

IRSN

INSTITUT
DE SÛRITÉ NUCLEAIRE
ET DE SÛRÉTÉ INDUSTRIELLE

Utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans le traitement des atteintes tissulaires radio-induites

Moubarak MOUISEDDINE

Mai 2008

Laboratoire de Thérapie Cellulaire et de Radiobiologie Accidentelle
(LTCRA)

IRSN BP17 92262 Fontenay-Aux-Roses

**Utilisation des Cellules Souches Mésenchymateuses humaines
dans le traitement des atteintes tissulaires radio-induites**

Moubarak MOUISEDDINE

Université de Versailles-Saint-Quentin-En-Yvelines

Ecole Doctorale « Du génome aux organismes »

Directeur de thèse : Professeur Norbert-Claude GORIN

Correspondant IRSN : Docteur Alain CHAPEL

Mes Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Norbert-Claude Gorin, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux et de les présenter aujourd'hui. Je remercie le professeur Bernard Mignotte d'avoir accepté de présider le jury désigné pour évaluer ma thèse. Je remercie le docteur Jorgensen et le docteur Eder d'avoir accepté de faire partie du jury et pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail.

Je tiens à remercier le docteur Alain Chapel pour m'avoir conseillé scientifiquement, aider amicalement, soutenu souvent et supporter indéfiniment encore jusqu'à maintenant. Je remercie autant le docteur Mâamar Souïdi pour toute son implication dans ce travail, pour m'avoir guidé dans mes démarches et pour m'avoir suivi dans mon Arche. Merci de m'avoir prouvé que l'on pouvait être à la fois scientifiques, collègues, voisins et amis.

Je remercie également les docteurs Patrick Gourmelon, Jocelyne Aigueperse, Philippe Voisin et Patrick Laloi pour m'avoir accueilli au sein de l'IRSN et pour avoir mis à ma disposition les moyens plus que nécessaires pour la réalisation des travaux présentés aujourd'hui.

Je souhaite remercier les secrétaires hors paire ou joyeuses « secréteuzes ». Merci Sandrine Querne et Keltoum Medianna pour toujours avoir été là. Merci pour votre immense disponibilité. Merci pour m'avoir tant de fois durement aidé, calmement renseigné, gentiment embêté mais aussi si souvent nourri quand un creux plus d'une fois m'a saisi. Que Dieu vous accorde une confiserie au paradis. Merci Amandine pour toute l'aide et l'attention que tu as apporté à mon travail. Merci pour toute ta rigueur, ton organisation, ta disponibilité et ton adaptabilité. Désormais, je n'oublierai plus jamais l'heure du goûter ni tous ces moments passés et si courts qu'on aimerait qu'ils durent tout le temps. Si la vie était un long fleuve tranquille je t'aurai bien offert une canne à pêche.

En continuant sur la route des remerciements, je croise le bureau des postdocs, après un toc ! toc ! j'entre et mes mots s'entrechoquent : merci Awatif Lifrani et Fabienne Billiard, merci d'être à la fois si cool à y perdre la boule et si gentille sans roche ni anguille. Merci d'être venues à l'IRSN, ainsi j'ai pu vous croiser et j'ai aimé la scène. Est-ce par votre intense cadence ou pas, que de la science à l'ambiance il n'y a qu'un pas.

Je tiens surtout à remercier Sabine François, mon ancêtre scientifique ou ma fée clochette, bienveillante, soucieuse, amusante, généreuse plaisante même un peu râleuse. Merci ma petite Sabine pour tout ce que tu m'as apporté, donné, offert...

Merci à mon cher laboratoire, le LICRA, Christelle Demarquay, Noëlle Mathieu et Alexandra Sémont pour leur aide et leurs précieux conseils. On peut faire de si belles choses quand on ose. Pas besoin d'être onze pour former une équipe parce que la force du nombre n'est que l'ombre d'une force.

Je tiens à remercier Radia Tamara qui m'a beaucoup appris à travers nos discussions aussi riches qu'agréables. Pour remercier Jean Marc Bertho, il va falloir se lever tôt, merci pour ces beaux travaux, pour tout ce que tu m'as transmis au labo ou dans ma vie. Merci Pascale Monti pour tous ses précieux conseils, pour ta bonne humeur dès le matin et à chaque heure. Merci aussi à Bénédicte Allenet pour ses conseils rigoureux. Merci à Isabelle Dublineau et Christine Linard en duo, pour leur soutien leur humour et leur sourire.

Je remercie tous mes amis sans lesquels les journées se seraient un peu trop ressemblées, Fabien, Eric, Agnès, Georges, Valérie, Pascale, Aurélie, Frédéric, Emilie, Johanna, Karine, Yann, Olivier et Olivier qui m'ont chacun offert tant de bons moments en trois ans.

Je tiens à remercier tous ceux que j'ai vu arriver et qui me voient m'en aller, Radjini, Hélène, Caroline, Philippe, Line, Karlito et Rhym pour que mes mots rimes. Les moments ont tous une fin mais celle des meilleurs arrive plus vite.

Merci Samira pour ta joie, tes pensées et ta fidélité. Se connaître est une chance, un bien-être immense. Infirmière que tu es n'oublie jamais que la télépathie n'est pas une maladie.

Merci à Farida aussi même si elle ne lira pas ceci. L'encre de la vie est indélébile, je lui préfère l'encre imaginaire, elle n'écrit pas donc ne s'efface jamais.

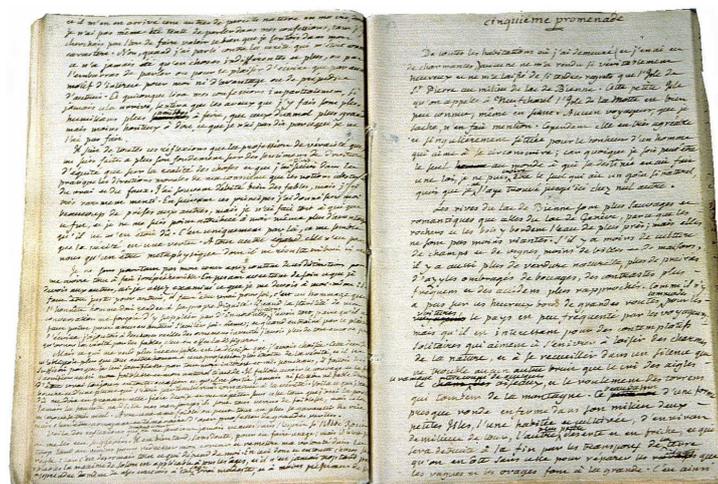
Merci à Salima pour avoir partagé avec moi de long mois de travail pour une lutte de taille qui n'a jamais eu de faille.

Merci Ingrid pour tous ces bons moments qui font de nos souffles un vent, de la pluie un océan et de nos vies une poésie à la longueur d'une thèse, pourvu que je me taise.

Au-delà des professionnels des sciences de la vie, je remercie ceux qui chaque jour composent la mienne. Je remercie ma mère, ma mère et ma mère sans laquelle je ne serais pas là pour écrire tout cela. Elle fut toujours près de moi, de l'été 1978 à l'été 2008, elle m'a toujours bordé de sa douceur, du bord de mon lit jusqu'au fond de mon cœur. Seule une mère peu en supporter autant d'une seule et même personne, je la remercie et prie pour qu'elle me pardonne. Je remercie mon père pour m'avoir appris à aborder la vie, à accepter tout en combattant et à se relever même mourant. Merci à mon frère Mounir et mes trois sœurs Nassera, Wahiba et ma petite Najiba, merci de m'avoir apporté cet environnement si chaleureux que plus d'une fois j'ai cru que le soleil était deux. Merci à Lahoucine Khalil et Yassine. Merci à ma femme Sonia pour son soutien du milieu à la fin, pour son dévouement si grand et pour son immense présence. Si elle n'existait pas elle me manquerait.

Merci à mes frères de cœur Khalid, Faissal et Youssef pour m'avoir encouragé, aidé, supporté et aimé (amicalement bien sûr, ne vous méprenez pas les gars). Merci mes frères Fiddine, parce que les moments les plus durs sont toujours ceux qui durent.

Je remercie Celui qui a créé le temps qui m'a permis de connaître autant de gens et de pouvoir les remercier également.



« Rêverie du promeneur solitaire » 1782 J-J Rousseau
source tecfu.unige.ch/proj/rousseau/ecrits.htm

Résumé

Les rayonnements ionisants peuvent induire des effets toxiques sur l'organisme. Ils entraînent des modifications physiologiques des tissus et/ou organes pouvant être létales. L'intestin est le premier tissu concerné par ces complications. L'irradiation induit une perturbation de l'absorption intestinale et une perte de l'intégrité de l'intestin. Les effets physiopathologiques radio-induits sur l'intestin peuvent entraîner des effets sur d'autres tissus ou organes comme le foie.

Les traitements actuels n'ont qu'une efficacité limitée ou ne sont pas toujours adaptés aux atteintes du système gastro-intestinal. En effet, dans ce type d'atteintes l'hétérogénéité des systèmes concernés et la gravité des lésions compliquent la prescription médicale.

Notre but est de montrer que la thérapie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines constitue une voie de recours efficace pour ce type d'atteinte. Les travaux présentés dans cette thèse montrent que les CSM sont des cellules multipotentes possédant une expression hétérogène de molécules. Ces cellules sont capables de s'implanter dans différents tissus dans un organisme irradié. Les résultats montrent que les CSM sont capables de restaurer l'intestin altéré par l'irradiation. De même nous avons observé que *via* leurs actions sur l'intestin, les CSM peuvent indirectement rétablir l'intégrité du foie.

Abstract

Ionising radiation can induce toxic effects on body. They provoke physiological modifications of tissues and organs which can be lethal. Total body irradiation or local abdominal irradiation can induce serious complications. Intestine is the first tissue concerned by these side effects. Radiation induces malabsorption of the intestine and lost of it integrity. Radio-induced physiopatological effects on intestine could lead to distant effects on other tissues and organs such as liver.

The actual treatments have a limited efficiency or are not adapted to gastro-intestinal damages. Indeed, in this type of lesions, the heterogeneous systems which are concerned and the gravity of lesions complicates the medical care.

Our purpose is to show that cell therapy using human mesenchymal stem cells (MSC) constitutes resolution in this type of illness. The works which are presented in this thesis show that MSC are multipotent and have heterogeneous expression of molecules. These cells are able to establish **themselves** in many organs and tissues after injection into irradiated body. Thus we have shown that MSC can prevent the small intestine from radio-induced damages. Indeed we demonstrate that through their actions on gut, MSC can indirectly restore hepatic integrity.

Valorisation

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Human Mesenchymal Stem Cells home specifically to radiation-injured tissues in a Non-Obese Diabetes/Severe Combined Immunodeficiency mouse model.** M. Mouiseddine, S. François, A. Semont, A. Sache, B. Allenet, N. Mathieu, J. Frick, D. Thierry, A. Chapel. *British Journal of Radiology*, 2007.
- **Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) contribute to the restoration of liver integrity after irradiation damage.** M. Mouiseddine, S. François, A. Semont, A. Sache, C. Demarquay, A. Athias, NC. Gorin, P. Gourmelon, M. Souidi, A. Chapel. *Stem Cells* (soumis).
- **Human Mesenchymal Stem Cell infusion protects against liver damage.** M. Mouiseddine, S. François, A. Semont, J. Frick, A. Sache, D. Thierry, NC. Gorin, P. Gourmelon, A. Chapel. *Transplantation* (soumis).
- **Characterization and histological localization of mesenchymal stem cells in the human thymus.** M. Mouiseddine, N. Mathieu, J. Stefani, C. Demarquay, JM. Bertho. *Stem Cells and Dev.* 2008.
- **Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model.** S. François, M. Mouiseddine, N. Mathieu, A. Semont, P. Monti, N. Dudoignon, A. Sache, A. Boutarfa, D. Thierry, P. Gourmelon, Alain Chapel. *Ann Hematol*, 2007.
- **Therapeutic use of mesenchymal stem cells in small intestinal failure: ability of MSC to improve structural and functional regeneration through cellular homeostasis regulation.** Moubarak Mouiseddine, Agnès François, Christelle Demarquay, Noelle Mathieu, Amandine Saché, Alain Chapel and Alexandra Sémont. (in press)
- **Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A Study of Their Quantitative distribution after irradiation damage.** S. François, M. Bensidhoum, M. Mouiseddine, C. Mazurier, B. Allenet, A. Semont, J. Frick, A. Sache, S. Bouchet, D. Thierry, P. Gourmelon, NC Gorin, A. Chapel. *Stem Cell*, 2006.
- **Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury.** A. Semont, S. François, M. Mouiseddine, A. François, A. Sache, J. Frick, D. Thierry, A. Chapel. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2006.
- **FLT3-ligand production by bone marrow stromal cells: influence of ionizing radiations and cytokines.** JM Bertho, C. Demarquay, M. Mouiseddine, N. Douenat, J. Frick, M. Prat, D. Thierry. *British Journal of Radiology*, 2006.
- **In vivo targeting of IL-3 into immature haematopoietic cells through CD 117 receptor mediated antibody gene delivery.** A. Chapel, O. Deas, M. Bensidhoum, S. François, M. Mouiseddine, P. Poncet, A. Dürrbach, J. Aigueperse, P. Gourmelon, NC. Gorin, F. Hirsch, D. Thierry. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2004.

CONGRÈS ET COMMUNICATIONS

Utilisation des Cellules Souches Mésenchymateuses humaines dans le traitement des atteintes tissulaires radioinduites. M. Mouiseddine. Journées des thèses IRSN, Aussois 2007 et Nice 2006.

Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) contribute by distant effect to restore the hepatic integrity disrupted after irradiation. M. Mouiseddine, S. François, A. Semont, A. Sache, C. Demarquay, A. Athias, NC. Gorin, P. Gourmelon, M. Souidi, A. Chapel. *ISSCR 2007, Cairns, Australie*.

Modulation de l'expression des gènes des cellules souches mésenchymateuses humaines avant et après greffe dans le modèle murin NOD/SCID irradié. M. Mouiseddine, M. Bensidhoum, S. François, J. Frick, S. Bouchet, C. Mazurier, C. Demarquay, JM Bertho, D. Thierry, M. Lopez, A. Chapel. *Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire, Val-de-Grâce, Paris*.

Sommaire

I Les rayonnements ionisants	11
<u>1. Irradiation</u>	11
<u>1.1. Définition</u>	11
<u>1.2. Effets biologiques</u>	12
<u>1.3. La mort cellulaire par les rayonnements</u>	17
<u>2. Les effets de l'irradiation chez l'homme</u>	17
<u>2.1. La radiothérapie</u>	17
2.1.1. Définition	
2.1.2. Techniques de Radiothérapies	
2.1.3. Irradiation des tissus	
2.1.3.1 Indications de la radiothérapie	
2.1.2.2. Doses de traitement anti-tumoral	
<u>2.2. Irradiation accidentelle</u>	23
2.2.1. Quelques accidents d'irradiation	
2.2.2. Enseignements des accidents d'irradiation	
<u>2.3. Les syndromes radio-induits</u>	29
<u>2.4. Une perspective de traitement : La thérapie cellulaire</u>	39
II Cellules souches et thérapie cellulaire	43
<u>1. Définition d'une cellule souche</u>	43
<u>2. Les différentes cellules souches</u>	44
<u>2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)</u>	45
<u>2.2. Les cellules souches fœtales</u>	47
<u>2.3. Les cellules souches adultes</u>	47
2.3.1. Propriétés	
2.3.2. Différents types de cellules souches adultes	
<u>2.4. Quelles cellules pour l'utilisation clinique</u>	51
<u>3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)</u>	51
<u>3.1. Localisation</u>	51
<u>3.2. Isolement et culture</u>	54
<u>3.3. Phénotypes et sous populations</u>	57
<u>3.4. Propriétés</u>	61
<u>3.5. Biodistribution</u>	63
<u>3.6. Utilisation thérapeutique</u>	65
<u>4. Les CSM pour le traitement des affections gastro-intestinales</u>	80
<u>4.2. Aspect cellulaire de la régénération hépatique</u>	
4.1.1. Cellules souches intestinales et renouvellement de l'épithélium	
4.1.2. Les complications intestinales radio-induites	
4.1.3. Traitements du tractus gastro-intestinal	
4.1.4. Les CSM dans le traitement des atteintes intestinales	
<u>4.2. Régénération hépatique</u>	85

4.2.1. <i>Les cellules souches hépatiques</i>	
4.2.1.1. Les cellules fœtales	
4.2.1.2. Les cellules ovales	
4.2.1.2.1. Définition et propriétés	
4.2.1.2.2. L'origine médullaire des cellules ovales	
4.2.2. <i>Les cellules souche mésenchymateuses dans les atteintes hépatiques</i>	
4.2.2.1. Etudes <i>in vitro</i>	
4.2.2.2. Application des cellules souches mésenchymateuses aux modèles <i>in vivo</i>	
4.2.3. <i>La grande question ou le phénomène de fusion cellulaire.</i>	
<u>4.3. CSM ou Cellules Sécrétrices de Médiateurs</u>	95
III Stratégie de l'étude	99
IV Les cellules souches mésenchymateuses humaines dans le traitement des atteintes hépatiques et gastro-intestinales après irradiation.	
<u>1. Premier objectif</u>	103
Etude de l'implantation des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un tissu lésé par l'irradiation.	
<u>2. Second objectif</u>	114
Etude de l'effet des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des lésions radio-induites du tractus gastro-intestinal.	
<u>3. Troisième objectif</u>	146
Etude de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des atteintes hépatiques induites.	
V Discussion	202
- Implantation des CSM à l'intérieur et à l'extérieur de la sphère abdominale	
- Effets et modes d'action des CSM sur l'intestin	
- Effets et modes d'action des CSM sur le foie	
VI Conclusion générale	214
VII Bibliographie	217
VIII Annexes	233
IX Articles	244

Glossaire

ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
ALAT	<i>ALanine Amino Transférase</i>
ARF	Acute Renal Faillure
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ASAT	<i>ASpartate Amino Transférase</i>
ARN _m	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
CD	Cluster of Differentiation
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>
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	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IA	Irradiation abdominale
ICE	Irradiation corps entier
IFN-g	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukine</i>
MAPC	<i>Multipotent Adult progenitor cells</i>
MCP-1	Monocyte chemotactic protéin-1
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha, CCL3</i>
MO	<i>Moelle Osseuse</i>
MMP	<i>Métalloprotéinases</i>
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic /Severe Combined Immunodeficient</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RANTES	CCL5
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α	Tumor necrosis factor α
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>

Figures

Figure 1 : Les rayons émis par les atomes ont des capacités différentes.

Figure 2 : Les réponses biologiques à l'irradiation

Figure 3 : Origine des cellules souches embryonnaires

Figure 4 : Les cellules souches des différents tissus

Figure 5 : Filiation des cellules souches de la moelle osseuse

Figure 6 : Différenciation in vitro des Cellules Souches Mésoenchymateuses humaines en cellules adipeuses, osseuses et cartilagineuses

Figure 7 : Mésoengénèse ou formation des différents tissus originaires du mésoderme par les CSM

Figure 8 : Exemple d'ingénierie tissulaire : le cartilage

Figure 9 : Organisation de l'intestin en villosités

Figure 10 : Organisation des canaux hépatiques

Tableaux

Tableau 1 : Les radio-éléments de la curie thérapie

Tableau 2 : Les grandeurs en radiobiologie

Tableau 3 : Doses de radiothérapie en fonction du volume de la tumeur

Tableau 4 : Doses de radiothérapie en fonction du type de tumeur

Tableau 5 : Nombre de victimes suivant la dose d'irradiation reçue lors de l'accident de Tchernobyl

Tableau 6 : Récapitulatifs des traitements utilisés lors des irradiations accidentelles mortels de 1962 à 1991

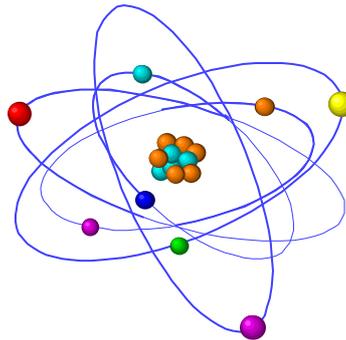
Tableau 7 : Localisation des cellules souches humaines et leur potentiel de différenciation

Tableau 8 : potentiel de différenciation des CSM issues de différents tissus

Tableau 9 : comparaison de l'expression de marqueurs membranaires entre différents types de cellules souches stromales médullaires

Tableau 10 : Expression des CSM de moelle osseuse en culture

I Les rayonnements ionisants



1. Irradiation

1.1. Définition

Un rayonnement ionisant possède l'énergie nécessaire pour arracher un ou plusieurs électrons des atomes du milieu irradié. Il existe différents types de rayonnements (figure 1).

- Les rayonnements électriques chargés : ce sont les rayons alpha et bêta. Ils émettent leur énergie sous forme de particules chargées.

- Les rayonnements électriques non chargés : ce sont les rayons gamma. Ils regroupent les neutrons et les ondes électromagnétiques de haute fréquence.

Les rayonnements ionisants naturels sont issus d'atomes instables qui émettent des rayons α , β ou γ en se désintégrant. Il est possible cependant d'obtenir des rayonnements ionisants par des générateurs comme les accélérateurs linéaires ou les cyclotrons. Les rayonnements sont produits sous forme de faisceaux de neutrons, de protons ou d'électrons. Il n'en est pas de même pour les rayons X qui sont générés par une projection d'électrons sur une cible métallique.

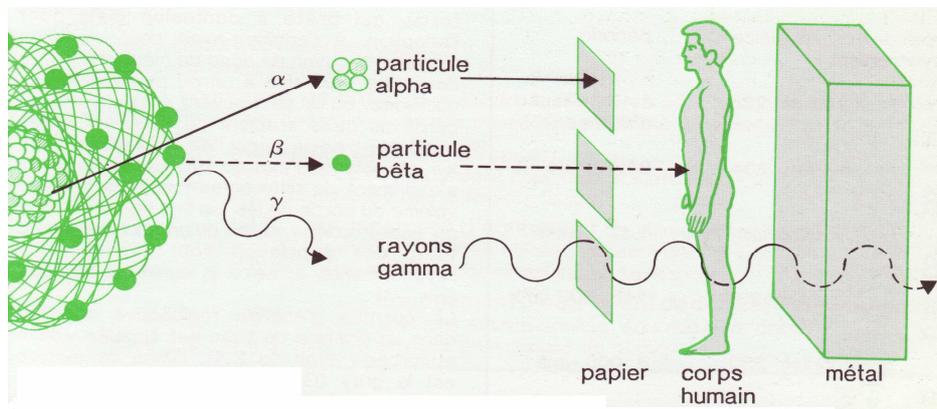


Figure 1 : Les radiations émises par les atomes ont des capacités différentes.

En effet, les particules alpha sont arrêtées par une feuille de papier. Les particules bêta sont arrêtées par quelques centimètres de plexiglas ou de tissu vivant. Les rayons gamma traversent les tissus mais sont arrêtés par une épaisse couche de plomb ou de béton.

1.2. Effets biologiques

L'irradiation entraîne de nombreux dommages sur les systèmes biologiques. Les rayonnements provoquent, sur les cibles biologiques, des réactions d'ionisations, d'excitations ainsi que d'autres modifications moléculaires (Booz, Paretzke et al. 1987).

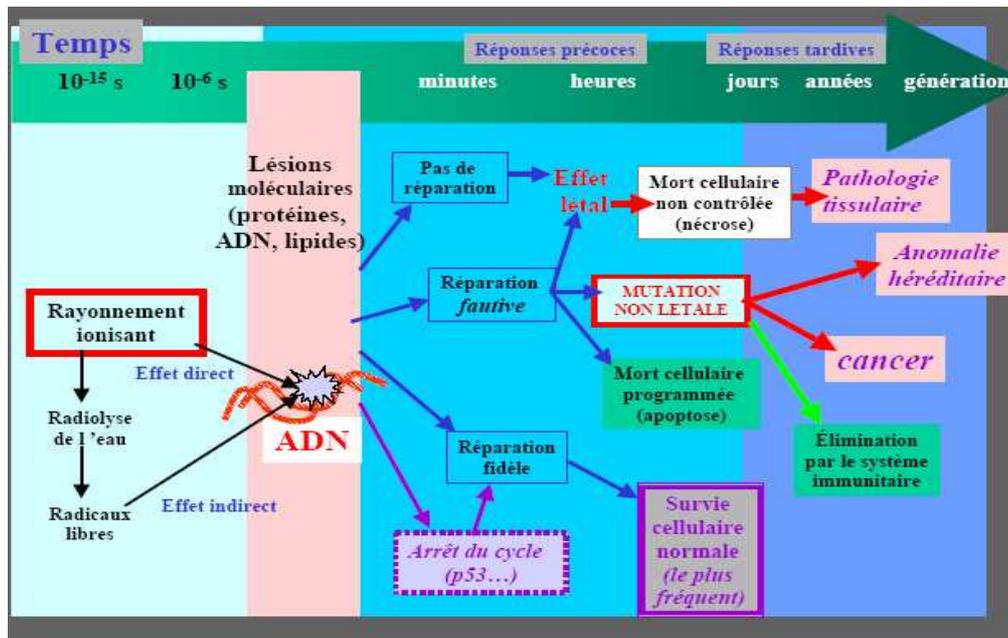


Figure 2 : Les réponses biologiques à l'irradiation

Les rayonnements ionisants induisent des modifications sur l'ADN et peuvent avoir des conséquences multiples sur les cellules et au niveau des tissus. Source : www-sante.ujf-grenoble.fr

L'action des radiations ionisantes dans les tissus est un processus complexe et hétérogène qui se déroule chronologiquement selon trois phases :

- Phase physique

Elle est relativement courte (quelques secondes seulement) et caractérisée par des ionisations et excitations moléculaires faisant suite au dépôt d'énergie lors de la traversée du faisceau.

- Phase physico-chimique

Elle dure quelques secondes à quelques minutes. Les molécules ionisées et excitées lors de la phase physique réagissent entre elles et avec les molécules voisines. L'effet direct dont la cible est représentée par les macromolécules cellulaires, notamment l'ADN, est distingué de

l'effet indirect qui est la conséquence des réactions entre les macromolécules et les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau (figure 2).

En présence d'oxygène, des espèces radicalaires à fort pouvoir oxydant sont formées et interagissent pour aboutir à la formation d'eau oxygénée, particulièrement oxydante.

De ce fait, une irradiation pratiquée en présence d'oxygène va générer la formation d'un plus grand nombre de molécules d'eau oxygénée qu'en conditions hypoxiques. "L'effet oxygène" consiste en une augmentation de la radiosensibilité cellulaire testée en présence d'oxygène par rapport à des conditions hypoxiques.

- Phase biologique

● Actions sur les acides nucléiques

Les dommages de l'irradiation sur les chromosomes ont été caractérisés depuis de longues années et constituent encore actuellement un large domaine d'études (Lloyd, Purrott et al. 1975) (Pohl-Ruling, Fischer et al. 1986) (Ballarini, Biaggi et al. 2002) (Ballarini and Ottolenghi 2003). L'ADN est une des cibles principales des radiations ionisantes (Nygren, Ljungman et al. 1995) (Friedland, Bernhardt et al. 2002). La mort cellulaire survient à des doses d'irradiation beaucoup plus faibles et à une fréquence beaucoup plus grande lorsque l'irradiation touche le noyau. En effet, les lésions cellulaires responsables de la létalité sont surtout celles qui surviennent sur l'ADN (Friedland, Jacob et al. 2006).

Les lésions observées :

- le plus souvent, des cassures simple-brin sans gap (ou trou), par rupture des ponts diester, considérées comme non létales car réparables par une ligase ; la demi-vie de cette réparation varie de deux à dix minutes,
- plus rarement, des cassures simple-brin avec gap par perte d'un sucre et d'une base, nécessitant un temps de réparation plus long du fait de l'action d'une polymérase et d'une ligase,
- parfois, des altérations des bases, non létales mais pouvant être à l'origine d'une mutation en cas de non réparation ou de réparation fautive. Ces lésions sont réparées à 80% dans les 15 minutes suivant l'irradiation par des mécanismes d'excision-resynthèse faisant intervenir endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases,
- enfin, des cassures double-brin, qui peuvent résulter d'un évènement touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple-brin indépendantes (source UNSCEAR. The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) (2000). Chaque cassure double-brin est létale en cas de non-réparation, et le nombre de cassures double-brin conditionne la radiosensibilité cellulaire. L'aptitude à la réparation des cassures double-brin dépend de leur type : elles seront plus difficilement réparables s'il

existe une perte associée de matériel chromosomique, en cas de pontage avec des protéines, ou encore si elles sont multiples et rapprochées. On considère qu'une cassure double-brin survient pour 20 cassures simple-brin.

● Action sur les protéines

La modification radio-induite de la structure protéique conduit à des perturbations de la physiologie cellulaire pouvant contribuer au processus final de létalité. Les points d'impacts sont très nombreux mais les doses nécessaires pour modifier les protéines sont très supérieures à celles capables de tuer les cellules. L'irradiation d'une cellule peut entraîner les effets suivants :

- altération de la perméabilité membranaire par action sur les pompes ioniques notamment,
- diminution de la communication intercellulaire, par perturbation des protéines **composant** les jonctions de type gap,
- modification de la transduction transmembranaire.
- inactivation d'enzymes par modification de la conformation en trois dimensions.

● Action sur les lipides

L'irradiation des membranes cellulaires induit la formation de radicaux libres. Ces radicaux, aptes à fixer l'oxygène moléculaire, entraînent la peroxydation des lipides et donc une diminution de la fluidité membranaire. Cependant les membranes sont souvent pourvues d'agents antioxydants comme la vitamine E ou le glutathion réduit qui empêchent la propagation de ces réactions.

