppression: long-term follow-up of hematopoiesis." Blood 103(3): 878-85.
- Ducy, P., R. Zhang, et al. (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." Cell 89(5): 747-54.
- Engelhardt, M., M. Lubbert, et al. (2002). "CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive?" Leukemia 16(9): 1603-8.
- Fehrer, C. and G. Lepperdinger (2005). "Mesenchymal stem cell aging." Exp Gerontol.
- Forte, G., M. Minieri, et al. (2005). "Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration and Differentiation." Stem Cells.
- Fouillard, L., M. Bensidhoum, et al (2003) "Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma." Leukemia 17 (2): 474-6
- Fowler, J. F. (1984). "Review: total doses in fractionated radiotherapy--implications of new radiobiological data." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 46(2): 103-20.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol 4(5): 267-74.
- Fukuda, K. (2002). "Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells." Congenit Anom (Kyoto) 42(1): 1-9.
- Fukushima, N. and H. Ohkawa (1995). "Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells." Crit Rev Oncol Hematol 20(3): 255-70.
- Galmiche, M. C., V. E. Koteliensky, et al. (1993). "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." Blood 82(1): 66-76.
- Gaugler, M. H. (2005). "A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure?" Br J Radiol Supplement 27: 100-105.
- Giordano, P., A. Courdi, et al. (1993). "[Forum on tissue expansion. Tissue expansion and radiotherapy. Changes in epidermal mitotic index induced by expansion and/or irradiation in the rat]." Ann Chir Plast Esthet 38(1): 62-8.
- Glennie, S., I. Soeiro, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells." Blood 105(7): 2821-7.
- Gori, F., T. Thomas, et al. (1999). "Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation." J Bone Miner Res 14(9): 1522-35.
- Gorin, N. C. (2002). "Autologous stem cell transplantation in acute lymphocytic leukemia." Stem Cells 20(1): 3-10.

- Gourmelon, P., C. Marquette, et al. (2005). "Involvement of the central nervous system in radiation-induced multi-organ dysfunction and/or failure." BJR Suppl **27**: 62-8.
- Griffiths, N. M. (2001). "The example of gastrointestinal damage induced by ionising radiation: are there accessible markers?" Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(3): 427-35.
- Gronthos, S., S. E. Graves, et al. (1994). "The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors." Blood **84**(12): 4164-73.
- Gunter-Smith, P. J. (1989). "Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. II. Correlation of alanine and theophylline response with morphology." Radiat Res **117**(3): 419-32.
- Guo, Z., P. Tang, et al. (2000). "Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow Support Hematopoiesis in Vitro." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **8**(2): 93-96.
- Gupta, S., S. Schulz-Maronde, et al. (2005). "Cloning, expression, and functional characterization of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) CC chemokine receptor 1." J Leukoc Biol **78**(5): 1175-84.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." Nature **401**(6751): 390-4.
- Hegner, B., M. Weber, et al. (2005). "Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." J Hypertens **23**(6): 1191-202.
- Himmerich, H., C. Kaufmann, et al. (2005). "Elevation of liver enzyme levels during psychopharmacological treatment is associated with weight gain." J Psychiatr Res **39**(1): 35-42.
- Hirama, T., S. Tanosaki, et al. (2003). "Initial medical management of patients severely irradiated in the Tokai-mura criticality accident." Br J Radiol **76**(904): 246-53.
- Honczarenko, M., Y. Le, et al. (2005). "Human Bone Marrow Stromal Cells Express A Distinct Set Of Biologically Functional Chemokine Receptors." Stem Cells.
- Horwitz, E. M. (2003). "Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy." Arch Med Res **34**(6): 600-6.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nat Med **5**(3): 309-13.
- Hovdenak, N., L. F. Fajardo, et al. (2000). "Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(4): 1111-7.
- Hu, Y., L. Liao, et al. (2003). "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas." J Lab Clin Med **141**(5): 342-9.
- Ikehara, S. (2005). "Intra-bone Marrow-Bone Marrow Transplantation: A New Strategy for Treatment of Stem Cell Disorders." Ann N Y Acad Sci **1051**: 626-34.
- Im, G. I., Y. W. Shin, et al. (2005). "Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?" Osteoarthritis Cartilage **13**(10): 845-53.