1.3. La mort cellulaire par les rayonnements

La mort cellulaire par les rayonnements est l'action biologique principalement recherchée en radiothérapie (figure 2). La mort cellulaire par nécrose est une conséquence des cassures d'ADN (surtout double brin). La cellule devient incapable de se diviser ce qui entraîne sa mort de façon différée. De ce fait, plus une cellule se divise et plus elle est exposée à cet effet : elle est dite radiosensibles. En revanche, une cellule qui se divise peu est moins exposée et est dite radiorésistante. Autrement dit la radiosensibilité augmente avec le pouvoir de proliférer. Les neurones, les hématies et les leucocytes sont radio-résistants alors que les lymphocytes sont radiosensibles. La mort cellulaire peut aussi se produire par apoptose (mort cellulaire programmée) après activation ou inhibition de certains gènes du cycle cellulaire (p53, p21, Rb, cycline...). Les aberrations chromosomiques des lymphocytes peuvent être utilisées comme indicateur biologique en dosimétrie (Edwards 1997).

Comme nous l'avons vu précédemment, par différents mécanismes enzymatiques les cellules irradiées sont capables de réparer leur ADN (polymérase, ligase...). La réparation de l'ADN est plus efficace chez les cellules saines que chez les cellules cancéreuses. C'est sur ce principe d'effet différentiel qu'est basée la radiothérapie. Afin d'optimiser cet effet différentiel entre le tissu sain et le tissu cancéreux, l'irradiation est fractionnée dans le temps. C'est-à-dire que la dose d'irradiation est délivrée en plusieurs plus petites doses réparties dans le temps suivant un protocole choisi par le radiothérapeute.

Notons aussi, comme nous l'avons déjà dit, que la présence d'oxygène augmente la radiosensibilité et que pour une même dose d'irradiation « l'effet oxygène » génère trois fois plus de mort cellulaire qu'en hypoxie. Or la majorité des tumeurs présentent une zone hypoxique au centre (par absence de vascularisation) donc radio-résistante. En revanche, la périphérie d'une tumeur est plutôt bien oxygénée. C'est pour cela que lors d'un traitement anti-tumoral par radiothérapie, un surdosage focalisé est alors nécessaire pour que l'irradiation atteigne la zone centrale.

2. Les effets de l'irradiation chez l'homme

2.1. La radiothérapie

2.1.1. Définition

La radiothérapie est un traitement locorégional du cancer qui utilise les radiations, c'est-à-dire les rayonnements ionisants, pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. La cible des rayons est l'ADN des cellules tumorales.

Un rayonnement ionisant est un flux de particules en mouvement capables de créer des ions dans les tissus qu'ils traversent.

Actuellement, les radiations ionisantes utilisées sont essentiellement les photons et les électrons.

La radiothérapie est utilisée chez plus de la moitié des patients ayant un cancer. Elle est, avec la chirurgie, le traitement le plus fréquent et le plus efficace des cancers et peut entraîner une guérison à elle seule. Elle peut être utilisée seule ou associée à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie suivant le type de tumeur, de sa localisation, de son stade d'évolution et de l'état général du patient.

La radiothérapie est peu contraignante du fait qu'elle se déroule en plusieurs séances de courte durée et que les effets secondaires sont moindres que lors d'une chimiothérapie.

2.1.2. Techniques de Radiothérapies

Face à la complexité et l'hétérogénéité des tumeurs, les médecins et radiothérapeutes ont recours à différentes techniques de radiothérapies.

- La radiothérapie externe regroupant l'ensemble des techniques utilisant une source de rayonnement située à l'extérieur du malade et généralement à une certaine distance de lui. Il peut s'agir d'une bombe au cobalt ou d'un accélérateur linéaire de particules.
- La curiethérapie ou brachythérapie consiste en l'utilisation de sources radioactives scellées (tableau 1), contenant de l'iridium ou du césium, placées au cours d'une intervention dans les tissus tumoraux ou dans une cavité naturelle, comme le vagin, l'utérus par exemple.

	Période	Energie (MeV)	Présentation & utilisation
Radium 226 (Ra)	1 622 ans	g = 1,4	Tube (aiguille)
Césium 137 (Cs)	30 ans	g = 0,66	Tube (aiguille)
Cobalt 60 (Co)	5,3 ans	g = 1,25	Source de télécobalt
Tantale 182 (Ta)	111 jours	g = 1,1	Fil
Iridium 192 (Ir)	74 jours	g = 0,34	Fil
Iode 125 (I)	60 jours	g = 0,03	Grain (implant permanent)
Or 198 (Au)	2,7 jours	g = 0,41	Grain (implant permanent) Solution injectable
Phosphore 32 (P)	14,3 jours	b = 1,7	Solution injectable
Strontium 90 (Sr)	28 ans	b = 0,5	Applicateur solide
Yttrium 90 (Y)	2,7 jours	b = 2,2	Grain
Ruthénium 106 (Ru)	367 jours	b = 3,5	Applicateur solide

Tableau 1 : Les radio-éléments de la curie thérapie

La curiethérapie utilise des sources radioactives placées dans les tissus dans lesquels se situe la tumeur.

- La radiothérapie métabolique utilise des sources radioactives, généralement injectables, non scellées, qui vont se fixer sur les cellules cibles en fonction de leur métabolisme. Il peut s'agir d'iode 131 pour traiter certains cancers de la thyroïde, de phosphore 32 pour le traitement de la maladie de Vaquez (syndrome myéloprolifératif atteignant la lignée érythrocytaire). Le strontium 89 (Metastron™) et le samarium 153 (Quadramet™) sont utilisés dans le traitement des métastases osseuses.

2.1.3. Irradiation des tissus

2.1.3.1 Indications de la radiothérapie

- La radiothérapie « curative »

Elle a pour objectif de stériliser définitivement toutes les cellules tumorales contenues dans le volume irradié afin d'obtenir le contrôle local et si possible la guérison du cancer. La radiothérapie peut être la seule thérapeutique ou s'associer à la chirurgie ou à la chimiothérapie.

Le protocole habituel délivre une dose de 10 Gy par semaine au rythme de 5 séances de 2 Gy par jour. La dose totale, selon les circonstances cliniques, varie de 30 à 70 Gy.

- La radiothérapie « palliative »

Elle s'adresse à des lésions qui n'entraînent pas nécessairement de symptômes gênants, qui ne menacent pas forcément la vie dans un bref délai. Elle est utilisée dans le traitement des tumeurs :

- ▶ Localement trop grosses pour être opérées ou stérilisées par la radiothérapie,
- ▶ Métastatiques avec lésion primitive évolutive.

L'objectif du traitement de radiothérapie est, au prix d'un traitement court et peu agressif, de freiner l'évolution de la maladie en assurant au patient une rémission clinique aussi longue que possible et surtout sans trouble majeur.

- La radiothérapie « symptomatique »

Elle a pour but de soulager un symptôme, comme la douleur, généralement à un stade évolué de la maladie mais parfois à une phase plus précoce. Son efficacité est :

- ▶ **Antalgique** : l'effet antalgique de l'irradiation est presque constant et se manifeste rapidement en 24 - 48 heures.
- ▶ **Hémostatique** : les hémorragies, rectales, vésicales, ORL, gynécologiques, sont traitées efficacement par quelques séances d'irradiation.
- ▶ **Décompressive** : les oedèmes par compression veineuse ou lymphatique sont bien améliorés par la radiothérapie.

Lorsqu'un faisceau de radiations ionisantes pénètre dans les tissus, une partie du rayonnement est absorbée, une autre est déviée de sa trajectoire par phénomène de diffusion et la troisième partie est transmise sans interaction. Le phénomène de diffusion explique facilement pourquoi les régions situées hors du champ d'irradiation peuvent malgré tout recevoir une certaine dose de rayonnements. Une des avancées majeures de la

radiothérapie est la quantification précise de la dose absorbée par les tissus. Cette dernière se mesure et se calcule à l'aide de dosimètres.

<i>Grandeur</i>	<i>Définition</i>	<i>Unité</i>
Activité (A)	Nombre de transformations nucléaires par seconde	Becquerel (Bq)
Dose absorbée (D)	Energie absorbée par l'unité de masse de matière irradiée	Gray (Gy)
Dose équivalente (H _T)	$H_T = D \cdot W_R$ où W_R = facteur de pondération pour les rayonnements	Sievert (Sv)
Dose efficace (E)	$E = \sum H_T \cdot W_T$ où W_T = facteur de pondération pour les tissus	Sievert (Sv)

Tableau 2 : Les grandeurs en radiobiologie

La radiobiologie utilise différentes grandeurs. On distingue l'activité, la dose absorbée, la dose équivalente et la dose efficace définies dans ce tableau.

2.1.2.2. Doses de traitement anti-tumoral

La dose absorbée représente la quantité d'énergie absorbée (tableau 2), par unité de matière. Cette dose absorbée est différente de l'énergie émise. Autrefois exprimée en Rad elle se mesure aujourd'hui en Gray, 1 Gy représentant 1 Joule déposé dans 1 kg de matière. Bien que représentant une quantité d'énergie extrêmement faible, un Gray, représente une quantité d'énergie extrêmement importante pour les tissus vivants. En effet, une dose de 5 Gy en irradiation unique globale représente la DL 50 pour l'Homme. Une dose létale 50 (DL 50) est une dose qui entraîne 50 % de décès en 15 jours. Par comparaison, ces mêmes 5 Gy n'élèvent la température d'un litre d'eau que de 0,0018 degré celsius.

La dose habituellement prescrite dans le traitement des cancers ORL, en radiothérapie exclusive est de 70 Gy délivrés localement et de manière fractionnée.

La dose prescrite va d'abord dépendre du type de la tumeur et notamment des effets histologiques associés. De plus, le volume de la tumeur est un critère déterminant pour le choix de la dose de traitement (tableau 3).

Volume tumoral	Dose moyenne (90 % de stérilisation)
Maladie infraclinique	45 - 60 Gy
Tumeur < 2 cm	60 - 64 Gy
2 cm < Tumeur < 4 cm	65 - 70 Gy
Tumeur > 4 cm	75 - 85 Gy

Tableau 3 : Doses de radiothérapie en fonction du volume de la tumeur

En radiothérapie, la dose de traitement prend en compte la taille de la tumeur. Plus la tumeur est grande et plus la dose d'irradiation délivrée est importante.

La dose dépend aussi de l'objectif du traitement : curatif, palliatif ou symptomatique, que le radiothérapeute se fixe.

Le tableau ci-dessous donne les doses moyennes efficaces pour stériliser une tumeur suivant le tissu concerné. Nous pouvons remarquer par exemple qu'entre une leucémie et un mélanome, les doses peuvent varier d'un facteur 5 (tableau 4). Notons que pour le choix d'un traitement, les zones à irradier sont déterminantes. En effet, suivant l'étendu du champ à irradier et la radiosensibilité des tissus qu'il contient les doses appliquées seront différentes (plus l'irradiation est localisée et plus il est possible d'augmenter la dose).

Tumeur	Dose (90 % de stérilisation)
Leucémie	15 - 25 Gy
Maladie de Hodgkin	30 - 45 Gy
Carcinome épidermoïde	55 - 75 Gy
Adénocarcinome	55 - 80 Gy
Carcinome urothélial	60 - 75 Gy
Gliome	60 - 80 Gy
Mélanome	70 - 85 Gy

Tableau 4 : Doses de radiothérapie en fonction du type de tumeur

En radiothérapie, la dose délivrée est définie en fonction du type de tumeur. Exemple : le traitement d'un mélanome nécessite une dose d'irradiation plus importante que pour le traitement d'une leucémie.

Complications sur les tissus sains

Aujourd'hui, le principal inconvénient de la radiothérapie reste l'irradiation des tissus sains. En effet, que ce soit par diffusion ou par surdosage l'irradiation, même sélective, atteint des cellules saines qui ne vont pas forcément toutes se restaurer. Ces dommages cellulaires peuvent, s'ils sont répétés fréquemment, engendrer des atteintes tissulaires qui elles même risquent d'entraîner des perturbations fonctionnelles et/ou structurales d'un organe. Ensembles, ces dommages collatéraux représentent un vaste champ de besoins médicaux. Un des challenges actuels est de protéger ou de restaurer les tissus sains inclus dans le champ d'irradiation thérapeutique. Une telle avancée permettrait alors d'optimiser le traitement anti-tumoral.

2.2. Irradiation accidentelle

2.2.1. Quelques accidents d'irradiation

L'utilisation de la radioactivité a déjà causé plusieurs accidents à travers le monde.

- Tchernobyl (1986)

L'Ukraine, le Belarus et la Russie ont été contaminés par des dépôts de césium 137 supérieurs à 37 Bq par m², qui se sont échappés de la centrale accidentée (Poiarkov 1999). Les conséquences sur la santé dépendent de la dose reçue (tableau 5) et concernent essentiellement trois catégories de personnes : les intervenants immédiats, les liquidateurs (chargé de la décontamination, de la restauration, de la construction de sarcophages...) et les populations locales.

Nombre de victimes	dose reçue (D)
20	D > 6 Gy
21	4 < D < 6 Gy
51	2 < D < 4 Gy
140	1 < D < 2 Gy

Tableau 5 : Nombre de victimes suivant la dose d'irradiation reçue lors de l'accident de Tchernobyl

Dans cet accident, les doses reçues par les victimes sont très hétérogènes.

Cinquante six victimes ont souffert de graves brûlures, onze d'entre elles en moururent. Parmi les blessés les plus atteints, treize ont eu des lésions pulmonaires et dix huit ont

souffert d'un syndrome digestif. Au total, dans les semaines qui ont suivi l'accident, vingt huit individus sont morts des conséquences directes de leur irradiation lors de l'intervention.

- Géorgie (2 décembre 2001)

Le 2 décembre 2001, en Géorgie, trois bûcherons ont trouvé deux cylindres autour desquels la neige avait fondu et les ont utilisées comme source de chaleur. Au bout de quelques heures, ils ont présenté les signes classiques d'un syndrome aigu d'irradiation. Des brûlures étendues sont apparues au bout d'une à deux semaines. Les cylindres en question étaient en fait des générateurs thermoélectriques fonctionnant avec une source de strontium 90 de 1,3 PBq délivrant un débit de dose de 1 Gy/h à 1 mètre. Deux victimes qui ont reçu des doses comprises entre 2 et 3 Gy, ont souffert d'une aplasie profonde. Les trois patients ont présenté des brûlures évolutives graves au niveau du dos, aux mains et aux jambes.

- Chili (15 décembre 2005)

Trois ouvriers ont été en contact avec une source d'iridium 192, perdue la veille sur un chantier à la suite d'une opération de gammagraphie. En raison de la gravité de l'évolution des lésions, un des ouvriers fut évacué en France à l'hôpital de Percy, deux semaines après l'accident. Il présentait une desquamation humide à la fesse gauche qui a rapidement évolué en ulcération et une ulcération douloureuse au niveau de la muqueuse buccale. Les lésions les plus importantes sont apparues au niveau de la main gauche dont l'examen a révélé une inflammation et des lésions érythémateuses (Lataillade, Doucet et al. 2007).

- Belgique (11 mars 2006)

Le 11 mars 2006, à Fleurus, en Belgique, un réparateur pénétré dans une cellule d'irradiation d'une installation industrielle utilisée pour la stérilisation de matériels médicaux et de produits alimentaires, alors qu'il pensait que la source était en position sûre. C'est lors de cette visite procédurière, d'une vingtaine de secondes environ, que l'employé a été exposé à la source de cobalt 60 de 30 PBq. A la suite d'une alopecie naissante, trois semaines plus tard, le diagnostic étiologique a été évoqué. La surexposition, estimée supérieure à 4 Gy, a entraîné une aplasie profonde.

- Dakar (été 2006)

Au Sénégal, à Dakar puis en Côte d'Ivoire à Abidjan, des irradiations accidentelles ont eu lieu pendant plusieurs semaines avec une source d'iridium 192 utilisée pour la gammagraphie. Deux vigiles et deux opérateurs ont reçu de fortes doses et, en raison de la gravité de leur état, ont été transférés en France, à l'hôpital de Percy. Une des victimes présentait des lésions radio-induites au niveau du creux axillaire gauche qui ont évoluées favorablement. En revanche, les lésions de la face postérieure du bras gauche présentaient une radionécrose extensive.

- Epinal (2005-2006)

L'accident de radiothérapie survenu au centre hospitalier d'Epinal est le plus important jamais enregistré en France. Une erreur de calcul a entraîné une irradiation supérieure de 20 % aux 70 à 78 Gy prescrits (Peiffert, Simon et al. 2007). Les conséquences sont gravissimes pour les 24 patients traités pour cancer de la prostate entre mai 2005 et août 2006. Une deuxième cohorte de 397 patients a reçu une dose supplémentaire de moindre importance (10 %), expliquant un taux de rectites importantes et inhabituelles constatées par les gastro-entérologues. Les patients traités souffraient pour la plupart de rectites et cystites invalidantes, nécessitant parfois une colostomie ou une urétérostomie. Cinq d'entre eux sont décédés, dont quatre des séquelles de l'accident. D'autres souffraient d'une incontinence anale ou vésicale sévère.

Notons cependant que ces accidents ne sont pas les seuls et qu'il en a été répertorié en moyenne un tous les deux ans entre 1962 et 1991 (tableau 6). Le nombre de victimes est très variable et dans chaque cas, un traitement adapté est prescrit.

Type de traitement	Lieu, Date	Nombre de morts	Survies (jours)	Cause de la mort (organe défaillant)
CONVENTIONNEL (transfusions)	Mexique 1962	4	38-210	moelle osseuse
	Italie 1975	1	13	système nerveux, infection
	Algérie 1978	1	53	poumon, moelle, brûlures
	Norvège 1982	1	13	moelle osseuse, rein
	Maroc 1984	8	45	moelle osseuse
	Chine 1992	3	14	moelle osseuse
	Estonie 1994 Russie 1997	1 1	35 3	moelle osseuse, rein cœur
TRANSPLANTATION (moelle osseuse ou foie fœtal)	Ukraine 1986	28	30 ^(f)	brûlures, GVHD ^(f)
	Israël ^(b) 1990	1	36	poumon, tube digestif
	Japon ^(b) 1999	1	83	rein, foie, poumon, cœur
FACTEURS DE CROISSANCE (G-CSF, GM-CSF, IL-3)	Brésil 1987	4	35	moelle osseuse
	Salvador 1989	1	180	poumon
	Belarus 1991	1	113	poumon, lésions multiples

Tableau 6 : Récapitulatifs des traitements utilisés lors des irradiations accidentelles mortels de 1962 à 1991

Les accidents d'irradiations concernent les quatre coins du monde et peuvent atteindre une ou plusieurs victimes à chaque fois. Cependant, des traitements plus ou moins efficaces peuvent être administrés.

2.2.2. Enseignements des accidents d'irradiation

Les accidents exposés ci-dessus ne sont malheureusement pas les seuls. En effet, il existe à travers le monde, de nombreux accidents aux scénarios aussi différents qu'in vraisemblables (Chao 2007). Ces accidents peuvent être d'origine militaire, industrielle ou médicale mais aussi, plus rarement, des actes de malveillance. Certains ont été recensés aux Etats-Unis en 1974 et en France dans les années 80.

Dans les installations fixes, les accidents surviennent par défaut d'application de règles élémentaires de sûreté, par manque de formation du personnel et par défaut d'application des règlements et consignes ; il est fréquent que certaines sources, particulièrement des sources industrielles itinérantes, soient démunies de tout document accompagnateur.

Trop de petites sources sont égarées. Ces sources orphelines causent souvent des blessures graves et les victimes arrivent tardivement en milieu médical. Des améliorations portant sur la sûreté et la gestion de ces sources sont indispensables. L'absence ou l'insuffisance du respect des réglementations constitue un facteur aggravant (Ash 2007).

2.3. Les syndromes radio-induits

Précédemment, nous avons vu que l'irradiation pouvait avoir des effets au niveau cellulaire en entraînant la mort ou en affectant la prolifération des cellules d'un tissu. Ces effets sont dus à une action des rayonnements sur l'ADN, les protéines ou les lipides constituant les cellules.

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 Gray. Cette même dose éliminera les cellules souches et donc leur descendance. 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 and Tribondeau 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. 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 devient irréversible.

- Le syndrome-gastro-intestinal

L'intestin est l'un des organes le plus radiosensible 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, Wysocki 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 hydrominérales importantes ainsi que la septicémie peuvent mettre en jeu la survie de l'individu irradié (Monti, Wysocki et al. 2005).

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, Wysocki et al. 2005).

- Le syndrome hématopoïétique

Le syndrome hématopoïétique apparaît très rapidement après irradiation du fait de la radiosensibilité de la moelle osseuse. Elle est le siège de l'hématopoïèse, processus impliquant de nombreuses divisions cellulaires. L'aplasie médullaire radio induite a pour conséquence principale une chute des éléments figurés du sang. Les lymphocytes sont les premiers à disparaître par apoptose, dès les premières quarante huit heures après irradiation. Ensuite, les neutrophiles, les plaquettes et les hématies disparaissent progressivement (Tubiana and Lalanne 1963). Ceci entraîne des risques infectieux, chez la victime, liés à la chute des neutrophiles ainsi que des risques hémorragiques liés à la chute des plaquettes.

L'irradiation affecte directement l'hématopoïèse 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, Ebell et al. 1986; Yamazaki and Allen 1991). Dans les quelques heures qui suivent une irradiation corporelle, une baisse brutale des progéniteurs hématopoïétiques est observée (Drouet, Mourcin 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 2002) mène à une pancytopénie radio-induite dont la sévérité est liée à la profondeur de l'aplasie médullaire (carence cellulaire au niveau de la moelle osseuse). 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 ayant reçu une dose d'irradiation faible, voir nulle. L'hématopoïèse résiduelle dans les territoires médullaires préservés peut permettre une reprise fonctionnelle de l'hématopoïèse en général, ce qui va influencer le traitement de l'aplasie radio induite (Bertho, Frick et al. 2005).

- Le syndrome de brûlure

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.

- La radiodermite aiguë

C'est le premier symptôme cutané radio-induit, d'abord 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 sera par ordre chronologique et aussi de gravité des lésions : érythème secondaire, desquamation sèche, desquamation humide, ulcération ou cicatrisation et/ ou avec fibrose.

- L'érythème

C'est un symptôme induit par la dilation des capillaires du derme et un œdème interstitiel. Le flux sanguin décroissant progressivement, les parois vasculaires deviennent perméables et laissent passer les différents composants plasmatiques vers les espaces extra vasculaires.

Les leucocytes adhèrent alors aux parois vasculaires avant de migrer à travers l'endothélium : c'est la diapédèse ou extravasation. 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 and Kummermehr 1991).

- La desquamation humide

C'est une radiodermite exsudative apparaissant 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, Courdi et al. 1993). Elle apparaît sous forme d'une surface rosée suintante 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 identique à celui d'une brûlure du second degré (Hovdenak, Fajardo et al. 2000).

- La nécrose dermique

C'est une lésion secondaire du derme apparaissant lorsque la desquamation humide est intense et durable. La nécrose dermique est une conséquence de la déshydratation et de l'infection. 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.

- Les syndromes vasculaires

L'endothélium est le constituant principale des vaisseaux sanguin, il est de ce fait 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 en facilitant l'adhésion et l'extravasation des leucocytes du sang vers les tissus et du processus thrombotique en activant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Suite à une exposition aux rayonnements ionisants ou a un

autres stress, les processus inflammatoires et thrombotiques sont induits précocement dans les vaisseaux et notamment dans les micro-vaisseaux plus radiosensibles. A plus long terme, ces processus provoquent des effets tels que fibrose tissulaire ou occlusions vasculaires invalidants ou potentiellement létales pour les sujets irradiés (Gaugler 2005).

Le syndrome cérébro-vasculaire apparaît pour une dose supérieure à 50 Gy et entraîne la mort des sujets irradiés en deux à trois 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. Au terme de la phase latente (de 4 à 6 heures) les symptômes nerveux réapparaissent avec une plus grande gravité (tremblements, convulsions) et conduisent au coma puis 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, Marquette et al. 2005).

- Le syndrome multi-organe et les effets abscopaux

Le syndrome multi organe ou MODS (pour « Multi Organ Dynsfunction Syndrom ») est l'association d'au moins deux syndromes précédemment cités.

Une irradiation, à des doses fortes ou même moyenne, entraîne des dysfonctionnements physiologiques affectant plusieurs organes et tissus. Ces anomalies peuvent impliquer les systèmes hématopoïétique, gastro-intestinal, neurovasculaire et cutanée. Chacun des ses systèmes joue un rôle majeur dans le syndrome aigu d'irradiation (SAI). La manifestation de ce syndrome a lieu très tôt après l'irradiation, dès les premières heures et peut perdurer jusqu'à plusieurs semaines suivant la dose reçue (Anno, Baum et al. 1989). Le tractus gastro intestinal est un organe à renouvellement rapide, cette propriété fait de lui un compartiment radiosensible. Un des symptômes précoces caractérisant l'atteinte de l'intestin est une diarrhée sévère provoquée par une perte de l'intégrité de la barrière intestinale (Vigneulle, Rao et al. 2002). Ces atteintes peuvent être directement dues à l'irradiation ou indirectement après une réponse rado-induite de la moelle osseuse ou de la peau également radiosensibles. La communication physiologique entre ces organes est aussi valable d'un point de vue physiopathologique après différents types d'agression. En effet, des dysfonctionnements gastro-intestinaux et pulmonaires ont été mis en cause dans les conséquences de brûlures thermiques (Messick, Koruda et al. 1994; Chen, Hsu et al. 1999) ou de choc hémorragique (Kuebler, Toth et al. 2003). La progression de tels effets risque alors d'engendrer la mise en place d'un syndrome de défaillance multi-organes (MODS) (Monti, Wysocki et al. 2005). Ce phénomène voit ses causes naître dans le

développement d'une importante inflammation systémique (SIRS) à laquelle succède une réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS) destinée à contrôler l'inflammation (Bone 1996). Dans certains cas, cette réponse compensatrice peut avoir un effet immunosuppresseur grave allant jusqu'à favoriser un risque important d'infections microbiennes. En se développant simultanément les réponses inflammatoires et immunosuppresseives créent un syndrome de réponse antagoniste mixte (MARS). Le MODS se définit alors comme une perte d'homéostasie par un état de dissonance immunologique due à la persistance simultanée d'un état inflammatoire et immunodéprimé.

L'intestin joue un rôle majeur dans l'induction du MODS. En effet, des phénomènes lui étant spécifiquement attribués ont tendance à induire une présence très importante de médiateurs proinflammatoires : le passage d'endotoxines bactériennes intestinales dans la circulation, l'hypoperfusion sanguine précoce et la reperfusion de l'intestin font partie de ces phénomènes (Monti, Wysocki et al. 2005). De même, il a aussi été démontré qu'une brûlure thermique cutanée pouvait induire une ischémie intestinale, une perte de la fonction de barrière intestinale et une invasion bactérienne dans le sang (Gianotti, Alexander et al. 1993; Chen, Hsu et al. 1999). D'après ces observations, il est possible que ces phénomènes aient des répercussions sur d'autres organes de part les voies de communication sanguine et/ou lymphatique.

Ainsi, notamment après le rapport d'accident de Tokai-Mura, la physiopathologie de l'irradiation prend tout son sens en impliquant le dysfonctionnement progressif de plusieurs organes (Hirama, Tanosaki et al. 2003). Les complications du syndrome aigue d'irradiation sont la conséquence d'une incapacité de plusieurs organes à maintenir leurs fonctions.

Le rôle de l'intestin dans le MODS

Le MODS est la première cause de mortalité des patients admis en soins intensifs (Monti, Wysocki et al. 2005). La virulence et la pluralité de ce syndrome en font un vaste terrain de discussions et un domaine de recherche prépondérant (Baue 1996). De nombreuses études, cliniques ou sur des modèles animaux montrent que les atteintes du tractus digestif jouent un rôle primordial dans l'induction du MODS : comme par exemple, le passage de bactéries dans le sang, la propriété pro-inflammatoire de l'intestin ou l'augmentation de la perméabilité intestinale (Faries, Simon et al. 1998; Kale, Kuzu et al. 1998).

Le choc hémorragique

Suite à une perte d'intégrité de la barrière intestinale, le passage des bactéries dans la circulation sanguine est facilité. Cette anomalie peut conduire alors à une infection bactérienne systémique connue comme principale cause du MODS. Ces effets ont plusieurs

fois été démontrés dans le cas d'un choc hémorragique (Kale, Kuzu et al. 1998; Tani, Fujino et al. 2000).

Propriété pro-inflammatoire de l'intestin

Le système digestif a la capacité de produire différentes substances pro-inflammatoires telles que cytokines, amines biogéniques, protéases et radicaux libres. Ces molécules peuvent, dans un premier temps, avoir des effets sur les fonctions gastro-intestinales. Dans un second temps, elles peuvent impliquer d'autres organes en empruntant les voies de communication systémiques et/ou lymphatiques (Deitch, Xu et al. 1994). Une modification de la microflore et donc une croissance bactérienne importante induit irrémédiablement une augmentation des cytokines plasmatiques après un choc hémorragique (Guo, Ding et al. 1995). L'explication du MODS par la septicémie ne fait pas l'unanimité dans les études cliniques entrprises (Reidy and Ramsay 1990; Moore, Moore et al. 1991). En effet, non seulement l'équipe de Moore a constaté l'absence bactérienne dans le sang de la veine porte (Moore, Moore et al. 1991) mais en plus, Reidy et Ramsey n'ont pas démontré de survie après une décontamination de l'intestin (Reidy and Ramsay 1990). Cela dit, l'absence de bactérie dans le sang des patients peut être expliquée par un transport à travers la voie lymphatique.

L'hypoperfusion intestinale

Elle est caractérisée par un processus physiopathologique pouvant intervenir dans la réponse de l'intestin à une irradiation. L'hypoperfusion intestinale peut être provoquée par différents types d'agression comme l'ischémie-reperfusion (Koike, Moore et al. 1994). Un tel type d'agression peut induire la mise en place du MODS. Après une irradiation de l'appareil digestif il pourrait alors y avoir une augmentation de la perméabilité intestinale entraînant une libération de facteurs pro-inflammatoires. De plus, l'irradiation pourrait, comme l'ischémie, induire une diminution de la motricité iléale et de la surface de tissus lymphoïdes (Moore 1999; Mallick, Yang et al. 2004).

2.4. Une perspective de traitement : La thérapie cellulaire

Jusqu'à très récemment, la thérapie après un accident d'irradiation ne prenait en charge que le syndrome hématopoïétique. A cette thérapie, correspondent deux stratégies essentielles utilisables pour le traitement de l'aplasie médullaire induite par une irradiation accidentelle :

- les thérapies de soutien au redémarrage de l'hématopoïèse résiduelle,
- d'autre part des thérapies de remplacement de la moelle osseuse lésée par une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Les thérapies de soutien sont basées sur l'existence d'une hématopoïèse résiduelle suffisante pour assurer la reconstitution endogène de la moelle osseuse. Elles sont donc constituées de transfusions de produits sanguins et en particulier de plaquettes pour limiter les hémorragies, et d'une antibiothérapie pour prévenir les infections opportunistes. Ces thérapies de soutien peuvent être accompagnées par des injections de cytokines, et en particulier de granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et d'érythropoïétine (EPO), qui vont permettre de stimuler les cellules souches hématopoïétiques résiduelles et donc d'accélérer la reprise endogène. Cependant si le patient ne présente pas une hématopoïèse résiduelle suffisante, cette approche thérapeutique peut présenter un risque. C'est la raison pour laquelle la greffe de cellules souches hématopoïétiques a souvent été privilégiée.

Toutes les sources de cellules souches ont été utilisées : moelle osseuse, sang de cordon ombilical, cellules souches mobilisées et cellules souches de foie foetal. Cependant, cette thérapie est limitée par la recherche d'un donneur histocompatible. De ce fait, il est souvent nécessaire de prescrire au receveur un traitement immunosuppresseur afin d'éviter un rejet de greffe. De plus il existe des risques importants de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD), pouvant engager le pronostic vital du receveur. Malgré les risques élevés associés à la greffe, un concept de greffe transitoire a été proposé de façon à protéger le patient des hémorragies et des infections par un apport de cellules fonctionnelles en attendant une reprise endogène. C'est ce qui a été réalisé chez l'une des victimes de l'accident de Tokaimura (Nagayama, Misawa et al. 2002). Cependant, sur 31 victimes d'irradiation ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques, seuls quatre patients ont survécu. Une étude rétrospective portant sur 29 victimes ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques a comparé leur survie avec celle d'un groupe de victimes ayant reçu uniquement un traitement de soutien (Densow, Kindler et al. 1997). Cette étude suggère que la survie des victimes d'irradiation accidentelle n'est pas améliorée par la greffe de cellules souches hématopoïétiques (Densow, Kindler et al. 1997). Globalement, ces constatations montrent que les thérapies actuelles ne sont pas satisfaisantes, et qu'il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques, adaptées à la situation pathologique particulière des victimes d'irradiation accidentelle.

A ce stade, le recours à l'utilisation de cellules

- ayant des capacités multiples,
- facilement obtenues et
- limitant les réactions de rejet

constituerait une stratégie thérapeutique idéale pour le traitement des multiples syndromes liés à l'irradiation.

Actuellement, la recherche concernant la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses est en plein essor. Elle vise à traiter les maladies acquises ou héréditaires. Cependant, d'autres pathologies peuvent être induites par des accidents et/ou par des effets secondaires à un traitement médical. Par exemple dans le cas de la radiothérapie, les rayonnements ionisants utilisés sont responsables de dégâts sur les tissus sains et au voisinage de la tumeur. De même, comme nous venons de le voir, de fortes atteintes tissulaires peuvent survenir lors d'accident impliquant des personnes au contact de sources radioactives. Dans tous les cas la conséquence en est l'altération des tissus et voir même la dérégulation de la fonction d'un ou de plusieurs organes (MODS). La thérapie cellulaire est alors un moyen de régénérer les tissus et de restaurer les fonctions des systèmes atteints par une irradiation.

II Cellules souches et thérapie cellulaire

La santé est un domaine qui aujourd'hui nourrit, plus que jamais, nos préoccupations. De tout temps l'homme a stimulé sa réflexion et concentré ses efforts dans l'élaboration de médicaments allant du breuvage miracle au vaccin dans le but de préserver sa santé. L'homme passe sa vie à vouloir la prolonger car « on ne meurt qu'une fois et c'est pour si longtemps » (Molière, 1622-1673). La recherche intervient et progresse là où la science offre des solutions. « Ceux qui vivent sont ceux qui luttent » (Victor Hugo, 1802-1885).

En effet, chaque organisme vivant a besoin d'être entretenu, renouvelé ou réparé suite à un traumatisme ou à un simple dérèglement. Le maintien de l'intégrité d'un organe passe par ces capacités de défense et par son potentiel de régénération. Cette régénération est assurée par des cellules indifférenciées qui ne participent donc pas à la fonction de l'organe. Ces cellules sont appelées cellules souches et possèdent des capacités propres, elles s'auto renouvellent, prolifèrent rapidement et se différencient en divers progéniteurs. La thérapie cellulaire met à profit leurs propriétés pour assurer la réparation ou la régénération des tissus.

1. Définition d'une cellule souche

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de se reproduire afin de maintenir l'intégrité biologique d'une espèce et de donner naissance à des cellules différenciées.

Le terme de " cellule souche " est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de se multiplier (capacité de prolifération) et de se différencier. C'est-à-dire de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques du tissu. Ce processus dit de différenciation, est classiquement défini comme irréversible. Les cellules souches ont en plus une propriété d'auto-renouvellement (reproduction à l'identique) qui leur permet d'être présentes dans l'organisme jusqu'à l'âge adulte.

2. Les différentes cellules souches.

Les cellules souches sont réparties en trois catégories : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches fœtales et les cellules souches adultes. Elles possèdent les mêmes propriétés mais ont des capacités différentes. Chacune de ces cellules est présente à un stade différent du développement de l'organisme. Les cellules souches peuvent être

retrouvées dans différentes zones ou différents tissus de l'organisme (tableau 7). Suivant leurs capacités à se différencier, quatre niveaux de cellules souches sont distingués.

- Les cellules souches **unipotentes** ne peuvent former qu'une sorte de cellules différenciées.
- Les cellules souches **multipotentes** sont à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées issues d'un même feuillet embryonnaire. Par exemple : les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, à l'origine de toutes les cellules sanguines et les cellules souches mésenchymateuses produisant les chondroblastes, les myoblastes et les adipoblastes.
- Les cellules souches **pluripotentes** sont à l'origine de plusieurs type de cellules différenciées issues de feuillet embryonnaires différents. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes issues de la partie interne du blastocyste (au stade de quarante cellules). Elles peuvent engendrer tous les tissus de l'organisme. Les **cellules primordiales germinales** sont une variété de cellules pluripotentes. Elles appartiennent à la lignée cellulaire qui formera les ovules et les spermatozoïdes.
- Les cellules souches **totipotentes** sont seules aptes à engendrer un être humain. Elles forment l'embryon dans les quatre premiers jours de son développement.

Cellules souches	localisation	différenciation
Hématopoïétiques	moelle osseuse	cellules sanguines, cellules endothéliales, cellules ovales hépatiques, cellules musculaires
Neurales	cerveau	neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules sanguines
Epithéliales	intestin, épiderme	toutes les cellules de cryptes et de l'épiderme
Mésenchymateuses	moelle osseuse	os, cartilage, tendon, tissu adipeux, muscle, cellules du stroma médullaire, cellules neurales
Embryonnaires	premières cellules germinales de la masse interne du blastocyste	toutes les cellules de l'organisme

Tableau 7 : Localisation des cellules souches humaines et leur potentiel de différenciation
Les cellules souches ont les mêmes propriétés mais des capacités différentes. Elles sont retrouvées au niveau de plusieurs tissus. (Minguell, Erices et al. 2001)

2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)

Elles sont dérivées de la masse interne du blastocyste en stade précoce (Figure 3) et sont capables de former un organisme entier (Trounson 2006).

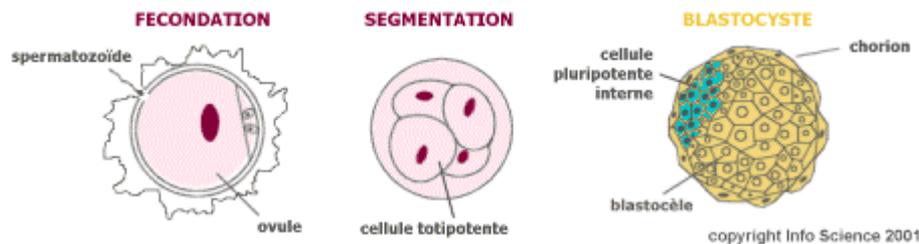


Figure 3 : Origine des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES sont issues de la masse interne du blastocyste.

Pendant leurs premières divisions elles sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quelle cellule des trois feuillets embryonnaires à savoir l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme.

Plus particulièrement ces cellules expriment des marqueurs communs à toutes les cellules souches indifférenciées comme les CD 9 et 24, Oct-4, Nanog, Pal, LIN28, Rex-1, Cripto/TDGF1, DNMT3B, SOX2, EBAF, Thy-1, SSEA-3 et -4 et TRA-1-60 et -1-81 (Richards, Tan et al. 2004). De plus, l'expression à très long terme de la télomerase confère aux cellules ES la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en toutes les cellules souches et progéniteurs adultes et fœtaux. Cependant, on ne sait toujours pas, aujourd'hui maîtriser leur différenciation complète en une population homogène qui puisse être transplantée chez des patients.

Les cellules souches embryonnaires suscitent un débat éthique mondial. En effet leurs vastes propriétés laissent envisager la possibilité de cloner, un jour, l'être humain. Plus raisonnablement on peut espérer recréer des tissus, voir des organes *in vitro*. Le risque majeur d'utilisation des cellules ES en clinique vient de leur pouvoir tumorigène. En effet, la persistance de cellules indifférenciées dans une population greffée engendre de graves risques de développement de cancers. Il a déjà été démontré que les cellules ES provoquent *in vivo* des tératomes (Amit, Carpenter et al. 2000).

2.2. Les cellules souches fœtales

Elles sont issues de tissus foetaux à un stade de cinq à neuf semaines et sont isolées à partir de foetus résultant d'interruptions volontaires de grossesses.

Les cellules souches du fœtus sont de deux types : germinale et somatique.

- Les cellules germinales, issues de l'ébauche du tissu germinale de fœtus, ont une importante capacité de prolifération et sont pluripotentes. Elles peuvent donc donner toutes les différenciations cellulaires après stimulation par un environnement spécifique.

Cependant, bien qu'elles nourrissent une part importante de la recherche fondamentale, l'instabilité de leur génome limite les perspectives quant à leur utilisation en thérapeutique (Thomson and Odorico 2000). Les cellules souches somatiques : Parmi elles, les cellules souches du système nerveux central (Vescovi, Parati et al. 1999) qui représentent une perspective importante dans le traitement des pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la chorée de Huntington (Dunnett and Bjorklund 1999). De même, les alternatives thérapeutiques qu'offrent les hépatocytes foetaux font l'objet d'importants travaux de recherche (Andreoletti, Pages et al. 1997).

2.3. Les cellules souches adultes

2.3.1. Propriétés

Si les cellules souches embryonnaires servent au développement de l'embryon, les cellules souches adultes ont une fonction d'entretien ou de maintien physiologique et/ou structural d'un tissu ou d'un organe. Cette fonction est rendue possible par les capacités de prolifération d'auto renouvellement et de différenciation des cellules souches adultes.

Les cellules souches somatiques sont présentes dans tous les organes chez les adultes. Leur fonction est d'assurer l'homéostasie de l'organe durant toute sa vie. En effet, la bonne fonction de chaque organe ou tissu est assurée par des cellules spécialisées à durée de vie limitées (par exemple les globules rouges du sang ou les cellules sécrétrices d'insuline). Le renouvellement de ces cellules est assuré par les cellules souches adultes. L'homéostasie cellulaire entre cellules différenciées et cellules souches est ainsi maintenue. En se divisant les cellules souches vont donner deux cellules filles. La première demeure identique à la cellule mère et assure le maintien d'un stock de cellules souches. La seconde cellule souche va devenir une cellule différenciée, spécialisée dans une fonction restreinte. Elle permettra de maintenir constant le nombre de cellules différenciées d'un organe (exemple intestin et hématopoïèse). Les cellules souches adultes ont donc une fonction d'entretien ou de maintien physiologique et structural d'un tissu ou d'un organe. Cette fonction est rendue possible par les capacités de prolifération et de différenciation des cellules souches adulte. Prenons par exemple les cellules souches hématopoïétiques capables de se différencier en cellules spécialisées telles que les hématies les mégacaryocytes et les granulocytes.

Ensemble, ces cellules assurent les fonctions de transport de l'oxygène, d'hémostase primaire et de défense contre les parasites, bactéries et autres agents étrangers (Till and Mc 1961; Wagers, Sherwood et al. 2002).

De même, les cellules souches intestinales situées à la base des cryptes sont capables de se différencier en cellules spécialisées de l'intestin. Ces dernières, assurent ainsi le maintien de l'intégrité intestinale, l'absorption des nutriments, les mouvements d'eau et d'ions, la sécrétion de mucus et la défense immunitaire (Leedham, Thliveris et al. 2005).

Ces cellules sont alors dites pluripotentes quand elles ont la capacité de se différencier en plusieurs cellules d'un même feuillet embryonnaire. De plus, la persistance de la présence de cellules souches au stade adulte requiert nécessairement une capacité d'auto renouvellement de ces cellules.

2.3.2. Différents types de cellules souches adultes

Une première catégorie demeure quiescente (absence de division) et nécessite une stimulation par une agression extérieure pour se multiplier (lésion, infection...). Comme par exemple les cellules souches nerveuses (Gage 2000), pancréatiques (Burke, Thowfeequ et al. 2007), hépato-biliaire (Michalopoulos and DeFrances 1997) et musculaire (Renault, Rolland et al. 2002). Une seconde catégorie se multiplie en permanence pour assurer le renouvellement cellulaire, ce sont les cellules souches hématopoïétiques (Robin, Pflumio et al. 1999), osseuses (Bianco and Gehron Robey 2000), épidermiques (Rochat, Kobayashi et al. 1994) et intestinales (Booth and Potten 2000) (figure 4). De ces quatre dernières, seules les cellules souches hématopoïétiques et épidermiques ont déjà fait leurs preuves en thérapie cellulaire (Gorin, Aegerter et al. 1990; Berthod and Damour 1997). Principalement utilisées en clinique, les cellules souches mésenchymateuses (Lazarus, Haynesworth et al. 1995; Koc, Peters et al. 1999; Horwitz, Gordon et al. 2002; Le Blanc, Rasmusson et al. 2004) de la moelle osseuse semblent être les plus prometteuses de par leur facilité relative d'obtention par simple ponction et leur capacité de migration et d'implantation. Le fait que ces cellules ne se différencient pas spontanément après amplification *in vitro* est un argument supplémentaire en faveur de leur utilisation en thérapie cellulaire.

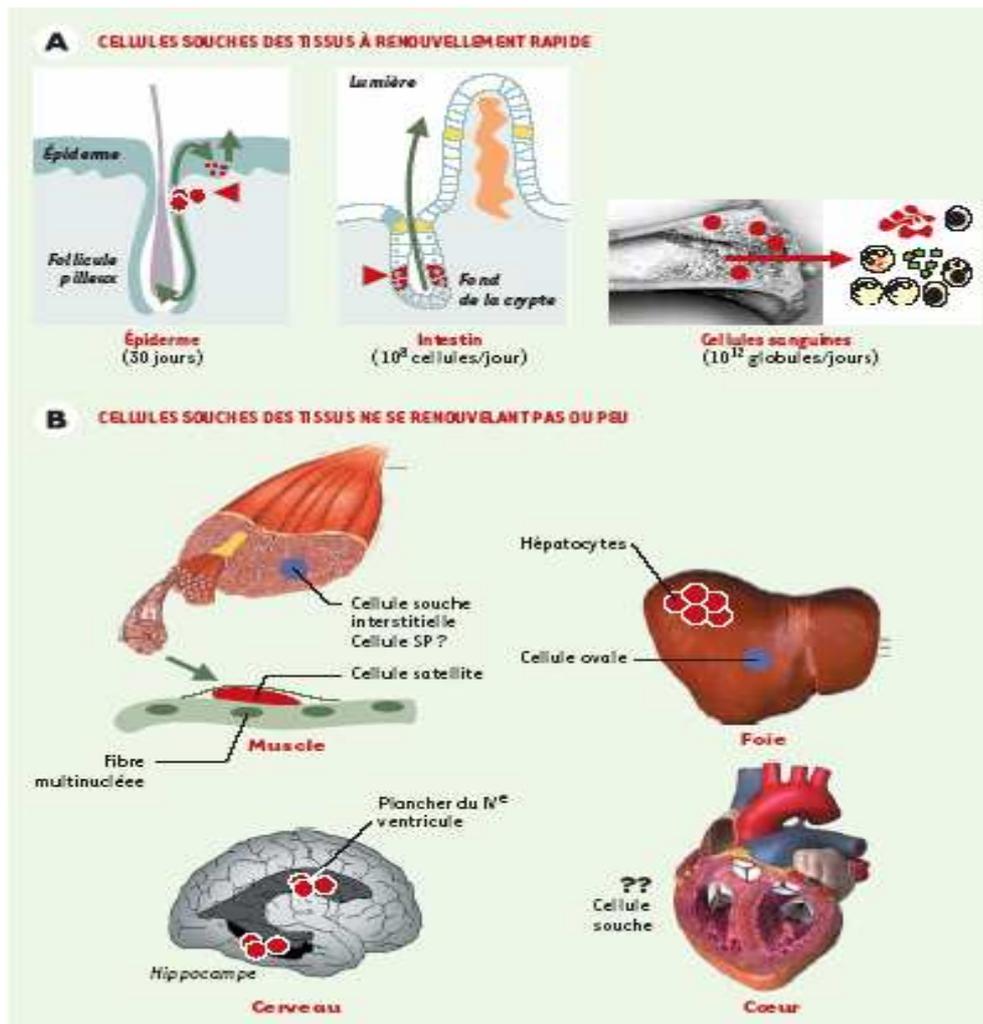


Figure 4 : Les cellules souches des différents tissus

Les cellules souches des tissus adultes sont de deux types suivant le mode de renouvellement rapide ou lent du tissu dans lequel elles se situent. (Médecine Science, 2003)

2.4. Quelles cellules pour l'utilisation clinique

L'utilisation clinique des cellules souches ne concerne ni les cellules souches embryonnaires en raison de leur haut potentiel tumorigène ni les cellules fœtales de par leur rareté et l'instabilité relative de leur génome (Marcus and Woodbury 2008). En revanche, depuis plus de trente ans des protocoles cliniques sont réalisés avec des greffes de moelle totale (Gorin, Najman et al. 1977; Douay 1985). Il a déjà été démontré qu'après une greffe de moelle osseuse, les cellules greffées étaient retrouvées chez l'hôte (Mata, Chiffolleau et al. 2004). De plus, plusieurs travaux ont montré qu'une greffe de moelle totale permettait une reprise de l'hématopoïèse (Lazarus 1995). Plus tard, le potentiel des greffes de moelle s'est étendu à d'autres tissus comme le cœur, l'os, le cartilage, le tendon (Ringe, Kaps et al. 2002), le foie, le rein (Kallis, Alison et al. 2006) ou le cerveau (Mahmood, Lu et al. 2001). D'autres études se sont efforcées de purifier les greffons en isolant plus particulièrement les cellules souches

hématopoïétiques (Lopez, Bardin et al. 1995; Locatelli and Burgio 1998; Fouillard, Labopin et al. 2002) ou en utilisant des cellules de sang de cordon (Kohn, Hershfield et al. 1998; Visani, Lemoli et al. 1999). Les résultats obtenus restent en général moins probants qu'une greffe de moelle. Depuis près de 10 ans, les protocoles de thérapie cellulaire tendent à l'utilisation d'une autre population de cellules souches de la moelle osseuse : les cellules souches mésenchymateuses.

3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

3.1. Localisation

La moelle osseuse est un tissu complexe et hétérogène dans lequel a lieu la synthèse des éléments figurés du sang : l'hématopoïèse. Elle contient trois types de cellules souches (figure 5).

D'une part les cellules souches hématopoïétiques vont donner naissance à toutes les cellules sanguines telles que les hématies, les lymphocytes, les granulocytes, les monocytes et les plaquettes (Osawa, Hanada et al. 1996; Wagers, Sherwood et al. 2002).

D'autre part, les cellules souches mésenchymateuses servent de soutien à l'hématopoïèse (Haynesworth, Baber et al. 1992; Prockop 1997; Fouillard, Bensidhoum et al. 2003; Le Blanc, Samuelsson et al. 2007) en exprimant des cytokines, des facteurs de croissance et des intégrines ou autres molécules d'adhésion (Bhatia and Hare 2005). Certains avis accordent à ces cellules stromales un rôle dans la niche hématopoïétique en favorisant le microenvironnement des CSH (Whetton and Graham 1999). Ces cellules participent aussi naturellement à la régénération de l'os. En effet, il a été démontré que les CSM issues de l'os se différenciaient en ostéoblastes (Young, Steele et al. 2001) et qu'un défaut ostéolytique était lié à une anomalie de croissance des CSM (Garderet, Mazurier et al. 2007). Les cellules souches mésenchymateuses sont également retrouvées dans d'autres tissus comme le tissu adipeux, le muscle, le derme, la membrane synoviale, le périoste, l'os trabéculaire, le sang et le contour des vaisseaux (Tuan, Boland et al. 2003) (Tableau 8).

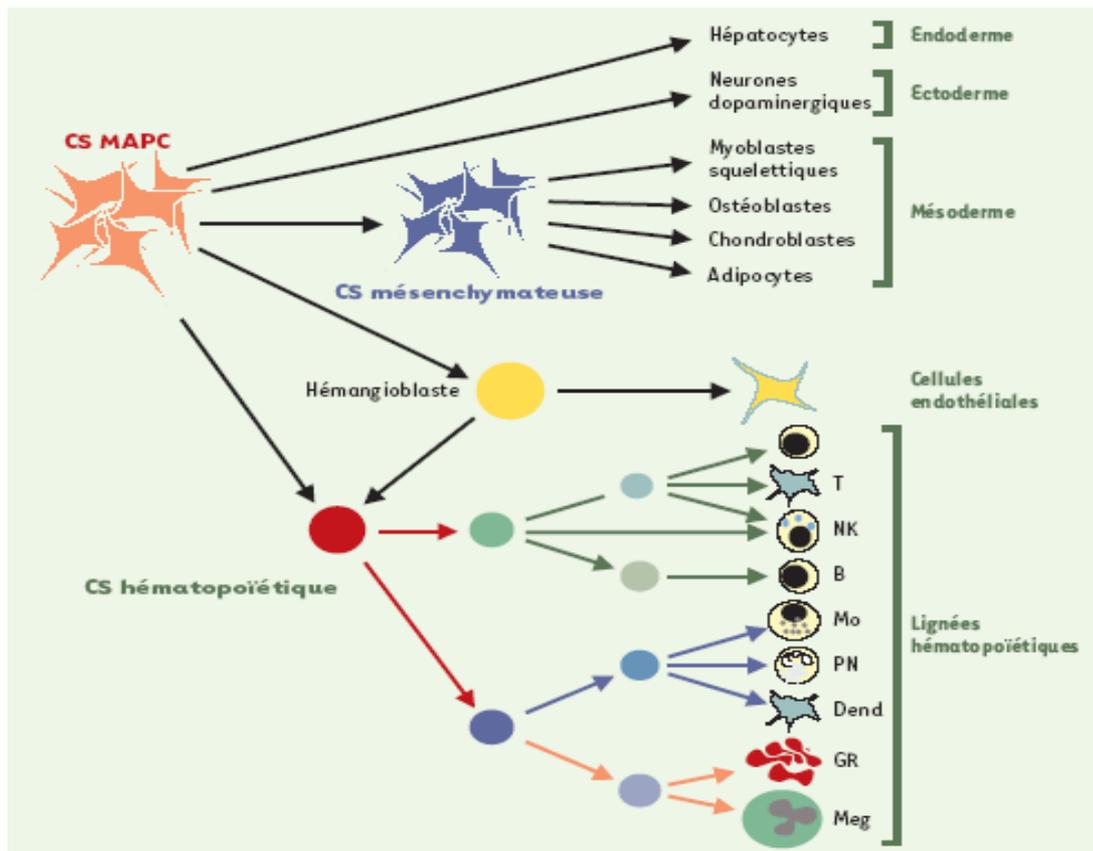


Figure 5 : filiation des cellules souches de la moelle osseuse

Les hémangioblastes, les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses sont présentes dans la moelle osseuse. Selon certaines études, les MAPC (Cellules Progénitrices Adultes Mésenchymateuses) seraient à l'origine des trois types de cellules souches médullaires sus-citées. (Médecine Science, 2003)

Plusieurs études ont montré la présence d'hémangioblastes dans la moelle osseuse (Longo, Vacca et al. 2007) (figure 5). Les hémangioblastes sont des cellules immatures (CD34+) à l'origine des progéniteurs endothéliaux et des cellules souches hématopoïétiques bien que cette dernière filiation reste encore mal définie. Des travaux ont montré que des cellules de moelle osseuse pouvaient se différencier en cellules endothéliales (Asahara 2007). Déjà, en 1950, une équipe avait mis en évidence la formation de vaisseaux sanguins *in vitro* à partir de moelle osseuse de poulet (White and Parshley 1951). D'autres études ont démontrés la présence de progéniteurs endothéliaux dans la moelle osseuse humaine (Reyes, Dudek et al. 2002).

Tissu d'origine	Potentiel de différenciation (cellulaire et/ou tissulaire)
moelle osseuse	Adipocytes, astrocytes, neurones, cardiomyocytes, chondrocytes, hépatocytes, cellules mésengiales, muscles, ostéoblastes, cellules stromales, quelques lignées de tissus embryonnaires
muscle	Adipocytes, myotubes, ostéocytes, cellules endothéliales, neurones, chondrocytes, ostéocytes
Os trabéculaire	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes
derme	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, muscle
Tissu adipeux	Chondrocytes, muscles, ostéoblastes, cellules stromales
Périoste	Chondrocytes, ostéoblastes
Sang	Adipocytes, fibroblastes, ostéoblastes, ostéoclastes
Membrane synoviale	Adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, muscle

Tableau 8 : Potentiel de différenciation des CSM issues de différents tissus

Les CSM ne sont pas retrouvées uniquement dans la moelle osseuse. Elles sont aussi retrouvées dans le muscle, l'os trabéculaire, le derme, le tissu adipeux, le périoste, le sang et la membrane synoviale. Elles présentent plus ou moins les mêmes capacités de différenciation. (Tuan, Boland et al. 2003)

Plus récemment, les CSM ont été mise en évidence dans l'appendice (De Coppi, Pozzobon et al. 2006) et elles ont été localisées dans le thymus au niveau des septae interlobulaires (Mouiseddine et al. in press Stem Cell Dev. 2008,).

3.2. Isolement et culture

Les premières cellules stromales de la moelle osseuse sont isolées pour la première fois dans les années 70 par leur propriété d'adhérence au support de culture (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976). L'auteur démontre que les cellules fibroblastiques issues de la moelle osseuse et de la rate de cochon d'Inde sont capables de former des clones *in vitro* (Friedenstein and Lalykina 1970). Ces cellules stromales clonogénique de moelle osseuse sont caractérisées pour la première fois par Castro-Malaspina en 1980 (Castro-Malaspina, Gay et al. 1980).

Les cellules souches stromales issues de moelle osseuse constituent une population de cellules adhérentes avec un fort potentiel de prolifération et capables de se développer en

progéniteurs de différents tissus, ce sont des cellules souches mésenchymateuses. Elles sont généralement isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse au niveau de la crête iliaque où le rendement est meilleur (Haynesworth, Baber et al. 1992), mais aussi à partir d'une ponction lombaire ou sternale ou encore à partir de la hanche lors d'une pose de prothèse. Les cellules souches stromales de la moelle osseuse sont isolées *in vitro* par leur capacité d'adhérence au support contrairement aux cellules hématopoïétiques qui sont non adhérentes. En effet, les cellules souches mésenchymateuses expriment à leur surface des intégrines telles que $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ qui leur permettent d'adhérer à différentes surfaces (Conget and Minguell 1999). Il est aussi possible d'isoler d'abord les cellules mononucléées sur un gradient de ficoll ou de percoll par centrifugation avant d'isoler les CSM par adhérence.

En isolant les cellules stromales, de la moelle osseuse, par leur propriété d'adhérence au plastique Friedenstein a démontré que ces fibroblastes précurseurs forment des colonies (CFU-F) *in vitro*. Les colonies ainsi formées peuvent l'être par des cellules engagées dans la formation de l'os ou du cartilage (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976).

Les CSM ont d'abord été cultivées *in vitro* dans un milieu complexe comportant entre autre du sérum de veau fœtal, du sérum de cheval et de l'hydrocortisone (Dexter and Testa 1976). Actuellement, l'expansion de CSM d'usage thérapeutique est réalisée grâce à un milieu supplémenté en plasma riche en plaquettes (Doucet, Ernou et al. 2005) ou en milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SFGM) (Sensebe, Li et al. 1995).