- Jones, E. A., A. English, et al. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." Arthritis Rheum **50**(3): 817-27.
- Jones, E. A., S. E. Kinsey, et al. (2002). "Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells." Arthritis Rheum **46**(12): 3349-60.
- Joshi, G. P., W. J. Nelson, et al. (1982). "Division probability and division delay in diploid Syrian hamster cells following a range of x-ray doses." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **41**(4): 443-8.
- Kataoka, S., J. Satoh, et al. (1983). "Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity." Diabetes **32**(3): 247-53.
- Kim, D. H., K. H. Yoo, et al. (2005). "Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell." Cytokine **31**(2): 119-26.
- Kim, J. W., R. L. Ferris, et al. (2005). "Chemokine C Receptor 7 Expression and Protection of Circulating CD8+ T Lymphocytes from Apoptosis." Clin Cancer Res **11**(21): 7901-10.
- Kinnaird, T., E. Stabile, et al. (2004). "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms." Circ Res **94**(5): 678-85.
- Kinner, B., J. M. Zaleskas, et al. (2002). "Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells." Exp Cell Res **278**(1): 72-83.
- Koc, O. N., J. Day, et al. (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." Bone Marrow Transplant **30**(4): 215-22.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, et al. (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." J Clin Oncol **18**(2): 307-16.
- Koc, O. N. and H. M. Lazarus (2001). "Mesenchymal stem cells: heading into the clinic." Bone Marrow Transplant **27**(3): 235-9.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-6.
- Kraitchman, D. L., M. Tatsumi, et al. (2005). "Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction." Circulation **112**(10): 1451-61.
- Kuebler, J. F., B. Toth, et al. (2003). "Differential alterations in intestinal permeability after trauma-hemorrhage." J Surg Res **112**(2): 198-204.
- Kuznetsov, S. A., A. J. Friedenstein, et al. (1997). "Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro." Br J Haematol **97**(3): 561-70.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-40.
- Lakshmiopathy, U., C. Verfaillie, et al (2005). "Stem cell plasticity." Blood **19** (1):29_38

- Lansdorp, P. M. (1995). "Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **23**(3): 187-91.
- Lapidot, T., A. Dar, et al. (2005). "How do stem cells find their way home?" Blood **106**(6): 1901-10.
- Laver, J., W. Ebell, et al. (1986). "Radiobiological properties of the human hematopoietic microenvironment: contrasting sensitivities of proliferative capacity and hematopoietic function to in vitro irradiation." Blood **67**(4): 1090-7.
- Lazarus, H. M., O. N. Koc, et al. (2005). "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients." Biol Blood Marrow Transplant **11**(5): 389-98.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, et al. (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." Lancet **363**(9419): 1439-41.
- Le Blanc, K., C. Tammik, et al. (2003). "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells." Exp Hematol **31**(10): 890-6.
- Lee, K. D., T. K. Kuo, et al. (2004). "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." Hepatology **40**(6): 1275-84.
- Lee, R.S , S.C. Hsu, et al (2005). "A subset of human rapidly-self renewing marrow stromal cells (MSCs) preferentially engraft in mice". Blood in press
- Lemischka, I. R. (1997). "Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells." Stem Cells **15** Suppl 1: 63-8.
- Li, J. Y., X. Y. La, et al. (2004). "[Telomerase activity of human bone marrow mesenchymal stem cells]." Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **33**(6): 481-5.
- Long, X., M. Olszewski, et al. (2005). "Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **14**(1): 65-9.
- Lou, J., F. Xu, et al. (1999). "Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo." J Orthop Res **17**(1): 43-50.
- Lowell, S., P. Jones, et al. (2000). "Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters." Curr Biol **10**(9): 491-500.
- Lu, L., C. Zhao, et al. (2005). "Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease." Brain Res Brain Res Protoc **15**(1): 46-51.
- Majumdar, M. K., M. Keane-Moore, et al. (2003). "Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells." J Biomed Sci **10**(2): 228-41.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, et al. (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." J Cell Physiol **176**(1): 57-66.
- Mantovani, A., F. Bussolino, et al. (1992). "Cytokine regulation of endothelial cell function." Faseb J **6**(8): 2591-9.
- Mbalaviele, G., N. Jaiswal, et al. (1999). "Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors." Endocrinology **140**(8): 3736-43.

- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* **276**(5309): 66-71.
- Messick, W. J., M. Koruda, et al. (1994). "Differential changes in intestinal permeability following burn injury." *J Trauma* **36**(3): 306-11; discussion 311-2.
- Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." *J Cell Physiol* **196**(3): 430-43.
- Minguell, J. J., P. Conget, et al. (2000). "Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells." *Braz J Med Biol Res* **33**(8): 881-7.
- Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(6): 507-20.
- Miura, M., Y. Miura, Y, et al (2005). "Accumulated Chromosomal Instability in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Malignant Transformation." *Stem cells in press*
- Mlekusch, W., M. Schillinger, et al. (2003). "Hypotension and bradycardia after elective carotid stenting: frequency and risk factors." *J Endovasc Ther* **10**(5): 851-9; discussion 860-1.
- Monti, P., J. Wysocki, et al. (2005). "The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure." *BJR Suppl* **27**: 89-94.
- Moulder, J. E. (2002). "Radiobiology of nuclear terrorism: report on an interagency workshop (Bethesda, MD, December 17-18, 2001)." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**(2): 327-8.
- Mourcin, F., N. Grenier, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims." *Radiat Res* **164**(1): 1-9.
- Muraglia, A., R. Cancedda, et al. (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." *J Cell Sci* **113** (Pt 7): 1161-6.
- Murphy, M., K. Reid, et al. (1997). "Neural stem cells." *J Investig Dermatol Symp Proc* **2**(1): 8-13.
- Muschler, G. F., C. Nakamoto, et al. (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." *J Bone Joint Surg Am* **86-A**(7): 1541-58.
- Nakagawa, H., S. Akita, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing." *Br J Dermatol* **153**(1): 29-36.
- Noel, D. F, Djouad et al (2002). "Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair." *Curr Opin Investig Drugs*. review **3** (7): 1000-4
- Noort, W. A., A. B. Kruisselbrink, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice." *Exp Hematol* **30**(8): 870-8.
- Nuttall, A. L., M. Guo, et al. (1997). "Basilar membrane velocity noise." *Hear Res* **114**(1-2): 35-42.
- Ohsuzu, F. (2004). "The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases." *J Atheroscler Thromb* **11**(6): 313-21.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." *Nature* **410**(6829): 701-5.

- Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." Ciba Found Symp **136**: 42-60.
- Pappas, N. J., Jr. (1989). "Enhanced cardiac enzyme profile." Clin Lab Med **9**(4): 689-716.
- Peled, A., O. Kollet, et al. (2000). "The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice." Blood **95**(11): 3289-96.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.
- Pittenger, M., P. Vanguri, et al. (2002). "Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy." J Musculoskelet Neuronal Interact **2**(4): 309-20.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Pittenger, M. F. and B. J. Martin (2004). "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." Circ Res **95**(1): 9-20.
- Potten, C. S. (2004). "Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine." Radiat Res **161**(2): 123-36.
- Poulton, L. D., M. J. Smyth, et al. (2001). "Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice." Int Immunol **13**(7): 887-96.
- Pountos, I. and P. V. Giannoudis (2005). "Biology of mesenchymal stem cells." Injury **36** Suppl 3: S8-S12.
- Prochazka, M., H. R. Gaskins, et al. (1992). "The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3290-4.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.
- Rasmusson, I., O. Ringden, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms." Exp Cell Res **305**(1): 33-41.
- Reyes, M., T. Lund, et al. (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." Blood **98**(9): 2615-25.
- Rich, T., R. L. Allen, et al. (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.
- Rojas, M., J. Xu, et al. (2005). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(2): 145-52.
- Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya, et al. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." Stem Cells **21**(1): 105-10.
- Rowe, J. M. (1997). "Bone marrow transplantation in first remission." Leukemia **11** Suppl 4: S12-4.
- Rubin, P. and G. W. Casarett (1968). "Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy." Cancer **22**(4): 767-78.
- Rubio, D. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation" Cancer Res **65** (8): 3035-9

- Salangcarnboriboon, R., H. Yoshitake, et al. (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." Exp Cell Res **287**(2): 289-300.
- Sato, Y., H. Araki, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion." Blood **106**(2): 756-63.
- Schmidt, U. and E. Loeser (1985). "Species differences in the formation of butadiene monoxide from 1,3-butadiene." Arch Toxicol **57**(4): 222-5.
- Schuler, W., I. J. Weiler, et al. (1986). "Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency." Cell **46**(7): 963-72.
- Segers, V. F., I. Van Riet, et al. (2005). "Mesenchymal Stem Cell Adhesion to Cardiac Microvascular Endothelium: Activators and Mechanisms." Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- Shake, J. G., P. J. Gruber, et al. (2002). "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects." Ann Thorac Surg **73**(6): 1919-25; discussion 1926.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-31.
- Silva, G. V., S. Litovsky, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model." Circulation **111**(2): 150-6.
- Sun, L., S. F. Abdelwahab, et al. (2004). "Recall antigen activation induces prompt release of CCR5 ligands from PBMC: implication in memory responses and immunization." Int Immunol **16**(11): 1623-31.
- Sutherland, H. J., C. J. Eaves, et al. (1991). "Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells." Blood **78**(3): 666-72.
- Tang, T., J. G. Hu, et al. (2004). "[Effect of mesenchymal stem cells transplantation on the apoptosis after rat myocardial infarction]." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **29**(3): 274-8.
- Tang, Y. L., Y. Tang, et al. (2005). "Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector." J Am Coll Cardiol **46**(7): 1339-50.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Toma, C., M. F. Pittenger, et al. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." Circulation **105**(1): 93-8.
- Tomita, M., Y. Adachi, et al. (2002). "Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina." Stem Cells **20**(4): 279-83.
- Tondreau, T., L. Lagneaux, et al. (2004). "Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential." Cytotherapy **6**(4): 372-9.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-56.