Elles se multiplient très efficacement en culture et peuvent être différenciées en cellules spécialisées après induction par un milieu adéquat (Figure 6). Par exemple, les CSM se différencient *in vitro* en cellules adipeuses après 21 jours d'induction par un milieu contenant de la dexaméthasone, de l'indométacine et de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine). Dans un milieu contenant de la dexaméthasone, du β -Glycérophosphate, de la vitamine D, de l'acide ascorbique et du BMP (bone morphogenic protein) les CSM se différencient en cellules de la lignée ostéocytaire. Enfin, il est aussi possible d'obtenir des cellules de la lignée chondrocytaire à partir des CSM en cultivant ces dernières sous forme d'une pelote pendant 21 jours dans un milieu contenant de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique, du BMP et du TGF- β .

Ces trois milieux se préparent dans un milieu de base simple type α -MEM ou DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplémenté ou non par 10% de sérum de veau fœtal (Mouiseddine, Francois et al. 2007).

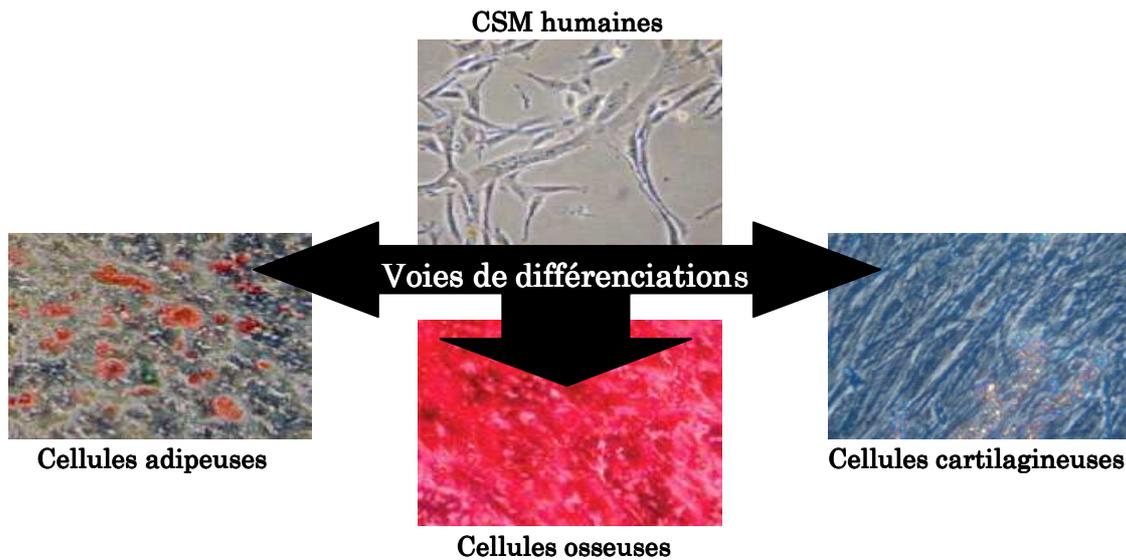


Figure 6 : Différenciation in vitro des Cellules Souches Mésenchymateuses humaines

Les CSM humaines ont la capacité de se différencier en cellules adipeuses, osseuses et cartilagineuses : photographies (Mouiseddine, Francois et al. 2007)

3.3. Phénotypes et sous populations

En 1991, Simmons et Torok-Storb décrivent le premier anticorps capable de reconnaître les précurseurs stromales de la moelle osseuse en fixant l'antigène Stro-1 (Simmons and Torok-Storb 1991). Actuellement, seul l'antigène Stro-1, qui est présent sur les colonies fibroblastiques (CFU-F) des cellules de moelle osseuse humaine, a unanimement été décrit comme marqueur potentiel des précurseurs des sous-populations de CSM et de leur capacité physiologique (Gronthos, Graves et al. 1994; Dennis, Carbillet et al. 2002). *In vivo*, 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, Chapel et al. 2004). Il apparaît également que l'expression de STRO-1 dépend de la maturité des CSM (Tondreau, Lagneaux et al. 2004).

Une autre sous population de cellules stromales de moelle osseuse présentant le marqueur membranaire CD49a a aussi été décrite (Deschaseaux, Gindraux et al. 2003). Ces cellules sont des CSM multipotentes, elles forment des clones en culture et elles possèdent une capacité d'immunomodulation (Deschaseaux, Gindraux et al. 2003). De plus, il est dit que dans un prélèvement de moelle osseuse, le CD49a est aussi exprimé par les cellules souches hématopoïétiques. Ce n'est qu'après un cycle de congélation / décongélation que ce

marqueur n'est présent qu'à la surface des CSM. Cependant, la sélection des CSM *via* ce marqueur est peu utilisée en recherche et reste très discutée quant au pourcentage de cellules positives pour le CD49a dans un prélèvement de moelle. D'autres études mettent en évidence l'hétérogénéité de l'expression membranaire des CSM. En effet, Delorme *et al* montrent qu'après amplification les CSM humaines expriment les marqueurs CD73, CD130, CD146 et CD200 (Delorme, Ringe et al. 2008). Cependant cette l'expression de certains de ces marqueurs membranaires est réprimée (CD73, CD146 et CD200) après différenciation des CSM.

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 (CSM) ayant une morphologie de fibroblastes et d'autres cellules plus rondes et plus petites appelées les cellules RS (Colter, Sekiya et al. 2001; Prockop, Sekiya et al. 2001). 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 CSM. 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 CSM. 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, Sekiya et al. 2001; Lee, Hsu et al. 2006). 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 (en culture cellulaire, un passage est un cycle de décollement et de réensemencement des cellules afin de les faire proliférer) (Delorme and Charbord 2007).

Le phénotype exprimé par les cellules stromales médullaires dépend de multiples facteurs comme le milieu de culture, la densité d'ensemencement et la pression en oxygène. Une étude (Tableau 9) met en évidence l'importance de ces conditions sur le phénotype des cellules en comparant l'expression membranaires de trois types de cellules stromales issues de la moelle : les " MSC " (Mesenchymal Stem Cells) selon la définition de Pittenger (Pittenger, Mackay et al. 1999), les " MAPC " (Multipotent Adult Progenitor Cells) décrites par Verfaillie (Reyes, Lund et al. 2001) et les " MIAMI Cells " (Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible Cells) cultivées à faible pression en oxygène tel que le démontre D'Ippolito (D'Ippolito, Diabira et al. 2004). Le tableau suivant (Tableau 9) montre les

résultats de l'étude comparative (nd = non décrit, +ve = réaction positive, -ve = réaction négative, low = expression faible).

Marker	Mesenchymal Stem Cells	MPC	MIAMI Cells
CD4	-ve	nd	nd
CD9	+ve	nd	nd
CD10	+ve	-ve	+ve
CD11a	-ve	nd	nd
CD13	+ve	+ve	nd
CD14	-ve	nd	nd
CD15	-ve	nd	nd
CD18	-ve	nd	nd
CD25	-ve	nd	nd
CD29	+ve	nd	+ve
CD31	-ve	-ve	nd
CD34	-ve	-ve	-ve
CD36	nd	-ve	-ve
CD38	nd	-ve	nd
CD44	+ve	+ve (low)	+ve
CD45	-ve	-ve	-ve
CD49a	+ve	nd	nd
CD49b	+ve	+ve	nd
CD49c	+ve	nd	nd
CD49d	-ve	nd	nd
CD49e	+ve	nd	+ve
CD50	-ve	-ve	nd
CD51	+ve	nd	nd
CD54	+ve	nd	-ve
CD56	nd	nd	-ve
CD58	+ve	nd	nd
CD61	+ve	nd	nd
CD62e	-ve	-ve	nd
CD62L	+ve	nd	nd
CD62p	-ve	nd	nd
CD63	nd	nd	+ve
CD71	+ve	nd	nd
CD73 (SH3 and SH4)	+ve	nd	nd
CD81	nd	nd	+ve
CD90	+ve	+ve (low)	+ve
CD102	+ve	nd	nd
CD103	nd	nd	+ve
CD104	+ve	nd	nd
CD105 (SH2)	+ve	nd	nd
CD106	+ve	-ve	nd
CD109	nd	nd	-ve
CD113	nd	nd	nd
CD117	-ve	-ve	-ve
CD119	+ve	nd	nd
CD120a	+ve	nd	nd
CD120b	+ve	nd	nd
CD121	+ve	nd	nd
CD122	nd	nd	+ve
CD123	+ve	nd	nd
CD124	+ve	nd	nd
CD126	+ve	nd	nd
CD127	+ve	nd	nd
CD140a	+ve	nd	nd
CD164	nd	nd	+ve
CD166	+ve	nd	nd
HLA class 1	nd	-ve	-ve
HLA-DR	nd	-ve	-ve
LNGRF	nd	nd	nd
H1P12	nd	-ve	nd
Beta 2 microglobulin	nd	+ve (low)	nd
KDR	nd	+ve (low)	+ve (low)
Flt1	nd	+ve (low)	+ve (low)
Fibroblast surface antigen	nd	-ve	nd

Tableau 9 : Comparaison de l'expression de marqueurs membranaires entre différents types de cellules souches stromales médullaires.

D'après les résultats, les cellules souches stromales présentent des phénotypes différents selon le mode d'obtention et le mode de culture.

(www.stemcell.com/technical/Mesenchymal%20Mini-Review.pdf)

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

3.4. Propriétés

- Prolifération et auto-renouvellement

Les cellules souches mésenchymateuses possèdent bien les caractères propres aux cellules souches, c'est-à-dire qu'elles sont capable de s'auto renouveler, de proliférer et de se différencier. Elles représentent 1/10000 à 1/100000 des cellules mononuclées (CMN) totales de la moelle osseuse et peuvent proliférer jusqu'à la 40^{ème} génération (Bruder, Jaiswal et al. 1997; Pittenger, Mackay et al. 1999). Il est possible que les CSM puissent proliférer au-delà de 50 divisions mais ceci semble le résultat d'ajout de facteurs de croissance tel que le FGF-2 dans le milieu de culture (Bianchi, Banfi et al. 2003). La densité cellulaire semble également jouer un rôle dans la capacité d'expansion des CSM *in vitro* (Colter, Sekiya et al. 2001). Le potentiel d'auto renouvellement des CSM reste une question ouverte. Comme le souligne la revue de Baksh *et al*, la difficulté de déterminer la capacité d'auto-renouvellement des CSM est en grande partie due aux différentes méthodes employées pour les isoler et des différentes approches utilisées pour évaluer ce potentiel (Baksh, Song et al. 2004).

- 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 tissu mésodermique. 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 le stroma (Pittenger, Mackay et al. 1999) (Figure 7).

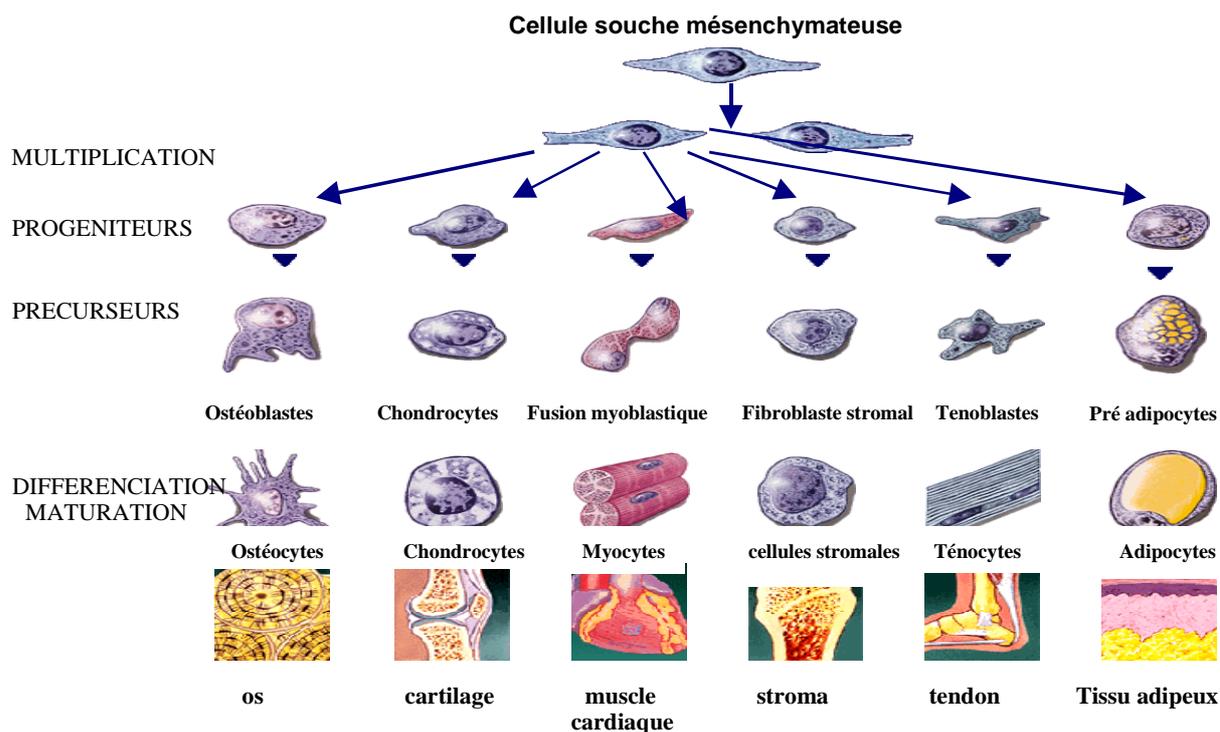


Figure 7 : Mésengénèse ou formation destissus originaires du mésoderme par les CSM.

Les CSM sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires issus du mésoderme.

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, Kajstura et al. 2001; Toma, Pittenger et al. 2002), les fibroblastes (Dicker, Le Blanc et al. 2005), les myofibroblastes (Yamaguchi, Kubo et al. 2005), les péricytes (Direkze, Forbes et al. 2003), les myocytes squelettiques (Pittenger, Vanguri et al. 2002), les cellules neuronales (Woodbury, Schwarz et al. 2000) les astrocytes (Wislet-Gendebien, Wautier et al. 2005), les hépatocytes (Lee, Kuo et al. 2004) et les cellules pancréatiques (Chen, Jiang et al. 2004).

De nombreuses études *in vitro* ont été menées dans le but d'évaluer le potentiel de différenciation des CSM 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.

3.5. Biodistribution

Les potentiels de prolifération et de différenciation des CSM *in vitro* sont, entre autres, des arguments qui justifient l'intérêt croissant porté à ces cellules dans le cadre de l'utilisation

en thérapeutique. Plusieurs études se sont intéressées aux capacités de migration et d'implantation de ces cellules dans différents modèles.

L'injection des CSM peut être systémique ou locale. Après une injection systémique, les cellules sont retrouvées dans le poumon à très court terme (environ une heure) puis dans le cœur et le rein à moyen et long terme (Fox, Chamberlain et al. 2007). Il a largement été démontré que les CSM humaines sont capables de migrer et de s'implanter *in vivo* au niveau de plusieurs tissus chez le primate (Devine and Hoffman 2000) et chez la souris (Allers, Sierralta et al. 2004). Une étude plus récente démontre que chez la souris NOD/SCID les CSM humaines peuvent s'implanter dans le poumon, la moelle osseuse, le muscle, le cerveau, le cœur, le foie et l'intestin (Francois, Bensidhoum et al. 2006). En revanche, lors d'une injection locale de type intracardiaque, les CSM ne sont plus piégées par les capillaires pulmonaires et sont principalement retrouvées dans le cœur et le rein au bout d'une heure avec une présence prolongée à quatre semaines pour le cœur (Toma, Pittenger et al. 2002; Muller-Ehmsen, Krausgrill et al. 2006).

Il a été démontré que les CSM s'implantaient préférentiellement dans les zones lésées : dans le rein après une ischémie (Togel, Hu et al. 2005) ou dans le foie après une injection de carbone tétrachloride (di Bonzo, Ferrero et al. 2008). L'irradiation provoque des lésions qui peuvent affecter plusieurs organes. Chapel *et al.* ont montré qu'après un syndrome multi-organes induit par irradiation chez le primate non humain, les CSM injectées par voie systémique s'implantent au niveau des tissus lésés et notamment au niveau de l'intestin (Chapel, Bertho et al. 2003). De plus, l'implantation est proportionnelle à la dose reçue par un tissu. En effet, après une irradiation de la patte allant jusqu'à 25 Gy, une étude montre que plus la dose d'irradiation est élevée et plus l'implantation au niveau de cette zone est importante (Francois, Bensidhoum et al. 2006).

2.5. Les facteurs intervenant dans la migration des CSM

Les CSM possèdent une multitude de récepteurs membranaires dont l'expression est constitutive ou inductible par le micro environnement d'accueil. Ces récepteurs interviennent essentiellement dans le processus de migration (homing) qui permet aux CSM de cheminer vers un site lésé. Le plus connu des ces récepteurs est le CXCR4 (Cystein-X-Cystein Receptor 4) qui permet la reconnaissance de la molécule SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) libérée lors d'une atteinte de certains tissus. Il a été démontré que l'expression de SDF-1 est responsable de la migration des CSM vers le cœur après infarctus (Askari, Unzek et al. 2003). En effet, l'expression du récepteur au SDF-1 (CXCR-4) par les CSM a largement été démontré (Wynn, Hart et al. 2004; Bhakta, Hong et al. 2006) et le rôle du complexe SDF-1/CXCR-4 intervient dans le phénomène de migration vers d'autres

organes que le cœur tels que la moelle osseuse (Shi, Li et al. 2007) ou le cerveau (Ji, He et al. 2004). De même, des molécules comme le HGF (ou c-met), le LIF ou les MMP peuvent promouvoir la migration des CSM *in vitro* (Kucia, Wojakowski et al. 2006; Son, Marquez-Curtis et al. 2006).

3.6. Utilisation thérapeutique

Les potentiels de prolifération et de différenciation des CSM *in vitro* sont, entre autres, des arguments qui justifient l'intérêt croissant porté à ces cellules dans le cadre de l'utilisation en thérapeutique.

En plus de leur potentialités multiples *in vitro*, nous avons vu précédemment qu'il a largement été démontré que les CSM humaines sont capables de migrer et de s'implanter *in vivo* au niveau de plusieurs tissus dans différents modèles (Devine and Hoffman 2000; Allers, Sierralta et al. 2004).

Ainsi, plusieurs modèles d'étude ont été créés dans le but d'induire ou de mimer une lésion ou une maladie. Les modèles les plus courants concernent l'organe ischémié, c'est à dire privé d'oxygène pendant un temps déterminé, ou le membre (ou zone) irradié. A ce jour la majorité des travaux concernent les atteintes médullaires, osseuses / cartilagineuses, cardiovasculaires / musculaires, cutanées et neurodégénératives.

c. Les CSM dans les atteintes médullaires

La moelle osseuse est le premier organe dans lequel ont été mises en évidence les cellules souches mésenchymateuses (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976). Elle est aussi, par comparaison, le tissu à partir duquel les CSM sont récupérées en plus grande quantité après mise en culture (Tuan, Boland et al. 2003; Krampera, Marconi et al. 2007).

La fréquence des CSM correspond au nombre de CSM par rapport au nombre de cellules d'un tissu. Elle varie avec l'âge du donneur. Elle est de 1.6 CSM pour 10^5 cellules dans la moelle osseuse, 5 CSM pour 10^6 cellules dans le thymus, de 4 CSM pour 10^6 cellules dans la rate et de 4 CSM pour 10^7 cellules dans le tissu adipeux (Krampera, Marconi et al. 2007). Dans la moelle, les CSM contribuent naturellement à la formation du micro environnement stromal en produisant des signaux de régulation pour le développement des progéniteurs hématopoïétiques comme les mégacaryocytes (Cheng, Qasba et al. 2000).

En thérapie, la récupération hématopoïétique est favorisée soit par repeuplement de la moelle osseuse par les cellules souches mésenchymateuses soit par stimulation des autres cellules en sécrétant des facteurs de croissances, des interleukines et/ou des chimiokines (Haynesworth, Baber et al. 1992; Gronthos and Simmons 1995). Lors d'une greffe, dans le

cas d'une insuffisance médullaire, les CSM sont capables de favoriser l'implantation des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Koc, Gerson et al. 2000). En 2000 Koç et al. ont démontré, chez des patients, que suite à un traitement chimique du cancer du sein, la moelle osseuse n'assurait pas complètement ses fonctions. Après une co-transplantation les CSM favorisaient l'implantation des cellules souches du sang périphérique dans la moelle osseuse et stimulaient l'hématopoïèse (Koc, Gerson et al. 2000). Cependant, Noort *et al* démontrent que si les CSM multiplient le taux d'implantation d'un facteur trois à quatre, elles même ne sont pas retrouvées dans la moelle osseuse après transplantation (Noort, Kruisselbrink et al. 2002). Après une injection allogénique de CSM, chez des patients atteints d'anémie aplasique, les cellules s'implantent dans la moelle et favorisent la régénération du micro environnement médullaire et la récupération hématopoïétique (Fouillard, Bensidhoum et al. 2003; Fouillard, Chapel et al. 2007).

b. Les CSM dans les atteintes de l'os et du cartilage.

L'ostéogénèse par transplantation de cellules de moelle osseuse n'est pas une nouveauté, cette propriété était déjà énoncée en 1966 par Friedenstein (Friedenstein, Piatetzky et al. 1966). Cela dit, depuis plus de dix, il est connu ans que les CSM se différencient *in vitro* en cellules osseuses (ostéoblaste) après induction par un milieu contenant de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du β -glycérophosphate (Jaiswal, Haynesworth et al. 1997). La différenciation ostéogénique des CSM fait partie des trois différenciations dites conventionnelles qui caractérisent ces cellules. Il apparaît alors judicieux et prometteur d'offrir une opportunités à l'utilisation des CSM dans le traitement des maladies osseuses telles que ostéoporose, ostéoarthrite voir même ostéogénèse imparfaite (Horwitz, Gordon et al. 2002).

L'Ostéogénèse Imparfait est une maladie génétique caractérisée par une fragilité osseuse. Elle est généralement due à une anomalie de la production du collagène qui est la principale protéine fibreuse de l'os. Les travaux de Horwitz en 2002 concernent six enfants atteints de la maladie. Leur croissance est mesurée pendant les six mois précédant une injection de CSM puis pendant les six mois suivants. Les résultats montrent que l'injection de CSM accélère la croissance en la faisant passer d'un taux allant de 0 à 40 % avant injection à un taux compris entre 60 et 94 % après injection.

La thérapie de l'os utilise aussi d'autres moyens, en effet, la recherche sur les biomatériau est en plein essor. Il est démontré que des matériaux comme les céramiques bioactives de phosphate de calcium ou de verre permettent une meilleure adhésion avec le tissu osseux (Hench 1988). Les bio-céramiques comme l'hydroxyapatite sont souvent utilisées avec succès en application clinique sur l'os (Ohgushi and Caplan 1999). Cependant, bien que très

élaborés, ces matériaux ne contiennent pas toutes les protéines nécessaires au processus de réparation du tissu osseux. Des travaux ont démontré que des protéines naturellement présentes dans la matrice osseuse étaient capables de recruter des CSM originaires du périoste, de les faire proliférer et d'induire leur différenciation en ostéoblastes (Reddi 1998). L'approche la plus prometteuse est d'isoler des progéniteurs ou des cellules souches mésenchymateuses à partir de la moelle osseuse ou du périoste et de les faire proliférer *in vitro*. Après expansion, les progéniteurs, indifférenciés ou engagés dans la voie de différenciation des cellules osseuses, sont transplantés avec des molécules de signalisations au niveau du site à réparer. Actuellement, plusieurs complexes cellules/matériaux sont utilisés dans des cas de transplantations ou de greffes en ingénierie tissulaire de l'os. Chaque étude démontre une différenciation ostéogénique et une reconstitution du tissu (Ohgushi and Caplan 1999; Perka, Schultz et al. 2000; Dennis, Esterly et al. 2007).

En ce qui concerne la régénération du cartilage elle a d'abord fait appel à l'utilisation de chondrocytes (Figure 8). En effet, les premiers travaux consistaient en une transplantation autologue de chondrocytes (ACT pour Autologous Chondrocytes Transplantation) qui a apporté un bénéfice thérapeutique à une quinzaine de patients (Brittberg, Lindahl et al. 1994). En 2002, c'est une centaine de patients qui a bénéficié de ce traitement. Cependant, lors d'une ACT, une petite partie de périoste est suturée sur le défaut de cartilage. Or, le périoste est riche en cellules souches mésenchymateuses qui ont un potentiel chondrogénique (De Bari, Dell'Accio et al. 2001). Selon Jorgensen, ces cellules joueraient un rôle dans la réparation du cartilage (Jorgensen, Noel et al. 2001). En effet, les CSM ont largement démontré leur potentiel de différenciation en chondrocytes, par induction *via* le TGF- β (1, 2 ou 3) ; chez le lapin (Wakitani, Goto et al. 1994) et chez l'homme (Johnstone, Hering et al. 1998; Barry, Boynton et al. 2001) ou par induction *via* leur microenvironnement (MMP et molécules d'adhésions) (Djouad, Delorme et al. 2007). L'addition de BMP-2, 6 et 7 stimule la chondrogénèse (Sekiya, Colter et al. 2001; Noel, Gazit et al. 2004). En 2002, les CSM sont utilisées pour traiter un défaut de cartilage chez l'homme, dans le cas d'ostéoarthrite du genou (Wakitani and Yamamoto 2002). Dès six semaines, le score arthroscopique et histologique est amélioré et ce jusqu'à la semaine 42. En revanche, dans cette étude, le bénéfice clinique n'est pas significatif par rapport aux malades non traités.

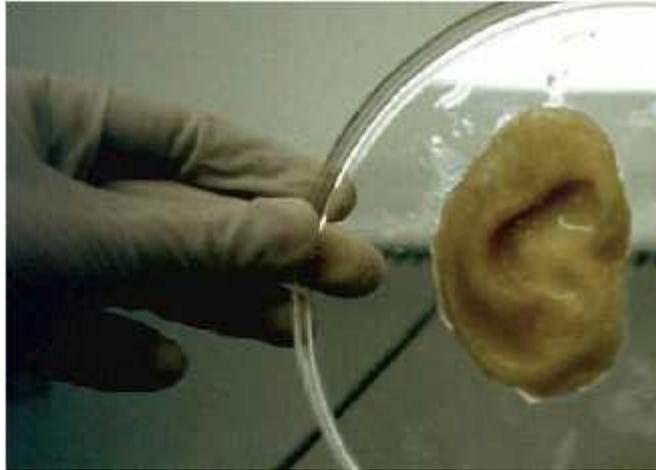


Figure 8 : Exemple d'ingénierie tissulaire : le cartilage

Une vision prometteuse de l'ingénierie tissulaire du cartilage Un laboratoire Allemand a fait pousser une oreille à partir de chondrocytes isolés cultivés sur un matériau de fibres biodégradables. (Ringe, Kaps et al. 2002)

En plus d'être utilisées en vertu de leur multipotence, les CSM peuvent aussi être utilisées en thérapie génique comme « fournisseurs de protéines ». Dans ce cas, les CSM sont transfectées par un gène ou un virus (exemple du virus du sarcome myéloprolifératif) codant pour une protéine de synthèse avant d'être injectées au niveau du site à réparer (Allay, Dennis et al. 1997; Lee, Majumdar et al. 2001). Les travaux d'Allay montrent qu'après transfection des CSM par le virus du sarcome myéloprolifératif, les cellules conservent leur potentiel ostéogénique et que le transgène est exprimé jusqu'à 12 semaines.

a. Les CSM dans les atteintes cardiovasculaires

Ces dernières sont encore appelées cardiomyocytes et sont responsables de la contraction du cœur. Contrairement aux cellules musculaires squelettiques, les cardiomyocytes ne se régénèrent pas après la naissance. Les maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus ou l'athérosclérose représentent la première cause de mortalité dans de nombreux pays. Les moyens de traitement actuel combinent transplantation et/ou médication à long terme. La thérapie cellulaire visant à remplacer les cellules cardiaques non fonctionnelles apparaît alors comme la solution intermédiaire aux deux précédentes (transplantation et traitement). L'utilisation des CSM dans ce type de pathologie connaît beaucoup de succès. Il est déjà connu que les CSM se différencient en cellules musculaires squelettiques, en cellules musculaires lisses et en cellules musculaires cardiaques (Minguell, Erices et al. 2001; Reyes and Verfaillie 2001). Il a d'abord été démontré chez la souris que les cellules stromales de la moelle se différenciaient en cardiomyocytes *in vitro* (Makino, Fukuda et al. 1999; Fukuda

2001). Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le porc, une étude a montré qu'une injection de CSM réduisait la taille de l'infarctus et augmentait la fraction d'éjection (Strauer, Kandolf et al. 2001; Amado, Schuleri et al. 2006). Chez l'homme, des travaux montrent que les cellules stromales médullaires sont capables de restaurer la contractilité du ventricule après un infarctus (Schachinger, Dimmeler et al. 2006). D'autres travaux, très encourageants, montrent qu'une transplantation de CSM diminue les symptômes causés par une ischémie, augmente la fonction cardiaque et allonge la durée de vie chez des patients en stade terminal (Gao, Wang et al. 2006).

e. Les CSM dans les pathologies de la peau

Il a été montré chez la souris que l'altération tissulaire favorise la migration des cellules médullaires vers la peau et que celles-ci pouvaient se différencier en différents types cellulaires structurant la peau avec des morphologies identiques aux cellules résidentes (Kataoka, Medina et al. 2003). En cas d'altération tissulaire, la colonisation par les cellules médullaires augmente, dans la zone lésée (Borue, Lee et al. 2004). Celles-ci pourraient favoriser la cicatrisation par leur sécrétion de collagène (Fathke, Wilson et al. 2004) et être impliquées dans la régénération tissulaire de la peau (Brittan, Braun et al. 2005; Mori, Bellini et al. 2005). Les cellules souches mésenchymateuses humaines semblent pouvoir contribuer à la régénération de la peau chez le model murin. En effet, lorsque les CSM sont injectées par voie systémique elles sont retrouvées dans la peau vingt jours après greffe et leur présence favorise la cicatrisation (Mansilla, Marin et al. 2005; Francois, Bensidhoum et al. 2006). De récents travaux *in vitro* suggèrent que les CSM pourraient également contribuer à la réorganisation de la matrice extracellulaire après lésion sans que celles-ci se soient différencier en kératynocytes (Schneider, Neuss et al. 2008). De plus, les facteurs sécrétés par les CSM inhiberaient la fibrose et l'apoptose, augmenteraient l'angiogénèse et stimuleraient la mitose et la différenciation des cellules endogènes, favorisant ainsi la régénération tissulaire (Caplan and Dennis 2006). Une stratégie thérapeutique innovatrice a été appliquée à une victime d'un accident d'irradiation le 15 décembre 2005 au Chili avec une source radioactive d'iridium (^{192}Ir , 3.3 TBq). La prolongation secondaire de la nécrose radio-induit a mené à une excision des tissus fibronécrotiques. Une thérapie cellulaire locale en utilisant des CSM du patient a été utilisée comme source de facteurs trophiques pour favoriser la régénération des tissus. L'évolution clinique a été favorable, aucune réapparition des lésions cutanées sévères n'a été observée ni d'inflammation durant les onze mois pendant lesquels le patient a été suivi. Cette approche thérapeutique multidisciplinaire combinant des techniques physiques, des procédures chirurgicales et la thérapie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuse a une forte implication

clinique pour améliorer la gestion médicale des irradiations localisées graves. Elle ouvre également de nouvelles perspectives dans le domaine des complications de radiothérapie (Lataillade, Doucet et al. 2007).

d. Les CSM dans les atteintes neurodégénératives

Récemment encore, les neurobiologistes considéraient que le cerveau et la moelle épinière ne pouvaient se réparer. La découverte de cellules souches au cœur du cerveau adulte a bouleversé cette croyance. L'équipe de Pierre-Marie Lledo à l'Institut Pasteur (Unité "Perception et Mémoire", CNRS URA 2182) avait démontré que le cerveau adulte fabriquait de véritables neurones capables d'y établir de nouvelles connexions (Carleton, Petreanu et al. 2003). Cette capacité offre au cerveau la possibilité de se réparer en cas de lésion ou maladie. Mais son renouvellement cellulaire est extrêmement lent. Et de ce fait, il existe un handicap profond qui caractérise les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, Parkinson, Huntington et la Sclérose Amyotrophique Latérale (maladie de Lou Gehrig) qui est due à la destruction progressive des cellules du cerveau.

Il a été démontré que les cellules souches multipotentes de la moelle osseuse pouvaient se différencier *in vitro* en cellules du neuroectoderme après induction par un milieu spécifique (Woodbury, Schwarz et al. 2000; Jiang, Vaessen et al. 2002). Les CSM humaines en culture possèdent des marqueurs neuroépithéliaux et des marqueurs des précurseurs neuronaux tels que la nestine, musashi-1, vimentine, n-cam, pax6 et sox 9. Les marqueurs des neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Chu, Chang et al. 2006) sont simultanément présents sur les CSM lors de leur expansion. Les CSM expriment également de multiples gènes dopaminergiques (Nurr1, récepteur Shh) et produisent une grande variété de facteurs neurotrophiques chez le rat (GFR α 1, FGF-1, FGF-4) (Kramer, Woodbury et al. 2006). Par la sécrétion de ces molécules neurorégulatrices les CSM contribueraient à la survie neuronale et à la régénération des nerfs (Crigler, Robey et al. 2006).

- Système nerveux central

De nombreux travaux *in vivo* chez le rat ont été réalisés par injection locale de cellules souches mésenchymateuses humaines (Azizi, Stokes et al. 1998).

Ces études montrent que l'administration de CSM limite la sévérité des séquelles neurologiques dans les modèles animaux de lésions (Chen, Li et al. 2001) et les atteintes du cerveau. Les CSM humaines migrent dans les différentes zones du cerveau de rat (Lu, Mahmood et al. 2001) et persistent jusqu'à 72 jours (Azizi, Stokes et al. 1998) voir trois mois avec un effet fonctionnel durable (Mahmood, Lu et al. 2004). Les cellules implantées induisent la sécrétion endogène de BMP-2 et 4 (brain bone morphogenetic protein 2/4), de

connexine-43 et de synaptophysine [Zhang C, Li Y et al. Neuroscience, 2006]. Chez la souris SCID l'injection de CSM dans l'hippocampe induit une augmentation de l'expression des facteurs NGF, VEGF, CNTF, FGF2 et BMI-1. Les CSM pénètrent dans le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique (Mezey, Chandross et al. 2000). Le SDF-1 et la fractalkine semblent responsables de cette migration aux sites de lésions du cerveau (Hill, Hess et al. 2004; Cui, Chen et al. 2007). Des CSM murines ont été injectées dans le ventricule latéral du cerveau de souris et retrouvées histologiquement dans différentes régions du cerveau comme l'hippocampe, le cervelet et les bulbes olfactifs. Ces cellules implantées exprimaient la protéine spécifique des astrocytes matures comme la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ou des protéines spécifiques des neurones comme les neurofilaments, suivant leur localisation (Kopen, Prockop et al. 1999). Les CSM humaines contribuent à la récupération fonctionnelle notamment sur la microglie (Silani, Cova et al. 2004). De nombreuses études ont été réalisées après une ischémie locale entraînant des pertes des fonctions sensorimotrices, mais six semaines après une xéno greffe de CSM, les rats montrent une amélioration de leurs fonctions sensorimotrices, bien que les CSM injectées ne se soient pas différenciées (Zhao, Duan et al. 2002). Ces résultats suggèrent pour les CSM de rat ont un rôle trophique ou cytoprotecteur stimulant les progéniteurs préexistants (Zhao, Duan et al. 2002). 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 par stéréotaxie dans le striatum de rats parkinsoniens. Six semaines après injection, le taux de dopamine avait significativement augmenté dans cette région (Lu, Zhao et al. 2005), suggérant limitation de la progression de la maladie de Parkinson. Les maladies neurodégénératives congénitales montrent l'affaiblissement neurologique postnatal progressif menant à la mort prématurée et sont insurmontables aux thérapies systémiques telles que la transplantation de moelle. Une étude pré-clinique a été menée sur les CSM dérivée de moelle osseuse dans le SNC de jeunes macaques de rhésus d'adulte pour évaluer leur sûreté et leur praticabilité en tant que vecteurs pour le cas des désordres neurologiques. Les taux d'implantation des CSM de donneurs mâles dans le SNC des femelles greffées étaient de 0.026×10^{-3} à 0.163×10^{-3} %. Les MSC ont été localisées *in situ* confirmant leur présence et l'expression du marqueur CD68 de macrophage, du marqueur GFAP d'astrocytes, et des marqueurs neuronaux NeuN et MAP2 ont été évalués. La greffe de CSM n'a eu aucun effet nuisible sur la santé des animaux, ni sur le comportement, la posture et la locomotion et ce sur une période de six mois post-injection (Isakova, Baker et al. 2006).

- système nerveux périphérique

Plusieurs études ont évalués leur rôle sur la douleur. Les atteintes du nerf sciatique sont un moyen de quantifier la douleur. La constriction chronique du nerf sciatique ainsi que la ligation de la moelle épinière entre la cinquième et la sixième lombaire sont de bons modèles d'étude des syndromes de douleur accompagnant les atteintes des nerfs périphériques et des maladies associées. Dans ce modèle des rats mâles ont été traité par une injection intra-veineuse de dix millions de cellules mononucléées (CMN) de la moelle. L'analyse de l'hypersensibilité thermique et mécanique a montré que l'injection de CMN prévient la douleur 10 jours après greffe (Klass, Gavrikov et al. 2007). Dans ce modèle, Musolino a démontré qu'il existait des changements induits par les CSM dans le comportement à la douleur sciatique (Musolino, Coronel et al. 2007). Les CSM après injection ipsilatérale intraganglionnaire, migrent au niveau de la racine dorsale ganglionnaire chez le rat (Coronel, Musolino et al. 2006). Trois jours après lésion les animaux développent un mécanisme ipsilatéral et une allodynie thermique qui persiste jusqu'à 56 jours. L'injection de CSM prévient l'allodynie et réduit le nombre de réponse allodynique à un stimulus par le froid. Ces études démontrent que les CSM ont un effet analgésique et que cet effet est quantifiable. L'implantation directe de CSM au niveau de la moelle épinière favorise la récupération fonctionnelle après lésion chez le rat (Chopp, Zhang et al. 2000; Cizkova, Rosocha et al. 2006), stimule la remyélinisation et améliore la vitesse de conduction axonale dans les zones démyélinisées (Akiyama, Radtke et al. 2002). L'effet neuroprotecteur des CSM résulterait également de leur capacité à remplacer des neurones endommagés via la différenciation cellulaire (Black and Woodbury 2001). Des études récentes chez le rat suggèrent que le potentiel des CSM est lié à la sécrétion de facteurs neurotrophiques comme le NGF et le BDNF (Mahmood, Lu et al. 2004) qui permettent la survie neuronale, induisent la prolifération des cellules endogènes et favorisent la régénération des fibres nerveuses aux sites des lésions (Li, Chen et al. 2002; Mahmood, Lu et al. 2004). L'induction de la neurogénèse, la stimulation de l'expression de b-FGF (basic fibroblast growth factor) et la réduction de l'apoptose sont des mécanismes possibles pour expliquer l'effet des CSM dans le traitement des lésions nerveuses et de récupération fonctionnelle des séquelles (Chen, Li et al. 2003). Après injection de CSM de souris chez le rat, peu de CSM (1-5%) expriment des marqueurs neuronaux tandis que la récupération neurologique est observée (Wislet-Gendebien, Wautier et al. 2005). Cette récupération semble être liée à une réduction de l'apoptose dans la zone lésée (Wislet-Gendebien, Wautier et al. 2005) et une prolifération des cellules endogènes (Chen, Li et al. 2003); Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. (Mahmood, Lu et al. 2004).

Finalement les CSM semblent avoir un effet direct sur le cerveau lésé par sécrétion de facteurs neurotrophiques plutôt qu'une différenciation en cellules du tissu. Elles semblent avoir également un effet indirect en modulant la réponse inflammatoire.

f. Les CSM dans les atteintes de la sphère digestive

- le rein

La thérapie cellulaire du rein est principalement motivée par la recherche de traitement des affections rénales aiguës (ARF pour Acute Renal Failure). C'est une maladie qui affecte plus de 7% des personnes hospitalisées et spécialement celles en soins intensifs (Morigi, Imberti et al. 2004). En l'absence de traitement, cette maladie entraîne la mort dans 30 à 50 % des cas (Neild 2001). Les travaux concernant les greffes de CSM dans les atteintes du rein tendent surtout à démontrer une implantation de celles-ci au niveau des zones vasculaires voir même au niveau des zones fonctionnelles (Grimm, Nickerson et al. 2001; Poulson, Forbes et al. 2001; Gupta, Verfaillie et al. 2002). Cependant, dans la majorité de ces études le pourcentage de chimérisme reste très faible. L'effet des CSM a ensuite été étudié chez un modèle de souris présentant une affection rénale aiguë induite par injection de glycérol. Le principal effet associé à cette pathologie est une nécrose étendue de l'épithélium tubulaire. Les premières études de thérapies cellulaires destinées à traiter l'ARF ont été faites chez plusieurs modèles murins différents. Dans une première étude, il a été démontré que les CSM de souris s'implantaient au niveau du rein chez les souris malades mais pas chez les souris témoins (Herrera, Bussolati et al. 2004). L'équipe d'Herrera annonce même une différenciation des CSM en cellules tubulaires de par leur expression de cytokératine. Les résultats obtenus ne sont pas directement liés au modèle puisque il a aussi été démontré une implantation tubulaire des CSM après une irradiation létale chez la souris (Krause, Theise et al. 2001). Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant des CSM humaines pour traiter des souris présentant une ARF induite par un anticancéreux tel que le ciplastin (Morigi, Imberti et al. 2004).

- l'intestin et le foie

A la suite des nombreux succès expérimentaux ou cliniques, présentés ci-dessus, les CSM sont apparues comme une voix encourageante et prometteuse par bon nombre d'équipes. Ces pourquoi, au fil des années, leurs propriétés ont été mises au profit d'autres organes après la moelle osseuse et l'os. Le système digestif est le premier organe en contact avec les substances nutritives, d'où l'intérêt de préserver son efficacité d'absorption. Dans l'intestin, les CSM sont sollicitées après une détérioration de l'épithélium suite à une irradiation par exemple. A ce jour, il n'a pas été démontré de différenciation claire des CSM en entérocytes bipolaires fonctionnels. D'une manière générale, les pathologies affectant

l'intestin se répercutent à court et moyen terme sur le foie, acteur important du cycle entéro-hépatique. Le foie est un organe complexe et vital qui harmonise différentes cellules spécialisées telles que les hépatocytes, les cellules des canaux biliaires, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales. Chacune d'entre elles assurant un rôle dans les diverses fonction du foie telles que la détoxification, le métabolisme, l'inflammation ou digestion. La recherche actuelle a déjà permis de différencier les cellules souches mésenchymateuses en hépatocytes, *in vitro*, ayant des propriétés spécifiques similaires aux cellules hépatiques de l'organisme. Dans la partie suivante intitulée « Les CSM pour le traitement des affections gastro-intestinales » les systèmes de régénération intestinale et hépatique sont étudiés afin de mettre en évidence leurs limites. Les propriétés des cellules intestinales et hépatiques sont détaillées dans le but de comprendre à quel point les CSM sont capables de les mimer.

4. Les CSM pour le traitement des affections gastro-intestinales

4.1. Régénération intestinal

4.1.1. Cellules souches intestinales et renouvellement de l'épithélium

L'intestin est un organe en perpétuel renouvellement. L'homéostasie de l'épithélium intestinal est un équilibre entre l'apoptose, la prolifération et la différenciation des cellules qui le composent. Le renouvellement de ce tissu est assuré par les cellules souches présentes à la base des cryptes. Les cellules souches épithéliales résident près de la base des cryptes et se divisent de façon asymétrique pour donner des cellules filles qui migrent vers le haut de la crypte (Potten, Owen et al. 1990). Les cellules en migration apparaissent à la jonction crypto-villositaire comme des cellules hautement différenciées et continuent leur migration jusqu'à l'apex de la villosité (figure 9). Ces cellules sont ensuite libérées dans la lumière intestinale par un phénomène d'anoïkis (mort cellulaire apparentée à l'apoptose se produisant par une perte d'adhérence) (Frisch and Sreaton 2001). La prolifération importante de l'épithélium est donc contre-balançée par ce phénomène de mort cellulaire afin de maintenir sa structure et sa fonction. Lors de ce processus de prolifération et de migration, les quatre types de cellules épithéliales (entérocytes, cellules à mucus, cellules endocrines et cellules de Paneth) se différencient en maintenant à la fois l'intégrité de la barrière et l'homéostasie intestinale.

Les cellules souches qui permettent la régénération des villosités de l'intestin sont donc localisées à la base de celles-ci, dans les cryptes. Une crypte est dérivée d'une seule cellule souche, elle est dite monoclonale (Ponder, Schmidt et al. 1985). En revanche, les villosités sont issues de plusieurs cryptes et sont donc polyclonales. Les cellules souches sont

capables de se différencier en tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal (Radtke and Clevers 2005).

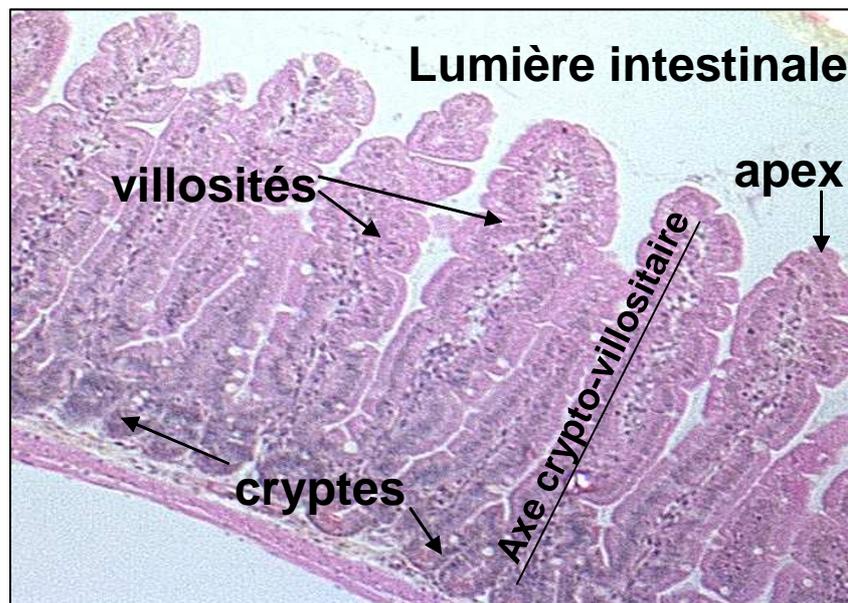


Figure 9 : Organisation de l'intestin en villosités

Les villosités intestinales permettent d'augmenter la surface de l'intestin et ainsi permettent une meilleure absorption des molécules issues de la digestion. L'intestin est un tissu à renouvellement rapide. Les cellules souches se situent à la base des cryptes et se divisent pour donner des cellules filles qui migrent vers le haut de la crypte (Potten, Owen et al. 1990). Les cellules différenciées migrent suivant l'axe crypto-villositaire jusqu'à l'apex de la villosité. Ces cellules sont ensuite libérées dans la lumière intestinale par un phénomène d'anoïkis.

4.1.2. Les complications intestinales radio-induites

Comme nous l'avons vu précédemment l'irradiation induit différents syndromes dont le syndrome gastro-intestinal. Avec une période de latence de un à quatre jours ce syndrome se caractérise par des dénudations de la muqueuse digestive et par la rupture des barrières intestinales et vasculaires. L'atteinte intestinale résulte de la perte de l'activité mitotique des cellules souches (Potten, Owen et al. 1990) et de dommages à la microvascularisation (Paris, Fuks et al. 2001). Les conséquences cliniques sont l'anorexie, des nausées, des vomissements pendant la phase prodromale, puis des pertes massives d'eau et d'électrolytes par des diarrhées aiguës, des saignements et des infections souvent aggravées par le statut immunodéprimé du patient lors de la phase principale. L'efficacité de la prise en charge thérapeutique du syndrome gastro-intestinal reste encore aujourd'hui très limitée et repose essentiellement sur des traitements symptomatiques comme les anti-émétiques, anti-diarrhéiques et antibiotiques. La gamme de dose létale du syndrome gastro-intestinal

s'étend de 10 à 50Gy, avec, sans prise en charge thérapeutique, un décès dans les cinq à douze jours après irradiation (Cabre, Mancebo et al. 2005).

4.1.3. Traitements du tractus gastro-intestinal

Les traitements de l'irradiation accidentelle ciblent essentiellement les symptômes cliniques. Ils nécessitent l'utilisation d'anti-émétiques, d'antibiotiques et de processus d'hydratation des tissus. En revanche, les traitements de l'irradiation thérapeutique sont plus efficaces car administrés avant l'irradiation. Ces traitements utilisent des molécules comme le TGF-B3, le KGF et l'IL11. Certains traitements visent la stimulation de la prolifération des cellules souches intestinales par l'utilisation de KGF (Khan, Shui et al. 1997; Potten, O'Shea et al. 2001), de rHuKGF (recombinant Human KGF) (Dorr, Reichel et al. 2005), de bFGF (Houchen, George et al. 1999) et de FGF-4 (Takahama, Ochiya et al. 1999). L'inhibition de l'apoptose radio-induite au niveau des cryptes constitue un autre principe de traitement. Ces traitements utilisent le GLP2 (Glucagon-Like Peptide II) l'IGF (Insulin Growth Factor) (Mylonas, Matsouka et al. 2000) ou le LPA (Lyso Phosphatidic Acid) (Deng, Balazs et al. 2002). D'autres traitements sont basés sur l'inhibition du stress oxydatif par l'utilisation de molécules ou d'enzymes telles que la SOD (SuperOxyde Dismutase) (Guo, Wolfe et al. 2003), la vitamine E (Empey, Papp et al. 1992), le sélénium (Mutlu-Turkoglu, Erbil et al. 2000) et le bêta-carotène (Kurabe, Itoh et al. 2002). Les traitements anti-inflammatoires sont aussi proposés, notamment avec l'utilisation du PGE2 comme médiateur endogène (Cohn, Schloemann et al. 1997) ou le CAPE inhibiteur de la réaction inflammatoire via l'inhibition du NF-kB (Linard, Marquette et al. 2004). Le traitement anti-ischémique par l'hirudine minimise les effets des rayonnements ionisants en inhibant la thrombine (Wang, Reed et al. 2004).

Si les traitements associés à la radiothérapie sont plus ou moins satisfaisants il n'existe actuellement pas de moyens similaires dans le cas d'irradiation accidentelle. La nécessité de palier aux dommages précoces radio-induits sur l'intestin contribue à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4.1.4. Les CSM dans le traitement des atteintes intestinales

Actuellement, peu d'études portent sur le potentiel thérapeutique des CSM face aux lésions du tractus gastro-intestinal. Chez un jeune patient leucémique présentant une réaction de GVHD (Graft Versus Host Disease) consécutive à une transplantation de cellules hématopoïétiques, une greffe de CSM a montré des effets bénéfiques sur les désordres fonctionnels intestinaux associés à la GVHD (Le Blanc, Rasmusson et al. 2004). D'après les auteurs, le bénéfice thérapeutique passerait essentiellement par les propriétés

immunosuppressives des CSM. Une autre étude au Laboratoire de Thérapie Cellulaire de l'IRSN a montré que les CSM, en co-infusion avec des cellules hématopoïétiques, étaient capables de migrer vers les tissus lésés. En effet, les cellules sont retrouvées dans l'intestin grêle, après exposition aux rayonnements ionisants sur un modèle d'atteinte multiple des organes chez le primate non humain (Chapel, Bertho et al. 2003). Chez la souris immunodéficiente, les CSM humaines injectées après une irradiation du corps entier et d'une dose supplémentaire à l'abdomen, se localisent préférentiellement au sein des tissus ayant reçu la dose d'irradiation la plus élevée (Francois, Bensidhoum et al. 2006).

Plus récemment des CSM isolées à partir d'une lipoaspiration ont été utilisées, chez cinq patients, pour le traitement de fistules apparaissant dans la maladie de Crohn (Garcia-Olmo, Garcia-Arranz et al. 2005). L'étude montre que 75 % des fistules sont recouvertes d'épithélium au bout de huit semaines et les patients ne souffrent pas d'effets secondaires jusqu'à trente mois après inoculation. Dernièrement, les CSM ont été utilisées pour traiter dix patients présentant des perforations coliques, des cystites hémorragiques et/ou des pneumomédiastinum (Ringden, Uzunel et al. 2007). Après une injection de MSC, les résultats montrent une disparition des cystites hémorragiques chez cinq patients et une disparition de la pneumomédiastinum chez deux autres patients. De plus, l'injection de CSM a permis de résorber une perforation de l'intestin et de guérir une péritonite chez un patient présentant une GVHD (Graft Versus Host Disease ou Réaction du Greffon Contre l'hôte) résistante aux traitements par stéroïdes. Après une amélioration de leur état, deux patients traités sont décédés suite au développement d'un syndrome multi organe.

4.2. Aspect cellulaire de la régénération hépatique

Depuis plus de dix ans, l'ingénierie tissulaire est expérimentalement mise en œuvre dans le traitement des pathologies hépatiques. Les premiers travaux faisaient intervenir des hépatocytes isolés cultivés *in vitro* en trois dimensions avant d'être transplantés (Kaufmann, Sano et al. 1994). L'utilisation d'une matrice tridimensionnelle constitue un support de culture de haute qualité et favorise la transplantation. La stimulation de la néosynthèse tridimensionnelle du tissu est spécifique de la nature de la matrice polymérique ce qui permet donc d'approprier le milieu à la différenciation souhaitée (Mooney, Hansen et al. 1992). D'autres travaux ont montré une implantation à long terme des hépatocytes greffés ainsi qu'une prolifération *in situ* de ces cellules (Kneser, Kaufmann et al. 1999). Les cellules transplantées s'intègrent fonctionnellement dans le tissu et y ont une activité métabolique. En effet, des travaux effectués sur de rats déficients en glucuronyl-transférase (Gunn rats) ou en acide ascorbique (ODS rats) ont montrés que les hépatocytes greffés étaient capables de combler ces carences (Asonuma, Gilbert et al. 1992;

Uyama, Kaufmann et al. 2001). Malgré les nombreux succès expérimentaux que connaissent les hépatocytes ces cellules présentent un problème de vitesse de croissance *in vitro*. De ce fait, l'utilisation de cellules à haut potentiel prolifératif demeure une alternative prometteuse dans le traitement des atteintes hépatiques. Les cellules souches du foie fœtal et adulte apparaissent alors comme des candidats idéals.

4.2.1. Les cellules souches hépatiques

4.2.1.1. Les cellules fœtales

Différents types de progéniteurs hépatiques ont été identifiés durant le développement fœtal du foie. Ces cellules présentent un potentiel clonogénique *in vitro* ainsi qu'une double capacité de différenciation en cellules hépatiques ou en cellules biliaire (Suzuki, Zheng et al. 2000). L'expression phénotypique des progéniteurs hépatiques est proche de celle de la plupart des cellules souches, elles sont c-kit⁻, CD49f⁺, CD29⁺, CD45⁻, TER119⁻ (Suzuki, Zheng et al. 2002). Au stade fœtal, le foie possède un autre type de progéniteurs, d'abord mis en évidence chez le rat, appelés cellules progénitrices épithéliales du foie fœtal (FLEC) (Dabeva, Petkov et al. 2000). Ces cellules sont marquées par un phénotype de cellules hépatiques immatures (CK-19⁺, AFP⁺), elles possèdent les mêmes capacités de différenciation que les précédentes et sont capables de proliférer activement après transplantation dans un foie de souris adulte (Nierhoff, Ogawa et al. 2005). L'utilisation des cellules souches hépatiques présente des avantages par rapport aux hépatocytes quant au développement de l'ingénierie tissulaire pour le traitement des maladies du foie. En effet, la culture cellulaire fournit facilement des quantités conséquentes de cellules filles potentiellement thérapeutiques. Cependant, en plus des risques médicaux, les considérations éthiques et les aspects légaux viennent freiner l'élan de cette technologie. Seules les cellules souches adultes sont épargnées par ces débats et le recours à leur utilisation constitue une alternative légitime.

4.2.1.2. Les cellules ovales

4.2.1.2.1. Définition et propriétés

En plus des cellules déjà citées, dans le foie, coexistent des cellules phénotypiquement proches des cellules du foie adulte (Strain and Crosby 2000). Elles expriment à la fois CK-18 qui est un marqueur des hépatocytes et Thy1 qui est un marqueur de cellules souches (Fiegel, Park et al. 2003). Ces cellules ressemblent aux cellules ovales du foie adulte et co-expriment des marqueurs d'hépatocytes et de cellules biliaires ainsi que des marqueurs connus chez les cellules souches hématopoïétiques tels que c-kit et CD34 (Strain and

Crosby 2000).

Les cellules ovales du foie ont une bipotentialité de différenciation en hépatocytes et en cellules épithéliales des canaux biliaires (Haruna, Saito et al. 1996) (Figure 10). Ces cellules sont clonogéniques et possèdent un pouvoir de prolifération important dans certaines conditions (Lazaro, Rhim et al. 1998).

En effet, en cas de mort cellulaire importante ou lorsque la prolifération des hépatocytes est altérée, une régénération se met en place à partir des cellules ovales hépatiques. Ces cellules, bien caractérisées dans des modèles de régénération hépatique chez le rat (Oh, Witek et al. 2007), sont aussi présentes en grand nombre dans le foie de patients présentant une cirrhose ou ayant une hépatite fulminante. Elles peuvent provenir de l'expansion de précurseurs qui persistent dans le foie adulte au niveau des canaux de Hering (Grisham 1997) ou des cellules blastiques localisées au niveau des canaux biliaires (Novikoff, Yam et al. 1996) (Figure 10). Les cellules ovales, quelle que soit leur origine, prolifèrent dans la région périportale, migrent et se différencient assurant la régénération du foie quand la prolifération des hépatocytes est altérée ou inhibée. Elles expriment des marqueurs spécifiques comme CK 19 (cytokératine 19), OV6 et alpha-foeto-protéine (AFP). Il a été démontré chez la souris, qu'après transplantation d'un certain type de cellules hépatiques, le foie lésé était colonisé et régénéré (Overturf, al-Dhalimy et al. 1997). Selon Strain et Crosby ces cellules ne sont pas des cellules ovales mais plutôt des progéniteurs unipotents (Strain and Crosby 2000), dès lors, le débat sur l'origine et le potentiel des cellules ovales hépatiques prend toute son ampleur.

Certains travaux ont démontrés que les cellules souches mésenchymateuses pouvaient se différencier *in vitro* en cellules hépatiques, sous induction par un milieu spécifique (Lee, Kuo et al. 2004) ou en co-culture avec des cellules hépatiques fœtales (Lange, Bruns et al. 2006). De tels résultats imposent de répondre à la question de l'origine des cellules ovales hépatiques.