- Trott, K. R. and J. Kummermehr (1991). "Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. Accelerated repopulation in tumours and normal tissues." Radiother Oncol **22**(3): 159-60.
- Tubiana, M., R. Arriagada, et al. (1986). "Human cancer natural history, radiation induced immunodepression and post-operative radiation therapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **12**(4): 477-85.
- Tubiana, M. and M. Lalanne (1963). "[Hematologic Course Of Patients Subjected To Total-Body Irradiation For Organ Transplantation.]." Ann Radiol (Paris) **17**: 561-80.
- Tuli, R., M. R. Seghatoleslami, et al. (2003). "A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone." Mol Biotechnol **23**(1): 37-49.
- Turesson, I., J. Carlsson, et al. (2003). "Biological response to radiation therapy." Acta Oncol **42**(2): 92-106.
- Uematsu, K., K. Hattori, et al. (2005). "Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold." Biomaterials **26**(20): 4273-9.
- Van Damme, A., T. Vanden Driessche, et al. (2002). "Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy." Curr Gene Ther **2**(2): 195-209.
- Verfaillie, C. M. (2002). "Adult stem cells: assessing the case for pluripotency." Trends Cell Biol **12**(11): 502-8.
- Verfaillie, C. M. (2005). "Multipotent adult progenitor cells: an update." Novartis Found Symp **265**: 55-61; discussion 61-5, 92-7.
- Wai, L. K. (2004). "Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review." MedGenMed **6**(3): 19.
- Wakitani, S., T. Saito, et al. (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." Muscle Nerve **18**(12): 1417-26.
- Wang, T., Z. Xu, et al. (2005). "Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell." Int J Cardiol.
- Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-68.
- Wislet-Gendebien, S., G. Hans, et al. (2005). "Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype." Stem Cells **23**(3): 392-402.
- Wright, N. A. (2000). "Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer." Int J Exp Pathol **81**(2): 117-43.
- Xu, W., X. Zhang, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro." Exp Biol Med (Maywood) **229**(7): 623-31.
- Yamasaki, T., M. Deie, et al. (2005). "Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow." J Biomed Mater Res A **75**(1): 23-30.
- Yamazaki, K. and T. D. Allen (1991). "Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation." Blood Cells **17**(3): 527-49.

- Yoo, J. U., T. S. Barthel, et al. (1998). "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells." J Bone Joint Surg Am **80**(12): 1745-57.
- Young, H. E., C. Duplaa, et al. (2004). "Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering." Cell Biochem Biophys **40**(1): 1-80.
- Young, H. E., T. A. Steele, et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." Anat Rec **264**(1): 51-62.
- Young, R. G., D. L. Butler, et al. (1998). "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." J Orthop Res **16**(4): 406-13.
- Zhang, G. Q., C. H. Fang, et al. (2005). "[A study of rat mesenchymal stem cells (MSCs) differentiating into liver cells when co-cultured with rat hepatocytes.]" Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi **13**(9): 648-51.
- Zhang, T., C. J. Guo, et al. (2005). "Alcohol Suppresses IL-2-Induced CC Chemokine Production by Natural Killer Cells." Alcohol Clin Exp Res **29**(9): 1559-1567.
- Zhao, D. C., J. X. Lei, et al. (2005). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats." World J Gastroenterol **11**(22): 3431-40.
- Zhao, L. R., W. M. Duan, et al. (2002). "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." Exp Neurol **174**(1): 11-20.
- Zhou, Z., E. L. Jiang, et al. (2005). "[Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **13**(1): 54-8.
- Zhu, W., W. Xu, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." Exp Mol Pathol.
- Zimmermann, S., M. Voss, et al. (2003). "Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells." Leukemia **17**(6): 1146-9.