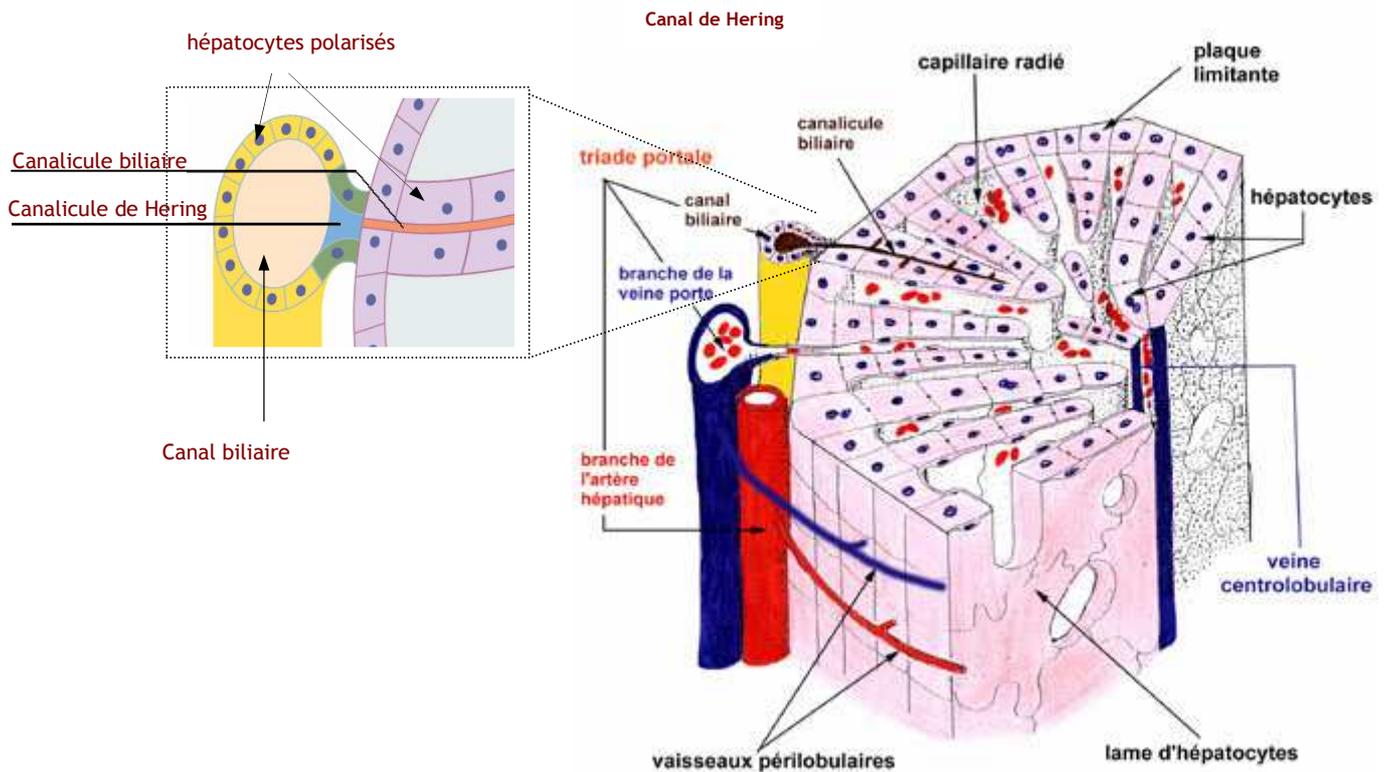


Figure 10 : Organisation des canaux hépatiques

Le foie est un organe constitué de plusieurs lobes. C'est un organe très irrigué et présentant plusieurs canaux formés par des hépatocytes polarisés. Les cellules ovales peuvent provenir des précurseurs persistant au niveau des canaux de Hering (Grisham 1997) ou des cellules blastiques localisées au niveau des canaux biliaires (Novikoff, Yam et al. 1996).

4.2.1.2.2. L'origine médullaire des cellules ovales

D'une façon générale il paraît plus légitime de penser que les cellules souches d'un tissu proviennent de ce tissu. Ainsi les cellules souches musculaire (cellules satellites) sont localisées dans le muscle, les cellules souches dermiques dans le derme, les cellules souches intestinales dans l'intestin et pourquoi pas les cellules souches hépatiques dans le foie. Si les trois premières propositions sont plutôt exactes actuellement, il en reste néanmoins quelques doutes quant à la dernière. En effet, depuis 1999 plusieurs travaux se vouent à démontrer une origine non conventionnelle des cellules souches hépatiques. Ainsi, il a été démontré chez le rat que la moelle osseuse pouvait être une source de cellules ovales (Petersen, Bowen et al. 1999). En effet, en bloquant la prolifération des hépatocytes avant d'injecter de la moelle osseuse à un rat, les résultats montrent que les cellules de la moelle osseuse sont retrouvées dans le foie et y ont une activité enzymatique. Cela est possible notamment en greffant des cellules de rat mâle à un rat femelle et en recherchant le chromosome Y soit par amplification de l'ADN spécifique du centromère soit par hybridation *in situ* (FISH). Par la même technique il a été démontré que les cellules

marquées par le chromosome Y exprimaient aussi la cytokératine 8 retrouvée principalement chez les hépatocytes (Alison, Poulsom et al. 2000). Cependant, dans ces deux dernières études les dommages censés induire un recrutement et une différenciation hépatique des cellules injectées ne sont pas clairement démontrés. Or nous savons que les cellules souches ovales interviennent dans la régénération uniquement dans certaines conditions réunies lors d'un dommage du foie ou dans un modèle de maladie hépatique (Thorgeirsson, Evarts et al. 1993; Petersen, Zajac et al. 1998). De ce fait, il est difficile de dire si les cellules de la moelle osseuse sont une source de cellules ovales ou simplement une source d'hépatocyte en empruntant une voie de différenciation alternative. Il existe néanmoins un autre avis qui refuse de voir la moelle osseuse comme source de cellules ovales. En effet, en 2004 une équipe a injecté des cellules de moelle osseuse de rats mâles chez des femelles et a montré, qu'après 15 à 30 jours, moins de 1 % de ces cellules exprimaient la cytokératine 19 dans le foie (Menthen, Deb et al. 2004). L'argument mis en avant est bien entendu le taux, relativement faible, de précurseurs qui, selon l'auteur, ne permet pas la régénération. Nous avons vu que le taux de CSM dans la moelle osseuse est de 1 à 10 CSM pour 10^5 cellules mononucléées. Bien que cette proportion soit très faible, les CSM jouent un rôle important dans le soutien de l'hématopoïèse. D'après ces observations, la proportion d'un type cellulaire dans un tissu n'est pas forcément représentative du rôle de ce type cellulaire dans ce même tissu.

La majorité des études sur la régénération du foie préfère attribuer le pouvoir régénérant de la moelle osseuse aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) plutôt qu'aux cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Grompe 2003; Wang, Foster et al. 2003; Thorgeirsson and Grisham 2006). Aujourd'hui, le fait que les CSM soit capables de se différencier en hépatocytes (Lange, Bruns et al. 2006) rend le scénario sus-cité moins évident et constitue alors un point non encore résolu.

4.2.2. Les cellules souche mésenchymateuses dans les atteintes hépatiques

4.2.2.1. Etudes *in vitro*

Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de régénérer un foie avec de la moelle osseuse. Les résultats obtenus chez les rongeurs grâce à des greffes homologues de moelle osseuse sont assez spectaculaires et méritent d'être approfondis. Il est dès lors judicieux d'étendre cette technique à de nouveaux modèles pour pouvoir un jour l'extrapoler à l'homme. La première étape à approfondir est l'identification, dans la moelle osseuse, des acteurs cellulaires qui favorisent ou stimulent la régénération tissulaire. Si certains avis tentent d'expliquer la proximité phénotypique des CSH et des cellules ovales d'autres préfèrent s'intéresser au pouvoir de différenciation des CSM en hépatocytes. En effet, il a

été récemment démontré, qu'après sept jours de co-culture avec des cellules hépatiques fœtales, les CSM exprimaient les ARN messagers de l'alpha-foeto-protéine, de la cytokératine 18 et de l'albumine (Lange, Bruns et al. 2006). L'albumine est connue comme marqueur des hépatocytes et est exprimée par les cellules à maturité. La cytokératine 18 (CK18) est une protéine du cytosquelette exprimée par plusieurs types de cellules hépatiques dont les cellules épithéliales biliaires et les cellules ovales (Thorgeirsson 1996). L'alpha-foeto-protéine (AFP) ou protéine alpha-fœtale est un marqueur de cellules hépatiques immatures ou de cellules ovales dans le foie adulte (Zvibel, Fiorino et al. 1998). D'autres travaux montrent que deux semaines après induction les CSM acquièrent une morphologie cuboïde qui se prononce à mesure de la différenciation et de l'expression des ARNm de l'AFP, de la glucose-6-phosphatase et de la tyrosine aminotransférase (Lee, Kuo et al. 2004). En plus de l'expression de CK 18 et de l'albumine les cellules expriment la tryptophane 2,3-dioxygénase qui est une enzyme spécifique du foie impliquée dans le catabolisme du tryptophane. De plus, Lee *et al* démontrent que les cellules souches mésenchymateuse sont capables de stocker le glycogène et de sécréter de l'urée six semaines après induction *in vitro* (Lee, Kuo et al. 2004). Les cellules différenciées expriment le HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4) et comme la lignée hépatocytaire Hep3B elles expriment l'antigène 9b2 spécifique des cellules de canalicules biliaires. Mais le plus original dans cette même étude est, qu'en même temps, il est possible d'induire une activité cytochrome P450 2B6 chez les CSM avec du phénobarbital. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes. Le cytochrome P450 (CYP) est une superfamille d'enzymes de détoxification retrouvées *in vivo* dans plusieurs organes mais en quantité beaucoup plus importante dans le foie du fait de son rôle d'épurateur. La même étude qui avait été réalisée deux ans auparavant sur des cellules progénitrices adultes multipotentes de rongeurs (MAPC), par l'équipe de CM Verfaillie, avait démontré exactement les mêmes résultats (Schwartz, Reyes et al. 2002). Ces résultats viennent s'ajouter à la longue liste des propriétés des cellules souches mésenchymateuse adultes. De telles capacités doivent être judicieusement explorées et confirmées dans des modèles *in vivo* afin de conclure à un réel pouvoir thérapeutique de ces cellules lors d'atteintes hépatiques. Ensembles, ces résultats alimentent en outre le débat sur le degré de filiation entre les CSM et les MAPC présentées comme leurs précurseurs communs avec les CSH (Reyes, Lund et al. 2001).

4.2.2.2. Application des cellules souches mésenchymateuses aux modèles *in vivo*

L'espoir croissant qu'apportent les cellules souches mésenchymateuses à l'évolution de la thérapie cellulaire est tel qu'il suscite bon nombre d'interrogations quant aux champs

d'actions de celle-ci *in vivo*. Si les études concernant la greffe de moelle osseuse sur des modèles d'atteinte hépatique se multiplient, les travaux s'intéressant directement aux CSM restent peu nombreux. Ceci peut être expliqué par le fait que ceux sont d'abord les effets qui sont recherchés plutôt que les acteurs des effets. Dans un souci de rigueur expérimentale et de défi scientifique certaines équipes ont décidé de « rendre aux MSC ce qui appartient aux MSC ». Le but final est bien entendu de pouvoir un jour régénérer le foie de patients atteints d'une affection hépatique telle que cirrhose, hépatite ou dysfonctionnement par exemple créé par irradiation accidentelle ou médicale (radiothérapie). D'autant plus que la présence de CSM a été mise en évidence au niveau du foie humain au stade fœtal (Campagnoli, Roberts et al. 2001). Les études les plus récentes utilisent des modèles de rongeurs (rat ou souris) ayant subi une hépatectomie partielle ou une injection de tétrachlorure de carbone ou d'allylcool pour mimer une atteinte du foie. La régénération hépatique naturelle est inhibée par administration de propranol hydrochloride ou de 2-acétyl-aminofluorene. Dans tous les cas de greffe de CSM dans un organisme de rongeur, il est toujours démontré au préalable que les CSM se différencient *in vitro* (Aurich, Mueller et al. 2007; di Bonzo, Ferrero et al. 2008). Dans les travaux de Aurich *et al* les cellules caractérisées comme des CSM sont prédifférenciées dans un milieu contenant du HGF (Hepatocyte Growth Factor) et de l'EGF (Epidermal Growth Factor). Au bout de 14 jours, les cellules sont ensuite injectées à une souris ayant subi une hépatectomie. Les résultats montrent qu'à 12 semaines les cellules sont implantées en région périportale des lobules hépatiques. Les CSM implantées sont différenciées et développent dans le foie des fonctions de cellules hépatiques : elles stockent le glycogène et expriment la phosphoenol carboxykinase (Aurich, Mueller et al. 2007). Cette enzyme a un rôle clé dans le contrôle de la glucogénèse. De plus, les cellules implantées expriment la connexine 32 (protéine de jonction exprimée par les hépatocytes) et l'antigène HepPar1 spécifique du foie. Dans cette expérience la proportion de cellules humaines implantées n'excède pas 1 % de la masse totale du foie (Aurich, Mueller et al. 2007). En revanche, dans leur étude, Di Bonzo *et al* montrent que les cellules humaines implantées dans un foie de souris représentent, à quatre semaines, près de 3 % des cellules présentes dans le foie et près de 7 % à 6 semaines. Mais seulement 0.18 % à 0.23 % des cellules humaines implantées se différencient en hépatocytes, d'où l'absence ou la faible détection de la transcription d'albumine, d'AFP et de CK18 (di Bonzo, Ferrero et al. 2008). Sato *et al* présentent des résultats différents comptant 0,035 % de CSM différenciées à deux semaines, 0,49 % à six semaines et 0,038 % à huit semaines. Le nombre de CSM greffées étant identique d'une étude à l'autre (1.10⁶ cellules), la différence aussi importante au niveau des résultats est probablement due en partie au modèle, irradié ou non et à la

méthode d'induction de l'atteinte hépatique (Sato, Araki et al. 2005). De plus, il appartient à chacun de dénommer ce qu'il désigne comme une CSM différenciée en hépatocytes en mentionnant sa morphologie, la synthèse d'albumine, le stockage de glycogène ou encore le transport de LDL (Low Density Leucocytes). Hormis la différenciation des cellules, la fusion cellulaire des cellules injectées avec les cellules du tissu est un mécanisme de plus en plus exploré dans les études de greffes cellulaires.

4.2.3. La grande question ou le phénomène de fusion cellulaire.

La fusion cellulaire est un phénomène complexe qui à partir de deux cellules distinctes ne forme qu'une seule cellule. La cellule hybride ainsi formée exprime des caractères phénotypiques et génotypiques des deux cellules initiales. Le mécanisme de fusion cellulaire reste à ce jour une énigme dans la plupart des études de greffes de cellules souches. Ce phénomène aussi rare que spectaculaire interpelle de plus en plus les équipes en thérapie cellulaire. Si la fusion cellulaire est un phénomène fondamentalement très intéressant il n'en reste pas moins un inconvénient majeur pour l'élaboration de protocoles de thérapie cellulaire. En effet, les hybridomes ainsi formés inquiètent les chercheurs et médecins sur le potentiel tumorigène des cellules transplantées. Si les protocoles utilisant les cellules souches hématopoïétiques (CSH) connaissent des controverses sur la question il n'en est pas de même concernant les CSM. En effet, de nombreux travaux montrent que la fusion cellulaire avec les hépatocytes *in vivo* est le phénomène majeur de différenciation des CSH en cellules du foie (Wang, Willenbring et al. 2003; Willenbring, Bailey et al. 2004). En revanche, de nombreux travaux ont démontré une différenciation des CSH en hépatocytes sans fusion cellulaire dans des modèles animaux différents (Newsome, Johannessen et al. 2003; Jang, Collector et al. 2004). De même, il a été démontré à plusieurs reprises que la fusion cellulaire ne faisait pas partie des mécanismes de différenciation des CSM en hépatocytes (Sato, Araki et al. 2005; Aurich, Mueller et al. 2007). Donc, d'après l'ensemble de ces résultats, il convient de dire que dans un modèle de régénération, la fusion cellulaire est un mécanisme utilisé par les CSH mais pas par les CSM.

4.3. CSM ou Cellules Sécrétrices de Médiateurs

Bien qu'il y ait débat sur l'éventuelle capacité de fusion des CSM, leurs capacités de différenciation ont convaincu à l'unanimité. En effet, nous avons précédemment vu qu'elles pouvaient s'adapter à plusieurs environnements très différents et qu'une fois implantées, elles pouvaient se reprogrammer afin d'exprimer des molécules ou protéines spécifiques du tissu hôte. Cependant, toutes les études qui traitent de ce potentiel *in vivo* ne démontrent

qu'une faible implantation qui ne permet pas toujours d'expliquer l'amplitude des effets biologiques associés à leur présence.

C'est pourquoi de plus en plus de travaux tendent à s'intéresser au pouvoir des CSM en tant que cellules sécrétrices de médiateurs trophiques (Caplan and Dennis 2006). Les effets indirects sont dénommés trophiques, en rapport avec l'origine de ce mot qui en neurobiologie indiquait une molécule bioactive libérée par les terminaisons nerveuses mais qui n'était pas un neurotransmetteur (Singer 1964; Singer 1974). Ce qui permettrait alors au CSM, en plus d'intervenir localement dans la régénération d'un organe, d'intervenir dans différents processus tels que l'apoptose, la prolifération, l'angiogénèse ou l'inflammation dans un tissu sans pour autant y être présente. Il a déjà été démontré que les cellules stromales dérivées des CSM ne se limitaient pas à former le tissu conjonctif servant à l'adhésion et au support des cellules. En effet, des équipes ont montré que ces cellules jouaient un rôle très important dans l'angiogénèse et l'hématopoïèse en intervenant dans la régulation des cytokines et facteurs de croissances qui contrôlent ces processus (Dexter 1989; Dexter, Heyworth et al. 1990; Majumdar, Thiede et al. 1998). L'effet trophique des CSM sur les cellules hématopoïétiques est du à la sécrétion de G-CSF, de SCF, de M-CSF et d'IL-6 (Haynesworth, Baber et al. 1996) (Tableau 10). Les CSM expriment également la molécule RANK ligand qui stimule la formation des ostéoclastes intervenant dans le remodelage du tissu osseux et l'ostéoprotégrine (récepteur leurre à la molécule RANK) qui inhibe la formation de l'os (Takahashi, Udagawa et al. 2007). Cet effet trophique a été mis en évidence dans d'autres tissus. En effet, lors d'un infarctus du myocarde, d'un (Majumdar, Thiede et al. 1998) dommage cérébral ou d'une lésion du ménisque, l'injection de CSM a montré un bénéfice thérapeutique indépendant de la différenciation de ces cellules (Caplan and Dennis 2006). Dans le système nerveux, il semblerait que les astrocytes répondent au traitement par CSM en stimulant la régénération axonique (Huang, Wang et al. 2006). Dans le cœur, après implantation des CSM, les effets trophiques ont été démontrés par l'augmentation de l'expression du VEGF qui s'accompagne de l'augmentation de la densité vasculaire, du flux sanguin et de la diminution de l'apoptose (Tang, Hu et al. 2004). Cette effet anti-apoptotique peut être du à l'expression, par les CSM, du gène Akt reconnu comme un gène de survie (Mangi, Noiseux et al. 2003). Dans tous les cas, il semblerait donc que les CSM agissent dans un tissu en inhibant l'apoptose, en stimulant l'angiogénèse et en activant les progéniteurs endogènes (Caplan and Dennis 2006).

L'effet des molécules sécrétées par les CSM peut être direct en induisant un signal intra cellulaire ou indirect en induisant la sécrétion d'agents actifs par les cellules avoisinantes. Donc les CSM peuvent avoir deux actions distinctes : celle de remplacer les cellules d'un

tissu en se différenciant en cellules de ce tissu et celle de stimuler les cellules avoisinantes par production de facteurs bioactifs, sans pour autant se différencier. Néanmoins, la coexistence de ces deux processus au sein d'un organe n'est pas du tout exclue et permet d'expliquer la variabilité des effets d'une étude à l'autre. L'ensemble de ces résultats confère aux cellules souches mésenchymateuses un statut de « cellules réparatrices universelles ».

Marqueurs	Désignation
Antigènes spécifiques	SH2, SH3, SH4, STRO-1, α -SMA, MAB1740
Cytokines et facteurs de croissance	IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR
Molécules d'adhésions	Intégrines α v β 3, α v β 5, chaînes α 1-5, α v, β 1, 3, 4, ICAM-1, 2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-sélectine, endoglin, CD44
Composants de la matrice extra cellulaire	Collagène de type I, III, IV, V, VI, fibronectine, laminine, hyaluronane, protéoglycanes

Tableau 10 : Phénotype des CSM de moelle osseuse en culture

Les CSM en culture expriment un nombre important de molécules qui pourraient expliquer le champ d'action très important de ces cellules. (Minguell, Erices et al. 2001)

L'avantage d'une telle avancée permettrait par une même thérapie de traiter une lésion ou une atteinte en même temps que les effets secondaires à cette lésion. C'est le cas notamment lors des traitements antitumoraux utilisant des composés très cytotoxiques en chimiothérapie ainsi que des rayonnements ionisants en radiothérapie.

III Stratégie de l'étude

Cette étude entre dans le domaine de la recherche de nouvelles thérapies pour le traitement des tissus sains lésés par une irradiation. Lors d'une irradiation accidentelle, l'évaluation des zones irradiées et des doses reçues sont nécessaires pour le diagnostic et la prescription d'un traitement optimal. En revanche, en radiothérapie, la zone irradiée est délimitée et la dose reçue est maîtrisée. Le but de l'irradiation thérapeutique est d'utiliser une dose suffisante pour tuer les cellules tumorales sans détruire les tissus voisins. Un surdosage entraîne une atteinte des tissus sains.

Globalement l'irradiation peut induire différentes atteintes au niveau de nombreux tissus. Par exemple, lors d'une irradiation accidentelle plusieurs syndromes radio-induits peuvent se développer simultanément en fonction de la dose reçue : le syndrome hématopoïétique, le syndrome cérébro-vasculaire et le syndrome gastro-intestinal. Ces phénomènes peuvent évoluer en syndrome d'atteinte multi-organes radio-induit (ou Multiple Organ Dysfunction Syndrome : MODS). Lors d'une irradiation thérapeutique, certains tissus et plus particulièrement l'intestin peuvent présenter une fibrose radio-induite à plus ou moins long terme. La combinaison de l'ensemble de ces atteintes rend le traitement de l'irradiation très complexe. Afin de contourner ces complications, certains traitements consistent à sous doser la radiothérapie afin d'épargner les tissus sains au risque de ne pas éradiquer toutes les cellules tumorales. La solution serait donc d'irradier la tumeur à une dose relativement forte et protéger les tissus sains des effets de l'irradiation. Plusieurs traitements ont été utilisés pour protéger les tissus des rayonnements ionisants. La majorité utilise des cytokines ou des facteurs de croissances mais ces molécules ont des effets limités et les traitements ne sont pas toujours adaptés aux atteintes observées. Les traitements du syndrome hématopoïétique utilisant du G-CSF semblent être de plus en plus efficaces alors que les dommages des organes à l'interface avec le milieu extérieur (tractus digestif, peau, poumons) restent toujours difficiles à traiter.

A ce jour, les mécanismes physiopathologiques commencent à être mieux appréhendés. 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 tissus sains contre les effets de l'irradiation.

Cette thèse se présente comme l'évaluation d'une stratégie de thérapie cellulaire pour le traitement de l'atteinte gastro-intestinale radio-induites. Cette approche innovante permet au travers des cellules souches mésenchymateuses (CSM) d'apporter des cellules saines

dans un environnement modifié par les rayonnements ionisants. Au cours de cette étude, nous avons utilisé un modèle développé par le Laboratoire de Thérapie Cellulaire et de Radiobiologie Accidentelle (LTCRA) consistant en une greffe de CSM de moëlle osseuse humaines dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID) irradiées.

Nos expériences ont nécessité :

- d'une part la mise au point d'une configuration d'irradiation sur le corps entier afin d'irradier tous les organes et tissus et de se rapprocher des protocoles de greffe de moëlle osseuse qui proposent d'éliminer les cellules souches endogènes,
- d'autre part la mise au point d'une configuration d'irradiation à forte dose, localisée à l'abdomen afin de provoquer des atteintes de la sphère digestive et de pouvoir induire un syndrome gastro-intestinal.

Dans un premier temps, nous avons observé et caractérisé les principaux effets des rayonnements ionisants sur le tractus gastro-intestinal. L'irradiation provoque des perturbations fonctionnelles et structurales sur l'intestin et le foie. Dans le but de supprimer ces effets, nous avons utilisé un traitement par injection de CSM humaines. Nous nous sommes ensuite intéressés à la recolonisation des tissus irradiés par les CSM humaines. Enfin, nous avons mesuré l'impact d'une greffe de CSM sur la reprise fonctionnelle et la régénération de l'intestin et du foie.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent des éléments nécessaires au développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique des atteintes tissulaires radio-induites : la thérapie cellulaire par greffe de CSM.

La démarche scientifique proposée s'organise en trois grands objectifs :

1. Premier objectif

Etude de l'implantation des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un tissu lésé par l'irradiation.

2. Second objectif

Etude de l'effet des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des lésions radio-induites du tractus gastro-intestinal.

3. Troisième objectif

Etude de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des atteintes hépatiques radio-induites.

IV Les cellules souches mésenchymateuses humaines dans le traitement des atteintes hépatiques et gastro-intestinales après irradiation.

1. Premier objectif

Etude de l'implantation des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un tissu lésé par l'irradiation.

Article 1 : Les cellules mésenchymateuses humaines migrent préférentiellement en zone irradiées dans la souris NOD/SCID.

Contexte de l'étude

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules capables de réparer un tissu ou de régénérer un organe. Il a été démontré que ces cellules, lorsqu'elles sont injectées dans un organisme, sont capables de migrer vers un site lésé. Dans cette étude, nous avons voulu étudier la biodistribution des CSM dans un organisme après une irradiation.

L'irradiation induit des lésions au niveau de différents tissus. En effet, les organes sont tous radiosensibles à un degré différent. Afin de répondre à la question suivante : « les CSM migrent-elles vers un site lésé par une irradiation ? », nous avons utilisé un modèle d'atteintes tissulaires. D'abord nous avons étudié l'implantation des CSM lors d'une atteinte multiorgane grâce à une irradiation de type corps entier. Ensuite, nous avons étudié leur implantation lors d'une plus forte atteinte au niveau du tractus gastro-intestinal grâce à un modèle d'irradiation abdominale.

Dans cette étude, les capacités de différenciation des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) humaines et leur implantation dans un modèle de souris immunodéficientes (NOD/SCID) irradiée ont été évaluées. Après isolement par leur propriété d'adhérence au plastique, les CSM ont été caractérisées *in vitro*. Ainsi, nous avons caractérisé notre greffon constitué de CSM multipotentes.

Le devenir *in vivo* des CSM humaines injectées 24 heures après irradiation a été étudié chez la souris NOD/SCID. Un premier groupe de souris a reçu une dose de 3,5 Gy au corps entier (TBI pour Total Body Irradiation) (source ^{60}Co 2,7 Gy / min). Un second groupe a reçu la même dose en TBI de 3,5 Gy additionnée d'une dose de 4,5 Gy au niveau de l'abdomen (AI pour Abdominale Irradiation), soit au total une dose de 8 Gy à l'abdomen.

Quatorze jours après irradiation, nous avons recherché les CSM humaines chez les souris au niveau de plusieurs organes. Dans un premier temps, les cellules sont recherchées dans

l'intestin, le rein, le foie, la rate, le cerveau, le poumon, le cœur, la moelle osseuse, le muscle, la peau et l'os après une irradiation de type TBI à une dose de 3,5 Gy. Ensuite, nous avons comparé l'implantation des CSM dans ces organes lors d'une TBI et l'implantation des CSM après une irradiation abdominale à 8 Gy.

Conclusion

Les cellules souches isolées expriment les marqueurs membranaires SH2 et SH3 spécifiques des CSM (Barry, Boynton et al. 2001; Dominici, Le Blanc et al. 2006). L'absence du marqueur CD45 confirme le bon phénotype des cellules du greffon et l'absence de contamination par des cellules hématopoïétiques. Aussi, nous avons montré qu'elles étaient capables de se différencier, *in vitro*, en cellules ostéocytaires, adipocytaires et chondrocytaires après induction par des milieux spécifiques. Ces premiers résultats valident la capacité de différenciation multiple des CSM utilisées dans cette étude.

De plus nos résultats montrent que ces cellules humaines injectées sont capables de migrer et de s'implanter chez la souris irradiée au niveau de plusieurs organes. Dans un premier temps, après une irradiation de type TBI nous avons démontré que les CSM s'implantaient dans tous les organes étudiés. Ainsi, nous avons validé notre système selon lequel les CSM s'implantent au niveau des sites lésés.

Deuxièmement, nous avons observé qu'après une irradiation abdominale (AI) le taux d'implantation des CSM augmente dans tous les organes surexposés. A contrario, dans ce même type d'irradiation, le taux d'implantation des CSM diminue dans la majorité des tissus externes au champ de l'irradiation abdominale (cerveau, muscle, peau et os). De plus, en ce qui concerne la localisation des cellules injectées au sein d'un organe, nos résultats montrent qu'au niveau de l'estomac, les CSM ont la capacité de s'implanter au niveau de deux zones fonctionnellement différentes. En effet, elles sont retrouvées dans la muqueuse et dans les couches musculaires stomacales et ne demeure donc pas dans l'endothélium uniquement.

Ainsi, l'implantation des CSM dépend du type d'irradiation dans la majorité des organes. D'après ces résultats les CSM migrent préférentiellement dans les sites ayant reçu la dose d'irradiation la plus importante. Elles paraissent donc être un bon candidat, utilisable dans la thérapie des irradiations.

Nous nous sommes posé la question de l'effet des CSM sur la fonction d'un organe. Nous nous sommes alors intéressés à l'utilisation des CSM au niveau de certaines zones radiosensibles de l'abdomen. Dans la partie qui suit, nous avons étudié l'effet des CSM sur un organe très radiosensible : l'intestin grêle, après une irradiation abdominale.

2. Second objectif

Etude de l'effet des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des lésions radio-induites du tractus gastro-intestinal.

Article 2 : Traitement des lésions radio-induites du tractus gastro-intestinal par injection de cellules souches mésenchymateuses humaines.

Contexte de l'étude

Dans cette étude, nous avons étudié les conséquences à court-terme (trois jours) d'une irradiation abdominale sur l'intégrité intestinale. Nous nous sommes intéressés aux effets d'une injection de CSM sur ces atteintes radio-induites.

Nous avons irradié des souris NOD/SCID en région abdominale à une dose de 8,5 Gy, dose pour laquelle les atteintes intestinales sont spontanément réversibles au cours du temps. En effet, plusieurs travaux montrent que les effets de l'irradiation sur l'intestin apparaissent à court-terme (Scanff, Souidi et al. 2004; Monti, Wysocki et al. 2005; Souidi, Scanff et al. 2007).

Afin de tester l'intégrité de l'épithélium intestinal nous nous sommes intéressés à différents paramètres : morphologiques et fonctionnels. Dans un premier temps l'aspect morphologique a été étudié par la quantification de la taille des villosités et de l'épaisseur des cryptes de Lieberkühn. Dans un second temps l'aspect fonctionnel a été étudié par l'étude des propriétés sécrétrices (transport du chlore) et d'absorption (activité de la pompe K^+/Na^+ -ATPase) de l'épithélium intestinal. De plus, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires mis en jeu à la suite de l'irradiation, en quantifiant l'apoptose et la prolifération des cellules épithéliales.

Une fois les effets caractérisés nous avons étudié le pouvoir des cellules souches mésenchymateuses sur la compensation des dysfonctionnements radio-induits.

Conclusion

Notre étude a montré qu'une irradiation abdominale de 8,5 Gy entraîne des atteintes structurales transitoires de l'intestin. Nous avons montré que l'irradiation perturbe l'auto-renouvellement de l'intestin. En effet, trois jours après irradiation, nous avons observé une atrophie de la muqueuse intestinale liée principalement à une diminution significative de la taille des villosités intestinales. L'augmentation de l'apoptose des cellules souches intestinales observée au niveau des cryptes pourrait expliquer la diminution de la taille des villosités. L'augmentation de l'épaisseur des cryptes et du processus de prolifération épithéliale indique que l'intestin est déjà en cours de régénération trois jours après

irradiation. L'atteinte fonctionnelle de l'intestin est caractérisée par une diminution de la capacité des cellules épithéliales à transporter des ions (réduction du transport du chlore et de l'activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$).

Nos résultats montrent que trois jours après irradiation les CSM humaines s'implantent dans l'intestin, à proximité des cryptes (de façon isolées), au niveau de la *lamina propria* ainsi que dans le mésentère (sous forme d'amas cellulaires). Nous avons vu que les CSM implantées rétablissent l'intégrité intestinal en accélérant son processus d'auto-renouvellement. En effet, nous avons observé une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium à un niveau supérieur à celui observé chez les témoins. Aussi, nous avons montré que l'injection de CSM restaure le transport des électrolytes et l'activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$. Nos travaux ont montré que les CSM protègent l'intestin en limitant l'apoptose des cellules souches endogènes et en favorisant la prolifération épithéliale.

L'obtention de tels résultats constitue un encouragement quand à l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire suite à une exposition aux rayonnements ionisants. Les effets des rayonnements sur l'intestin peuvent entraîner d'autres effets sur d'autres tissus. L'intestin est physiologiquement lié au foie qui est un organe central dans plusieurs systèmes physiologiques et métaboliques (détoxication, métabolisme, digestion, inflammation). Nous avons émis l'hypothèse que les effets de l'irradiation sur l'intestin entraînent des effets sur le foie. C'est la raison pour laquelle dans la partie suivante nous étudions les conséquences de l'irradiation abdominale à forte dose sur le foie et la capacité des CSM à contrecarrer ses effets.

3. troisième objectif

Etude de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour le traitement des atteintes hépatiques radio-induites.

Article 3 : Les Cellules Souches Mésenchymateuses humaines contribuent à la restauration de l'intégrité hépatique après irradiation de la sphère abdominale.

Contexte de l'étude :

Dans cette étude, il s'agit de démontrer la capacité des CSM à restaurer les conséquences d'une irradiation abdominale sur le foie. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps les effets sur le foie d'une irradiation abdominale. Nous avons utilisé une forte dose de 10,5 Gy pour induire des atteintes dans la zone irradiée. Nous avons étudié en parallèle les effets de l'irradiation sur un autre organe : le rein, connu pour être radiorésistant.

Afin de connaître la cinétique des effets dus aux rayonnements ionisants, sur le foie et le rein, nous avons étudié différents marqueurs biochimiques plasmatiques du premier au sixième jour suivant l'irradiation. Afin d'étudier l'intégrité du foie, nous avons dosé les taux d'ASAT (ASpartate Amino-Transférase) et d'ALAT (Alanine Amino-Transférase) dans le sang. La fonction hépatique est estimée par le dosage de l'albumine et du cholestérol au niveau plasmatique. Enfin, l'étude des taux plasmatiques de l'urée et de la créatinine nous a permis d'évaluer la fonction et l'intégrité du rein. De plus, nous avons étudié la mort cellulaire au niveau hépatique en utilisant la technique TUNEL[®]. Enfin, nous avons déterminé le taux des acides biliaires au niveau du foie afin de mettre en évidence une éventuelle perturbation du cycle entérohépatique.

Conclusion

Les résultats ont montré une augmentation des taux plasmatiques d'ASAT et d'ALAT à partir du cinquième jour après irradiation. Par contre, les taux plasmatiques d'albumine et de cholestérol reflétant la fonction hépatique sont très nettement diminués. Ainsi, l'irradiation entraîne une légère hépatotoxicité après cinq jours. Le dosage des taux d'urée et de créatinine ne montre pas de variation. Donc l'irradiation n'induit pas de modifications fonctionnelles au niveau rénal après cinq jours. De plus, nous avons étudié l'apoptose dans le foie cinq jours après irradiation abdominale. Nous avons alors observé une augmentation du nombre de cellules mortes autour des vaisseaux et des canaux biliaires. En résumé, l'irradiation entraîne une atteinte hépatique en induisant la mort des cellules du foie et entraînant une augmentation du taux plasmatique des transaminases. Notons que dans

cette configuration d'irradiation, le foie est inclus en très petite proportion dans le champ d'irradiation. Cette observation suggère que ce sont les effets de l'irradiation sur l'intestin qui ont pour conséquences des atteintes au niveau foie. Par contre, l'irradiation n'induit pas de dysfonctionnement apparent du rein. En effet, nous n'avons pas observé de variation des taux plasmatiques d'urée et de créatinine.

Notre étude démontre que l'injection de CSM humaines 5 heures après une irradiation abdominale à 10,5 Gy permet de rétablir certains dommages radio-induits. En effet, les CSM restaurent les taux plasmatiques d'ASAT et d'ALAT à un niveau physiologique normal cinq jours après irradiation et diminuent la mort cellulaire au niveau du foie. Par contre, cinq jours après irradiation, les CSM ne permettent pas la restauration de l'albuminémie et la cholestérolémie à un taux physiologique normal. De plus, nous avons observé que dans cette configuration d'irradiation les cellules ne s'implantent pas dans le foie au bout de cinq jours. Cinq jours après irradiation, bien que les CSM ne permettent pas une récupération fonctionnelle hépatique, elles sont capables de rétablir l'intégrité du foie sans s'y implanter. Ces résultats nous permettent de suggérer que ce sont les effets des CSM sur l'intestin qui permettent une restauration de l'intégrité hépatique.

Cinq jours après irradiation, nous avons mesuré une augmentation du taux d'un acide biliaire hydrophobe au niveau du foie : l'acide déoxycholique (ADC) connu comme cytotoxique (Hofmann 1999). Or l'ADC provient de l'intestin et fait partie du cycle entéro-hépatique. L'irradiation a donc perturbé le cycle entéro-hépatique suite à la lésion de l'intestin, ce qui a entraîné un dysfonctionnement du transport des acides biliaires.

Notre étude montre que l'injection de CSM humaines permet de restaurer le taux d'ADC hépatique à un niveau physiologique normal et donc de limiter l'apoptose des cellules du foie.

L'importance et l'originalité de cette étude viennent du fait que les CSM montrent un effet bénéfique sur le foie sans pour autant s'y implanter. Nous nous sommes alors demandés si dans une autre situation les CSM pouvaient avoir un effet direct sur le foie.

Article 4 : L'injection de cellules souches mésenchymateuses humaines diminue l'atteinte hépatique radio-induite.

Contexte de l'étude :

Dans cette étude, il s'agit de démontrer la capacité des CSM à restaurer les effets sur le foie d'une irradiation corporelle totale à une dose de 3,5 Gy.

L'irradiation corporelle totale permet d'irradier la totalité du foie et donc d'étudier l'effet direct des CSM après implantation dans cet organe. De plus, cette configuration d'irradiation favorise l'implantation des CSM. Ainsi, les effets observés seront directement dus aux cellules injectées. Précédemment, nous avons entrepris une étude des effets sur des temps assez courts (cinq jours). Dans cette nouvelle étude nous allons jusqu'à 15 jours afin de laisser aux CSM le temps de s'implanter dans le foie. En effet, nos précédents travaux montrent, dans la plupart des organes, une implantation des CSM au bout de 15 jours.

Dans un premier temps nous avons caractérisé les effets de l'irradiation sur le foie en dosant l'ASAT et l'ALAT plasmatique. En parallèle, nous avons étudié les effets de l'irradiation sur un organe témoin : le rein connu comme radiorésistant. Après injection de CSM, nous avons étudié la cinétique d'implantation des cellules dans le foie à partir du troisième jour suivant l'irradiation. La détection de leur présence a été réalisée par PCR quantitative puis leur localisation au sein d'un tissu a été faite par immunomarquage de la bêta-2-microglobuline. Ensuite, nous avons étudié spécifiquement leurs effets sur le foie après exposition aux rayonnements ionisants.

Conclusion

L'irradiation induit une augmentation des taux d'ASAT et d'ALAT plasmatique, une légère diminution du taux d'urée et un maintien du taux de créatinine. Une irradiation TBI de 3,5 Gy entraîne une légère hépatotoxicité mais pas de toxicité au niveau du rein.

Après une injection de cellules souches mésenchymateuses humaines, nous avons constaté que contrairement à ce qu'il se passe lors d'une irradiation abdominale, les cellules s'implantent dans le foie. L'implantation débute dès le troisième jour qui suit l'irradiation et est maximale le quinzième jour.

Les CSM permettent de maintenir des taux normaux de transaminases, d'urée et de créatinine. Donc, à deux configurations différentes (locale et totale) et à des temps différents (trois jours et 15 jours) les CSM ont une action sur les paramètres biochimiques. L'ensemble de ces données suggère un rôle protecteur direct des CSM sur le foie après irradiation. Pour la première fois, dans le cas de l'irradiation, nous pouvons voir des cellules

s'implanter dans le foie et avoir des effets bénéfiques sur les atteintes hépatiques. Ces résultats et ceux de l'article précédent montrent que les effets concernent aussi bien les cellules endothéliales que les cellules hépatiques.

Donc, notre étude montre que, lors d'une irradiation, les cellules souches mésenchymateuses humaines peuvent avoir des effets directs ou indirects sur le foie en fonction des lésions engendrées et du temps qui suit l'irradiation. Ces résultats ouvrent une nouvelle voie thérapeutique pour diminuer les effets secondaires induits lors d'une irradiation.

V Discussion

L'irradiation accidentelle d'un individu peut engendrer des effets biologiques délétères au niveau de plusieurs organes et tissus. De la même manière, l'irradiation thérapeutique d'une tumeur peut, dans le cas d'un surdosage ou d'une erreur de paramétrage, entraîner une atteinte des tissus sains environnants. Par exemple, lors d'une irradiation au niveau de l'abdomen, une des complications majeures est l'atteinte du tractus gastro-intestinal. En effet, l'intestin est un tissu relativement sensible à l'irradiation et l'atteinte de ce tissu peut entraîner des effets sur d'autres organes.

Actuellement, les traitements thérapeutiques proposés ne sont pas adaptés à toutes atteintes physiopathologiques pouvant être induites par l'irradiation. Ainsi, ces dernières années de nouvelles stratégies thérapeutiques ont vu le jour (se reporter au chapitre 3.1.3. Traitements du tractus gastro-intestinal). Parmi elles, la thérapie cellulaire fait actuellement ses preuves sur de multiples pathologies aiguës ou chroniques comme l'aplasie médullaire (Gorin, Aegerter et al. 1990), l'ostéogénèse imparfaite (Horwitz, Gordon et al. 2002) ou la réaction du greffon contre l'hôte (Le Blanc, Rasmusson et al. 2004). Lors d'une irradiation aiguë certains organes dits radio-sensibles sont susceptibles d'entraîner de graves complications pouvant induire la mort d'un individu. La nécessité d'un traitement thérapeutique adapté aux effets des irradiations accidentelles ou médicales (radiothérapie) justifie l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Les CSM sont des cellules souches multipotentes. Elles possèdent de nombreuses capacités, parmi lesquelles, le pouvoir de migrer *in vivo* et de s'implanter dans différents organes. Notre étude porte sur l'utilisation de ces cellules pour le traitement des atteintes du tractus gastro-intestinal et du foie après irradiation. Pour cela, il est indispensable d'étudier l'implantation des CSM après irradiation et de connaître leurs effets biologiques sur les organes les plus radiosensibles contenus dans la sphère abdominale.

Implantation des CSM dans la sphère abdominale

L'injection systémique de CSM a pour résultat un adressage non spécifique au poumon dans les heures qui suivent l'injection, puis vers le foie et le rein. Au delà de 48 heures, l'adressage des CSM est spécifique à une lésion (Allers, Sierralta et al. 2004). L'implantation non spécifique dans le poumon observée à court terme (24 heures) par plusieurs équipes peut être liée au rôle de filtre physiologique de cet organe (Van der Meeren, Monti et al. 2005). En effet, il est possible d'expliquer ces résultats par la taille des CSM humaines relativement grande par rapport aux capillaires pulmonaires de la souris.

Ainsi les cellules seraient piégées physiquement dans ces petites structures ce qui rendrait leur implantation non spécifique. A ce sujet, il a été démontré qu'après une injection intracardiaque, les CSM n'étaient pas piégées dans le poumon et qu'elles s'implantaient principalement dans le cœur et le rein (Chen, Jiang et al. 2004). En revanche, la biodistribution des CSM ne varie pas suivant les modes d'injection systémique ou intra péritonéal (Francois, Bensidhoum et al. 2006).

Dans le cas d'une irradiation des travaux ont montré une implantation dans les tissus lésés chez le primate (Chapel, Bertho et al. 2003). Une étude sur la souris a montré que l'implantation des CSM est proportionnelle à la dose d'irradiation (Francois, Bensidhoum et al. 2006). Ces travaux montrent que les CSM humaines ont la capacité de s'implanter dans un organisme sain ou lésé.

Dans notre étude nous avons étudié l'implantation des CSM au niveau des tissus de la souris NOD/SCID irradiée. Dans un premier temps nous avons démontré qu'après une irradiation de type corps entier (TBI) les CSM s'implantent dans tous les organes dans lesquels elles ont été recherchées (estomac, intestin, rein, foie, rate, cerveau, poumon, cœur, moelle osseuse, muscle, peau et os). Nous avons alors observé qu'après un surdosage de la sphère abdominale le profil de biodistribution était modifié et que l'implantation des CSM augmentait dans les organes de la sphère abdominale. C'est résultats rejoignent ceux précédemment décrits par notre équipe (Francois, Bensidhoum et al. 2006). En effet, cette étude démontre que l'irradiation induit des lésions tissulaires et que les CSM injectées s'implantent préférentiellement au niveau de ces zones.

Lors d'une irradiation abdominale, nous avons montré que les CSM ne s'implantaient pas uniquement dans la zone la plus irradiée. En effet, les cellules s'implantent également dans des organes situés en dehors de la sphère abdominale et ayant reçu une dose d'irradiation de 3.5 Gy (Francois, Bensidhoum et al. 2006). Quinze jours après une irradiation abdominale, les CSM injectées s'implantent relativement bien dans les poumons et la moelle osseuse (Mouiseddine, Francois et al. 2007). De la même manière, François et al. ont montré qu'après une irradiation de la patte, les CSM s'implantent dans le cerveau (Francois, Bensidhoum et al. 2006). L'irradiation localisée entraîne un effet abscopal à quinze jours sur des tissus non irradiés (Van der Meeren, Monti et al. 2005), un tel phénomène pourrait induire le recrutement des CSM vers ces sites.

Les CSM sont décrites comme des cellules multipotentielles, capables de se différencier *in vitro* en plusieurs lignées cellulaires différentes. De plus leurs capacités de transdifférenciation ont récemment été mises en évidence. Il y a quelques années, les recherches étaient focalisées sur l'hypothèse selon laquelle les CSM injectées pourraient remplacer, après différenciation, les cellules du tissu lésé. Une telle capacité aurait pu

fournir des explications quant à l'amélioration clinique observée dans de nombreux cas pathologiques traités par des CSM. Cependant, le faible taux d'implantation constaté dans toutes les études entreprises remet en question cette hypothèse. En effet, bien que dans notre étude les CSM s'implantent dans l'intestin après une irradiation abdominale, leur pourcentage reste faible (0,17 %) par rapport au nombre de cellules de l'organe. De ce fait, il est difficilement concevable d'attribuer l'importance des effets observés au seul phénomène de différenciation d'un petit nombre de CSM. Ceux sont autant de raisons qui font que la tendance actuelle concernant l'effet des CSM s'oriente plutôt vers une action paracrine de ces dernières. Néanmoins, il est important de préciser que suivant l'étude les cellules injectées sont toujours recherchées dans les mêmes structures alors qu'elles pourraient s'être implantées en grand nombre dans d'autres structures. En effet, une étude montre que les CSM s'implantent bien dans les ganglions mésentériques après injection dans le cadre d'un traitement anti GVHD (Ringden, Uzunel et al. 2006). Des travaux ont montrés que 15 jours après irradiation, l'intestin de rongeur était complètement régénéré, que les animaux soient traités ou non avec des CSM. En présence de CSM, il y a une accélération significative du processus de régénération (Semont, Francois et al. 2006). Donc, afin de mieux connaître le mode d'action des CSM nous nous sommes focalisés à des temps très courts après irradiation. En effet, il a été rapporté, chez le rat, qu'après une irradiation abdominale, les effets biologiques sur l'intestin sont majeurs au bout du troisième jour qui suit l'irradiation (Linard, Griffiths et al. 1997; Scanff, Souidi et al. 2004; Souidi, Scanff et al. 2007).

Effets et modes d'action des CSM sur l'intestin

Lors d'une irradiation abdominale, l'intestin subit plusieurs modifications fonctionnelles et structurales. Une des atteintes que nous avons observée est une diminution de la fonction de sécrétion de l'épithélium. En effet, d'après une étude *ex vivo*, le transport des électrolytes par l'intestin est diminué suite à l'irradiation. Une autre atteinte fonctionnelle observée lors d'une telle irradiation est la diminution de l'activité enzymatique de la pompe à sodium Na^+/K^+ ATPase. Cette anomalie entraîne une diminution du transport actif des glucides et des protéines au niveau de la lumière intestinale. De plus, nous avons aussi observé les modifications structurales classiques liées à l'irradiation qui sont une perte de structure des villosités et des cryptes. Il est à noter que ces dernières modifications sont transitoires et ne concernent pas la totalité de la longueur intestinale. Ces anomalies semblent être dues à une mort des cellules souches de l'intestin situées dans les cryptes qui n'assureraient plus leur rôle dans le renouvellement (Semont, Francois et al. 2006).

Des travaux se sont déjà intéressés aux effets des CSM sur l'intestin. Dans une étude clinique, Le Blanc et al. ont démontré une restauration des dysfonctionnements gastro-intestinaux chez des patients présentant une résistance au traitement anti-GVH sur l'intestin et le foie. En utilisant des CSM sur une base de collagène, d'autres travaux ont permis de mettre en évidence une régénération partielle du tissu musculaire de l'intestin (Hori, Nakamura et al. 2002). Pour la première fois, nous avons démontré une récupération fonctionnelle de l'intestin après une injection de cellules souches mésenchymateuses. En effet, après un traitement CSM sur des souris irradiées à l'abdomen, les fonctions de sécrétion et d'absorption intestinale sont rétablies. En ce qui concerne la mort des cellules, des travaux précédents se sont intéressés au pouvoir antiapoptotique des CSM sur le rein (Humphreys and Bonventre 2008), le cœur (Nagaya, Kangawa et al. 2005; Mirotso, Zhang et al. 2007; Ventura, Cavallini et al. 2008) et le cerveau (Benvenuti, Saccardi et al. 2006; Liu, Honmou et al. 2006) mais aucune étude n'a montré cet effet au niveau de l'intestin. Notre étude montre une diminution de l'apoptose radioinduite des cellules souches intestinales après une injection systémique de CSM. Ceci pourrait expliquer, comme nous l'avons déjà présenté dans des études précédentes, la récupération de la structure crypto/villositaire intestinale après l'injection de CSM (Semont, Francois et al. 2006). D'après nos observations, les CSM stimulent la prolifération au niveau de l'intestin et contribuent au rétablissement de l'homéostasie cellulaire ce qui pourrait expliquer la restauration fonctionnelle du tissu.

L'intestin est un organe à renouvellement rapide et constant, ce qui fait de lui un site très sensible aux rayonnements ionisants (Potten 2004). En étant ainsi radiosensible il appartient, comme nous l'avons vu précédemment, aux tissus radio-lésés dans lesquels les CSM injectées s'implantent préférentiellement. L'implantation des CSM au site lésé peut être due aux cytokines inflammatoires libérées après l'irradiation (Grimm, Nickerson et al. 2001; Van der Meeren, Mouthon et al. 2004; Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Il a été démontré que les CSM exprimaient à leur surface de nombreux récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance (Minguell, Erices et al. 2001). De nombreux travaux montrent qu'une irradiation de l'intestin entraîne une libération de cytokines due à l'inflammation du tissu (Van der Meeren, Monti et al. 2005). Or, les CSM possèdent différents récepteur de type CC et CXC (pour Cystéine-Cystéine et Cystéine-X-Cystéine) qui leur permettent de migrer vers un organe suivant les cytokines qu'il produit. Ainsi, il a été démontré que les CSM migraient vers la moelle osseuse *via* la reconnaissance du SDF-1 par le récepteur CXCR-4 (Shi, Li et al. 2007). De la même manière les CSM expriment le CCR10 (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005) et le CCR9 qui leur permettrait de migrer vers l'intestin et le CCR1 qui leur permettrait de rejoindre un site d'inflammation

(Chamberlain, Fox et al. 2007). Dans notre étude, nous avons vu qu'après une irradiation abdominale les CSM s'implantent dans les tissus appartenant à cette zone (Francois, Bensidhoum et al. 2006). A trois jours, les cellules sont retrouvées dans l'intestin au niveau de la *lamina propria* près des cryptes. En revanche, dans notre cas, la morphologie des cellules implantées ne démontre pas de différenciation à ce temps là. De plus, il est à noter que le taux d'implantation est relativement faible (< 0,017 %) pour permettre une régénération par remplacement des cellules mortes.

En considérant l'ensemble de ces observations, notre hypothèse consiste à expliquer l'effet des CSM par une action paracrine, *via* des facteurs solubles, sur les cellules souches de l'intestin. Une des hypothèses concernant la niche de l'intestin est qu'elle pourrait être définie par les myofibroblastes situés autour des cryptes et qui auraient une action sur les cellules souches endogènes (Potten and Loeffler 1990). Les CSM pourraient avoir une action indirecte sur les cellules souches en stimulant les myofibroblastes. A ce sujet il a été démontré que lors d'une greffe de moelle osseuse, des cellules médullaires se différenciaient en myofibroblastes (Campbell, Efendy et al. 2000). De plus, les CSM ont un effet bénéfique sur le cœur en agissant sur la niche de ce tissu (Mazhari and Hare 2007). Les CSM sont décrites comme des médiateurs trophiques (Caplan and Dennis 2006). Ce sont des cellules qui expriment un très large éventail de cytokines et de facteurs de croissances tels que les interleukines 1, 6, 7, 8, 11, 12, 14 et 15, le GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, SCF et FLT-3 ligand (Haynesworth, Baber et al. 1996; Majumdar, Thiede et al. 1998). Dans notre étude, les effets bénéfiques des CSM sont observés à court terme (trois jours). A plus long terme (15 jours), l'intestin retrouve une fonction et une structure normale. Néanmoins, il nous est paru important de connaître les conséquences d'une atteinte de l'intestin sur d'autres organes et le recours possible au potentiel des CSM. Le foie est physiquement et physiologiquement lié à l'intestin, ce qui fait de cet organe une cible potentielle lors d'une irradiation thérapeutique ou accidentelle.

Effets et modes d'action des CSM sur le foie

Dans la partie précédente nous avons caractérisé les effets de l'irradiation sur l'intestin. D'autres études ont déjà démontré qu'une irradiation forte dose de 8 Gy en corps entier entraînait des effets sur le foie associés à des atteintes intestinales (Scanff, Souidi et al. 2004; Souidi, Scanff et al. 2007). Les effets sur l'intestin sont observés au troisième jour après irradiation alors que les effets sur le foie sont visibles au-delà du troisième jour. Notre hypothèse de travail est que lors d'une irradiation abdominale, l'atteinte de l'intestin entraîne des effets délétères sur le foie. De ce fait, notre stratégie d'étude sur le foie se place au cinquième jour après irradiation. En effet, après une étude cinétique faite après

irradiation et allant jusqu'à six jours, nous avons observé une augmentation du taux des transaminases plasmatiques (ASAT et ALAT) le cinquième jour. Le taux de transaminases dans le sang est le premier indicateur de souffrance hépatique. De plus, à ce même temps, nous avons observé une augmentation de l'apoptose au niveau du tissu hépatique. D'après ces observations il semblerait que ce soit les atteintes de l'intestin observées le troisième jour après irradiation qui entraîneraient une perturbation de la physiologie hépatique le cinquième jour. Donc l'atteinte du foie serait plutôt due à l'atteinte de l'intestin qu'à l'irradiation. D'autant plus que dans notre configuration d'irradiation la portion de foie irradiée correspond à un pourcentage très faible du tissu.

Nous avons déjà démontré que les CSM rétablissent les dommages radio-induits engendrés sur l'intestin. Nous nous sommes alors demandé si les atteintes du foie pouvaient être restaurées par une injection de CSM. Nous avons constaté une amélioration de l'intégrité hépatique après traitement par CSM. En effet, nous avons observé un retour à la normale des transaminases au niveau du plasma et une diminution de l'apoptose au niveau du foie. En revanche, nous n'avons pas constaté de récupération fonctionnelle sur une durée de cinq jours. En effet, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'albuminémie et de la cholestérolémie après traitement par les CSM. Ce serait probablement par le rétablissement de l'intégrité intestinale que l'intégrité hépatique serait restaurée. En effet, trois jours après irradiation la structure et la fonction de l'intestin sont affectées. Or l'intestin joue aussi un rôle dans la réabsorption des acides biliaires. Dans un cas physiologique normal, les acides biliaires hydrophobes absorbés par l'intestin entrent dans le cycle entérohépatique et sont ensuite régulés par le foie. Notre hypothèse est que la dérégulation de la réabsorption des acides biliaires au niveau intestinal à trois jours entraînerait un dérèglement du cycle entérohépatique et donc une accumulation d'acides biliaires hydrophobes dans le foie à cinq jours. En effet, nos résultats montrent que, cinq jours après irradiation, le taux d'acide déoxycholique (acide biliaire hydrophobe) augmente nettement dans le foie. Des études ont déjà démontré la cytotoxicité de cette molécule (Hofmann 1999) ce qui expliquerait l'apoptose hépatique et la libération des enzymes cytosoliques (transaminases). Après irradiation abdominale et traitement, les CSM s'implantent dans l'intestin et permettent sa restauration et notamment sa fonction de transport des acides biliaires. Le cycle entéro-hépatique est alors rétabli et il n'y a plus d'accumulation d'acides biliaires toxiques dans le foie. Bien que quinze jours après une irradiation totale nous ayons observé une implantation optimale des CSM dans le foie, aucune implantation n'est mise en évidence cinq jours après une irradiation forte dose à l'abdomen. Donc, dans ces conditions d'irradiation, les effets des CSM observés sur le foie sont des effets indirects passant par les effets bénéfiques observés sur l'intestin.

Afin de savoir si les CSM pouvaient avoir un effet direct sur le foie nous avons entrepris de changer de configuration d'irradiation. Nous avons effectué une irradiation de type corps entier qui inclut donc la totalité du foie. Des travaux ont montré qu'après une hépatectomie partielle les CSM injectées à un rongeur s'implantent dans le foie à quatre, six et douze semaines et qu'une partie d'entre elles se différenciaient en hépatocytes (Aurich, Mueller et al. 2007; di Bonzo, Ferrero et al. 2008). Dans notre étude, nous avons voulu savoir si les CSM avaient des effets bénéfiques sur le foie lésé. Des travaux précédents ont montré qu'une irradiation de type corps entier chez la souris NOD/SCID induisait un processus inflammatoire (source : Thèse François S. 2006). De plus, une augmentation de la mort cellulaire au niveau de l'intestin et du foie est associée à l'inflammation. C'est la cytolysse des cellules du foie qui entraîne une augmentation des paramètres plasmatique ASAT et ALAT, qui reflètent une souffrance hépatique. Après injection de CSM, les paramètres biochimiques sont restaurés et les CSM sont détectées dans le foie chez 20 % des animaux à trois jours puis chez 100 % des animaux quinze jours après l'irradiation. Dans tous les cas les cellules sont majoritairement localisées autour des vaisseaux sanguins. Ces résultats montrent que les CSM ont un effet direct sur le foie. D'après la localisation périvasculaire des CSM au niveau du foie, leurs effets bénéfiques impliqueraient une protection de l'endothélium. En effet, dans des travaux non publiés nous avons montré *in vitro* que l'irradiation induit l'expression de facteurs pro-inflammatoires. Nous avons mis en évidence une augmentation de ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation d'expression du gène de la 5-lipooxygénase (ALOX5). L'intégrine ICAM-1 intervient dans la margination des leucocytes permettant le processus inflammatoire et la 5-lipooxygénase est impliquée dans la synthèse des leucotriènes intervenant dans la promotion de l'inflammation. Les CSM sont capables *in vitro* d'inhiber l'expression de ces deux molécules ce qui suggère qu'elles pourraient avoir un effet anti-inflammatoire *in vivo* par action sur les vaisseaux. L'inhibition de l'inflammation entraînerait une diminution de la mort des cellules hépatiques et donc une diminution de la libération d'ASAT et d'ALAT au niveau plasmatique.

Nos résultats montrent que les CSM s'implantent dans le foie lors d'une irradiation totale et non pas lors d'une irradiation abdominale. Donc, non seulement l'implantation des CSM dépend de la dose d'irradiation mais elle dépend aussi du volume d'organe irradié.

Dans tous les cas, les CSM ont un effet bénéfique direct sur le foie ou indirect *via* leur action sur l'intestin. D'après notre étude, les cellules semblent s'adapter au type d'atteintes rencontrées et migrent puis agissent en fonction de l'importance des lésions.

VI Conclusion générale

Les CSM humaines de moelle osseuse sont des cellules multipotentes qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur un organisme irradié. En effet, les résultats précédents montrent que ces cellules migrent et s'implantent au niveau de différents organes suivant le champ d'irradiation. Plusieurs études montrent qu'après injection, les CSM sont retrouvées dans les tissus les plus irradiés. C'est ainsi que lors d'une irradiation abdominale, les cellules greffées sont retrouvées dans l'intestin. Les CSM sont capables de restaurer en 3 jours les effets induits par l'irradiation sur l'intestin. Elles ont donc une action directe sur la fonction et la structure de l'intestin. Une irradiation abdominale induit en plus des effets sur le foie. Il s'avère que ces modifications soient dues aux atteintes intestinales telles que la perturbation du cycle entérohépatique. En effet, nous avons observé que l'atteinte du foie était liée à une augmentation de la concentration de molécules toxiques (acides biliaires hydrophobes) dans ce tissu. Notre étude démontre qu'une injection de CSM permet de restaurer l'intégrité du foie. Cependant, puisque les cellules injectées ne sont pas retrouvées dans le foie, il semblerait qu'elles aient un effet indirect sur cet organe. En effet, nous avons observé que l'amélioration de l'état du foie étaient lié à une diminution du taux d'acides biliaires hydrophobes libérés par l'intestin et donc à la restauration du cycle entérohépatique.

Nos travaux montrent que l'irradiation abdominale induit des lésions au niveau de l'intestin et du foie respectivement à trois et cinq jours. Après une injection de CSM, celles-ci restaurent l'intestin en trois jours en s'y implantant et rétablissent les effets observés sur le foie au cinquième jour. Dans ce cas, l'effet des CSM sur le foie est un effet indirect, consécutif à la restauration de l'intestin. Lors d'une irradiation de type corps entier, l'intestin et le foie sont lésés dès le troisième jour. Après traitement, l'intestin et le foie sont colonisés par les CSM et sont respectivement restaurés au bout de trois et sept jours. L'implantation des CSM est maximale au quinzième jour et l'effet bénéfique des cellules injectées persiste à ce temps d'étude. Dans ce dernier cas, l'effet des CSM sur le foie est un effet direct, lié à leur implantation dans le tissu. Le processus majeur mis en évidence par notre étude est l'induction de l'apoptose au niveau de l'intestin et du foie après irradiation. Les CSM ont la capacité d'inhiber l'apoptose au niveau de ces deux tissus.

Pour la première fois, nous avons démontré un effet bénéfique des CSM sur l'intestin et sur le foie. Les CSM présentent un bénéfice thérapeutique pour le traitement des atteintes des tissus sains lors d'une irradiation locale comme en radiothérapie. De plus, les CSM sont utilisables pour le traitement des atteintes tissulaires liées à une irradiation de la totalité du corps, ce qui est souvent le cas lors d'un accident. Nos résultats ouvrent des perspectives

pour l'avenir des traitements régénératifs, d'autant plus que le syndrome gastro-intestinal est le premier symptôme observé lors d'une irradiation. Les CSM ont aussi fait leurs preuves sur d'autres systèmes comme la peau, le muscle ou encore le système nerveux. Les résultats de notre équipe ont contribué à l'obtention d'une autorisation de traitement compassionnel de plusieurs victimes de rayonnements. Ces dernières années, les CSM ont permis de traiter une victime d'irradiation (Lataillade, Doucet et al. 2007). Les cellules lui ont permis de retrouver l'usage de sa main. Les CSM ont permis de traiter une autre victime après un accident lié à la manipulation d'une source radioactive. Après une injection de CSM, la victime a retrouvé la structure musculaire et le revêtement épidermique de son bras. Enfin, dernièrement les CSM ont été utilisées suite aux surdosages de radiothérapie à Epinal (Peiffert, Simon et al. 2007). Trois patients dans un état critique ont été traités après une radiothérapie à l'abdomen. Les premières observations montrent un effet antalgique et anti-hémorragique des CSM, ce qui va dans le sens d'une amélioration clinique des patients.

Au début du XXI^{ème} siècle les cellules souches mésenchymateuses humaines réussissaient à conquérir les esprits en recherche fondamentale par leurs capacités multiples (prolifération, expression, différenciation). Sept ans plus tard elles arrivent aussi bien à convaincre les professionnels de la santé que la scène médiatique à travers plusieurs succès en médecine régénérative. La thérapie cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses humaines est aujourd'hui la solution la plus efficace pour le traitement des lésions tissulaires liées à l'irradiation.

VII Bibliographie

- (2000). "UNSCEAR 2000. The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation." Health Phys **79**(3): 314.
- Akiyama, Y., C. Radtke, et al. (2002). "Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells." Glia **39**(3): 229-36.
- Alison, M. R., R. Poulson, et al. (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." Nature **406**(6793): 257.
- Allay, J. A., J. E. Dennis, et al. (1997). "LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors." Hum Gene Ther **8**(12): 1417-27.
- 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.
- Amado, L. C., K. H. Schuleri, et al. (2006). "Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy." J Am Coll Cardiol **48**(10): 2116-24.
- Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.
- Andreoletti, M., J. C. Pages, et al. (1997). "Preclinical studies for cell transplantation: isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction." Hum Gene Ther **8**(3): 267-74.
- 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.
- Asahara, T. (2007). "[Endothelial progenitor cells for vascular medicine]." Yakugaku Zasshi **127**(5): 841-5.
- Ash, D. (2007). "Lessons from Epinal." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(8): 614-5.
- Askari, A. T., S. Unzek, et al. (2003). "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy." Lancet **362**(9385): 697-703.
- Asonuma, K., J. C. Gilbert, et al. (1992). "Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia." J Pediatr Surg **27**(3): 298-301.
- Aurich, I., L. P. Mueller, et al. (2007). "Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers." Gut **56**(3): 405-15.
- Azizi, S. A., D. Stokes, et al. (1998). "Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3908-13.
- Baksh, D., L. Song, et al. (2004). "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy." J Cell Mol Med **8**(3): 301-16.
- Ballarini, F., M. Biaggi, et al. (2002). "Nuclear architecture and radiation induced chromosome aberrations: models and simulations." Radiat Prot Dosimetry **99**(1-4): 175-82.
- Ballarini, F. and A. Ottolenghi (2003). "Chromosome aberrations as biomarkers of radiation exposure: modelling basic mechanisms." Adv Space Res **31**(6): 1557-68.
- Barry, F., R. Boynton, et al. (2001). "The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(2): 519-24.
- Barry, F., R. E. Boynton, et al. (2001). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components." Exp Cell Res **268**(2): 189-200.
- Baue, A. E. (1996). "MOF/MODS, SIRS: an update." Shock **6 Suppl 1**: S1-5.

- 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.
- Benvenuti, S., R. Saccardi, et al. (2006). "Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1." Exp Cell Res **312**(13): 2592-604.
- 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., J. Frick, et al. (2005). "Comparison of autologous cell therapy and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) injection vs. G-CSF injection alone for the treatment of acute radiation syndrome in a non-human primate model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **63**(3): 911-20.
- Berthod, F. and O. Damour (1997). "In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns." Br J Dermatol **136**(6): 809-16.
- Bhakta, S., P. Hong, et al. (2006). "The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation." Cardiovasc Revasc Med **7**(1): 19-24.
- Bhatia, R. and J. M. Hare (2005). "Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine." Congest Heart Fail **11**(2): 87-91; quiz 92-3.
- 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.
- Bianco, P. and P. Gheron Robey (2000). "Marrow stromal stem cells." J Clin Invest **105**(12): 1663-8.
- Black, I. B. and D. Woodbury (2001). "Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons." Blood Cells Mol Dis **27**(3): 632-6.
- Bone, R. C. (1996). "A personal experience with SIRS and MODS." Crit Care Med **24**(8): 1417-8.
- Booth, C. and C. S. Potten (2000). "Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells." J Clin Invest **105**(11): 1493-9.
- Booz, J., H. G. Paretzke, et al. (1987). "Auger-electron cascades, charge potential and microdosimetry of iodine-125." Radiat Environ Biophys **26**(2): 151-62.
- Borue, X., S. Lee, et al. (2004). "Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing." Am J Pathol **165**(5): 1767-72.
- Brittan, M., K. M. Braun, et al. (2005). "Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion." J Pathol **205**(1): 1-13.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-95.
- 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.
- Burke, Z. D., S. Thowfeequ, et al. (2007). "Stem cells in the adult pancreas and liver." Biochem J **404**(2): 169-78.
- Cabre, L., J. Mancebo, et al. (2005). "Multicenter study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of Sequential Organ Failure Assessment scores in decision making." Intensive Care Med **31**(7): 927-33.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-402.
- Campbell, J. H., J. L. Efendy, et al. (2000). "Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body." J Vasc Res **37**(5): 364-71.

- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." J Cell Biochem **98**(5): 1076-84.
- Carleton, A., L. T. Petreanu, et al. (2003). "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb." Nat Neurosci **6**(5): 507-18.
- Castro-Malaspina, H., R. E. Gay, et al. (1980). "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny." Blood **56**(2): 289-301.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-49.
- Chao, N. J. (2007). "Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options." Exp Hematol **35**(4 Suppl 1): 24-7.
- 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, J., Y. Li, et al. (2003). "Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat." J Neurosci Res **73**(6): 778-86.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2001). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." Stroke **32**(4): 1005-11.
- 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.
- Chen, L. W., C. M. Hsu, et al. (1999). "Changes in gut mucosal nitric oxide synthase (NOS) activity after thermal injury and its relation with barrier failure." Shock **11**(2): 104-10.
- 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.
- Chopp, M., X. H. Zhang, et al. (2000). "Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation." Neuroreport **11**(13): 3001-5.
- Chu, M. S., C. F. Chang, et al. (2006). "Signalling pathway in the induction of neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells." Cell Signal **18**(4): 519-30.
- Cizkova, D., J. Rosocha, et al. (2006). "Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1167-80.
- Cohn, S. M., S. Schloemann, et al. (1997). "Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1." J Clin Invest **99**(6): 1367-79.
- 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 (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." J Cell Physiol **181**(1): 67-73.
- Coronel, M. F., P. L. Musolino, et al. (2006). "Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction." Neurosci Lett **405**(1-2): 5-9.
- Crigler, L., R. C. Robey, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis." Exp Neurol **198**(1): 54-64.
- Cui, X., J. Chen, et al. (2007). "Nitric oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/chemokine (CXC motif) receptor 4 enhances bone marrow stromal cell migration into ischemic brain after stroke." Stem Cells **25**(11): 2777-85.

- D'Ippolito, G., S. Diabira, et al. (2004). "Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential." *J Cell Sci* **117**(Pt 14): 2971-81.
- Dabeva, M. D., P. M. Petkov, et al. (2000). "Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver." *Am J Pathol* **156**(6): 2017-31.
- 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.
- De Coppi, P., M. Pozzobon, et al. (2006). "Isolation of mesenchymal stem cells from human vermiform appendix." *J Surg Res* **135**(1): 85-91.
- Deitch, E. A., D. Xu, et al. (1994). "Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock." *Shock* **1**(2): 141-5.
- Delorme, B. and P. Charbord (2007). "Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Methods Mol Med* **140**: 67-81.
- Delorme, B., J. Ringe, et al. (2008). "Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells." *Blood* **111**(5): 2631-5.
- Deng, W., L. Balazs, et al. (2002). "Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis." *Gastroenterology* **123**(1): 206-16.
- 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.
- Dennis, J. E., K. Esterly, et al. (2007). "Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration." *Stem Cells* **25**(10): 2575-82.
- Densow, D., H. Kindler, et al. (1997). "Criteria for the selection of radiation accident victims for stem cell transplantation." *Stem Cells* **15 Suppl 2**: 287-97.
- Deschaseaux, F., F. Gindraux, et al. (2003). "Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45^{med,low} phenotype." *Br J Haematol* **122**(3): 506-17.
- Devine, S. M. and R. Hoffman (2000). "Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation." *Curr Opin Hematol* **7**(6): 358-63.
- Dexter, T. M. (1989). "Haemopoietic growth factors." *Br Med Bull* **45**(2): 337-49.
- Dexter, T. M., C. M. Heyworth, et al. (1990). "The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **327**(1239): 85-98.
- Dexter, T. M. and N. G. Testa (1976). "Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture." *Methods Cell Biol* **14**: 387-405.
- di Bonzo, L. V., I. Ferrero, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential." *Gut* **57**(2): 223-31.
- 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.
- 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., B. Delorme, et al. (2007). "Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes." *Arthritis Res Ther* **9**(2): R33.

- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-7.
- Dorr, W., S. Reichel, et al. (2005). "Effects of keratinocyte growth factor (palifermin) administration protocols on oral mucositis (mouse) induced by fractionated irradiation." *Radiother Oncol* **75**(1): 99-105.
- Douay, L. (1985). "Hematopoietic stem cells controls for autologous bone marrow transplantation monitoring." *Rev Fr Transfus Immunohematol* **28**(5): 397-409.
- Doucet, C., I. Ernou, et al. (2005). "Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications." *J Cell Physiol* **205**(2): 228-36.
- 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.
- Dunnett, S. B. and A. Bjorklund (1999). "Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease." *Nature* **399**(6738 Suppl): A32-9.
- Edwards, A. A. (1997). "The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry." *Radiat Res* **148**(5 Suppl): S39-44.
- Empey, L. R., J. D. Papp, et al. (1992). "Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats." *Dig Dis Sci* **37**(2): 205-14.
- Faries, P. L., R. J. Simon, et al. (1998). "Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients." *J Trauma* **44**(6): 1031-5; discussion 1035-6.
- Fathke, C., L. Wilson, et al. (2004). "Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair." *Stem Cells* **22**(5): 812-22.
- Fiegel, H. C., J. J. Park, et al. (2003). "Characterization of cell types during rat liver development." *Hepatology* **37**(1): 148-54.
- 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.
- Fouillard, L., A. Chapel, et al. (2007). "Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation." *Leukemia* **21**(3): 568-570.
- Fouillard, L., M. Labopin, et al. (2002). "Hematopoietic stem cell transplantation for de novo erythroleukemia: a study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)." *Blood* **100**(9): 3135-40.
- Fox, J. M., G. Chamberlain, et al. (2007). "Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking." *Br J Haematol* **137**(6): 491-502.
- Francois, S., M. Bensidhoum, et al. (2006). "Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage." *Stem Cells* **24**(4): 1020-9.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Exp Hematol* **4**(5): 267-74.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." *J Embryol Exp Morphol* **16**(3): 381-90.
- Friedenstein, A. Y. and K. S. Lalykina (1970). "Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis." *Calcif Tissue Res*: Suppl:105-6.
- Friedland, W., P. Bernhardt, et al. (2002). "Simulation of DNA damage after proton and low LET irradiation." *Radiat Prot Dosimetry* **99**(1-4): 99-102.

- Friedland, W., P. Jacob, et al. (2006). "Simulation of light ion induced DNA damage patterns." Radiat Prot Dosimetry **122**(1-4): 116-20.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-62.
- Fukuda, K. (2001). "Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering." Artif Organs **25**(3): 187-93.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.
- Gao, L. R., Z. G. Wang, et al. (2006). "Effect of intracoronary transplantation of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on outcomes of patients with refractory chronic heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy." Am J Cardiol **98**(5): 597-602.
- Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, et al. (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." Dis Colon Rectum **48**(7): 1416-23.
- Garderet, L., C. Mazurier, et al. (2007). "Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma." Leuk Lymphoma **48**(10): 2032-41.
- 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.
- Gianotti, L., J. W. Alexander, et al. (1993). "Relationship between extent of burn injury and magnitude of microbial translocation from the intestine." J Burn Care Rehabil **14**(3): 336-42.
- 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.
- Gorin, N. C., P. Aegerter, et al. (1990). "Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging." Blood **75**(8): 1606-14.
- Gorin, N. C., A. Najman, et al. (1977). "Autologous bone-marrow transplantation in acute myelocytic leukaemia." Lancet **1**(8020): 1050.
- 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.
- Grimm, P. C., P. Nickerson, et al. (2001). "Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection." N Engl J Med **345**(2): 93-7.
- Grisham, J. W. (1997). "Hepatocyte lineages: of clones, streams, patches, and nodules in the liver." Hepatology **25**(1): 250-2.
- Grompe, M. (2003). "The role of bone marrow stem cells in liver regeneration." Semin Liver Dis **23**(4): 363-72.
- 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.
- Gronthos, S. and P. J. Simmons (1995). "The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro." Blood **85**(4): 929-40.
- 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, H. L., D. Wolfe, et al. (2003). "Gene transfer of human manganese superoxide dismutase protects small intestinal villi from radiation injury." J Gastrointest Surg **7**(2): 229-35; discussion 235-6.
- Guo, W., J. Ding, et al. (1995). "Alterations in intestinal bacterial flora modulate the systemic cytokine response to hemorrhagic shock." Am J Physiol **269**(6 Pt 1): G827-32.

- Gupta, S., C. Verfaillie, et al. (2002). "A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure." Kidney Int **62**(4): 1285-90.
- Haruna, Y., K. Saito, et al. (1996). "Identification of bipotential progenitor cells in human liver development." Hepatology **23**(3): 476-81.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, et al. (1992). "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." Bone **13**(1): 69-80.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, et al. (1996). "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha." J Cell Physiol **166**(3): 585-92.
- Hench, L. L. (1988). "Bioactive ceramics." Ann N Y Acad Sci **523**: 54-71.
- Herrera, M. B., B. Bussolati, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury." Int J Mol Med **14**(6): 1035-41.
- Hill, W. D., D. C. Hess, et al. (2004). "SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury." J Neuropathol Exp Neurol **63**(1): 84-96.
- 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.
- Hofmann, A. F. (1999). "The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease." Arch Intern Med **159**(22): 2647-58.
- Hori, Y., T. Nakamura, et al. (2002). "Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding." J Surg Res **102**(2): 156-60.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, et al. (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8932-7.
- Houchen, C. W., R. J. George, et al. (1999). "FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): G249-58.
- 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.
- Huang, F., J. Wang, et al. (2006). "Effects of co-grafts mesenchymal stem cells and nerve growth factor suspension in the repair of spinal cord injury." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **26**(2): 206-10.
- Humphreys, B. D. and J. V. Bonventre (2008). "Mesenchymal stem cells in acute kidney injury." Annu Rev Med **59**: 311-25.
- Isakova, I. A., K. Baker, et al. (2006). "Preclinical evaluation of adult stem cell engraftment and toxicity in the CNS of rhesus macaques." Mol Ther **13**(6): 1173-84.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." J Cell Biochem **64**(2): 295-312.
- Jang, Y. Y., M. I. Collector, et al. (2004). "Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion." Nat Cell Biol **6**(6): 532-9.
- Ji, J. F., B. P. He, et al. (2004). "Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury." Stem Cells **22**(3): 415-27.
- Jiang, Y., B. Vaessen, et al. (2002). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." Exp Hematol **30**(8): 896-904.
- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." Exp Cell Res **238**(1): 265-72.
- Jorgensen, C., D. Noel, et al. (2001). "Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **60**(4): 305-9.
- Kale, I. T., M. A. Kuzu, et al. (1998). "The presence of hemorrhagic shock increases the rate of bacterial translocation in blunt abdominal trauma." J Trauma **44**(1): 171-4.

- Kallis, Y., M. R. Alison, et al. (2006). "Bone marrow stem cells and liver disease." Gut.
- Kataoka, K., R. J. Medina, et al. (2003). "Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin." Am J Pathol **163**(4): 1227-31.
- Kaufmann, P. M., K. Sano, et al. (1994). "Heterotopic hepatocyte transplantation using three-dimensional polymers: evaluation of the stimulatory effects by portacaval shunt or islet cell cotransplantation." Transplant Proc **26**(6): 3343-5.
- Khan, W. B., C. Shui, et al. (1997). "Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor." Radiat Res **148**(3): 248-53.
- Klass, M., V. Gavrikov, et al. (2007). "Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy." Anesth Analg **104**(4): 944-8.
- Kneser, U., P. M. Kaufmann, et al. (1999). "Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices." J Biomed Mater Res **47**(4): 494-503.
- 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., C. Peters, et al. (1999). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases." Exp Hematol **27**(11): 1675-81.
- Kohn, D. B., M. S. Hershfield, et al. (1998). "T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates." Nat Med **4**(7): 775-80.
- Koike, K., E. E. Moore, et al. (1994). "Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin." Crit Care Med **22**(9): 1438-44.
- 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.
- Kramer, B. C., D. Woodbury, et al. (2006). "Adult rat bone marrow stromal cells express genes associated with dopamine neurons." Biochem Biophys Res Commun **343**(4): 1045-52.
- Krampera, M., S. Marconi, et al. (2007). "Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus." Bone **40**(2): 382-90.
- Krause, D. S., N. D. Theise, et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell **105**(3): 369-77.
- Kucia, M., W. Wojakowski, et al. (2006). "The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **54**(2): 121-35.
- Kuebler, J. F., B. Toth, et al. (2003). "Differential alterations in intestinal permeability after trauma-hemorrhage." J Surg Res **112**(2): 198-204.
- Kurabe, T., Y. Itoh, et al. (2002). "[Radioprotective effects of natural beta-carotene on villi and crypts in abdominally radiated mice]." Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi **62**(14): 822-31.
- Lange, C., H. Bruns, et al. (2006). "Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells." World J Gastroenterol **12**(15): 2394-7.
- Lataillade, J. J., C. Doucet, et al. (2007). "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy." Regen Med **2**(5): 785-94.

- 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.
- Lazaro, C. A., J. A. Rhim, et al. (1998). "Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture." Cancer Res **58**(23): 5514-22.
- Lazarus, H. M. (1995). "Bone marrow transplantation in low-grade non-Hodgkin's lymphoma." Leuk Lymphoma **17**(3-4): 199-210.
- Lazarus, H. M., S. E. Haynesworth, et al. (1995). "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use." Bone Marrow Transplant **16**(4): 557-64.
- 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., H. Samuelsson, et al. (2007). "Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells." Leukemia **21**(8): 1733-8.
- Lee, K., M. K. Majumdar, et al. (2001). "Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation." Mol Ther **3**(6): 857-66.
- 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. H., S. C. Hsu, et al. (2006). "A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice." Blood **107**(5): 2153-61.
- Leedham, S. J., A. T. Thliveris, et al. (2005). "Gastrointestinal stem cells and cancer: bridging the molecular gap." Stem Cell Rev **1**(3): 233-41.
- Li, Y., J. Chen, et al. (2002). "Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery." Neurology **59**(4): 514-23.
- Linard, C., N. M. Griffiths, et al. (1997). "Changes in gut neurotensin and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat." Int J Radiat Biol **71**(5): 581-8.
- Linard, C., C. Marquette, et al. (2004). "Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(2): 427-34.
- Liu, H., O. Honmou, et al. (2006). "Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia." Brain **129**(Pt 10): 2734-45.
- Lloyd, D. C., R. J. Purrott, et al. (1975). "The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **28**(1): 75-90.
- Locatelli, F. and G. R. Burgio (1998). "Transplant of hematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going." Haematologica **83**(6): 550-63.
- Longo, V., A. Vacca, et al. (2007). "Imaging and angiogenesis in hematological malignancies." Leukemia **21**(8): 1605.
- Lopez, M., D. Bardinet, et al. (1995). "[Towards a standardization of the culture of hematopoietic progenitor cells CFU-GM applied to the transplantation of hematopoietic stem cells in France]." Transfus Clin Biol **2**(2): 101-7.
- Lu, D., A. Mahmood, et al. (2001). "Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome." Neuroreport **12**(3): 559-63.
- 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.
- Mahmood, A., D. Lu, et al. (2004). "Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury." J Neurotrauma **21**(1): 33-9.
- Mahmood, A., D. Lu, et al. (2004). "Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain." Neurosurgery **55**(5): 1185-93.

- Mahmood, A., D. Lu, et al. (2001). "Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells." Neurosurgery **49**(5): 1196-203; discussion 1203-4.
- 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.
- Makino, S., K. Fukuda, et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest **103**(5): 697-705.
- Mallick, I. H., W. Yang, et al. (2004). "Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury." Dig Dis Sci **49**(9): 1359-77.
- Mangi, A. A., N. Noiseux, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts." Nat Med **9**(9): 1195-201.
- Mansilla, E., G. H. Marin, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries." Transplant Proc **37**(1): 292-4.
- Marcus, A. J. and D. Woodbury (2008). "Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard." J Cell Mol Med.
- Mata, M., E. Chiffolleau, et al. (2004). "Bcl-XL expression in stem cells facilitates engraftment and reduces the need for host conditioning during bone marrow transplantation." Am J Transplant **4**(1): 58-64.
- Mazhari, R. and J. M. Hare (2007). "Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4 Suppl 1**: S21-6.
- Menthen, A., N. Deb, et al. (2004). "Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver." Stem Cells **22**(6): 1049-61.
- 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.
- Mezey, E., K. J. Chandross, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-82.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-6.
- Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.
- Mirotsov, M., Z. Zhang, et al. (2007). "Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1643-8.
- 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.
- Mooney, D., L. Hansen, et al. (1992). "Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix." J Cell Physiol **151**(3): 497-505.
- Moore, F. A. (1999). "The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure." Am J Surg **178**(6): 449-53.
- Moore, F. A., E. E. Moore, et al. (1991). "Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma." J Trauma **31**(5): 629-36; discussion 636-8.
- Mori, L., A. Bellini, et al. (2005). "Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow." Exp Cell Res **304**(1): 81-90.
- Morigi, M., B. Imberti, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells are renoprotective, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure." J Am Soc Nephrol **15**(7): 1794-804.

- Mouiseddine, M., S. Francois, et al. (2007). "Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model." Br J Radiol **80 Spec No 1**: S49-55.
- Muller-Ehmsen, J., B. Krausgrill, et al. (2006). "Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction." J Mol Cell Cardiol **41**(5): 876-84.
- Musolino, P. L., M. F. Coronel, et al. (2007). "Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction." Neurosci Lett **418**(1): 97-101.
- Mutlu-Turkoglu, U., Y. Erbil, et al. (2000). "The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats." Life Sci **66**(20): 1905-13.
- Mylonas, P. G., P. T. Matsouka, et al. (2000). "Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis." Mol Cell Endocrinol **160**(1-2): 115-22.
- Nagaya, N., K. Kangawa, et al. (2005). "Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy." Circulation **112**(8): 1128-35.
- Nagayama, H., K. Misawa, et al. (2002). "Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim." Bone Marrow Transplant **29**(3): 197-204.
- Neild, G. H. (2001). "Multi-organ renal failure in the elderly." Int Urol Nephrol **32**(4): 559-65.
- Newsome, P. N., I. Johannessen, et al. (2003). "Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion." Gastroenterology **124**(7): 1891-900.
- Nierhoff, D., A. Ogawa, et al. (2005). "Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity." Hepatology **42**(1): 130-9.
- Noel, D., D. Gazit, et al. (2004). "Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells." Stem Cells **22**(1): 74-85.
- 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.
- Novikoff, P. M., A. Yam, et al. (1996). "Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductules." Am J Pathol **148**(5): 1473-92.
- Nygren, J., M. Ljungman, et al. (1995). "Chromatin structure and radiation-induced DNA strand breaks in human cells: soluble scavengers and DNA-bound proteins offer a better protection against single- than double-strand breaks." Int J Radiat Biol **68**(1): 11-8.
- Oh, S. H., R. P. Witek, et al. (2007). "Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration." Gastroenterology **132**(3): 1077-87.
- Ohgushi, H. and A. I. Caplan (1999). "Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering." J Biomed Mater Res **48**(6): 913-27.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10344-9.
- Osawa, M., K. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-5.
- Overturf, K., M. al-Dhalimy, et al. (1997). "Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes." Am J Pathol **151**(5): 1273-80.
- Paris, F., Z. Fuks, et al. (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-7.
- Peiffert, D., J. M. Simon, et al. (2007). "[Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]." Cancer Radiother **11**(6-7): 309-12.

- Perka, C., O. Schultz, et al. (2000). "Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits." *Biomaterials* **21**(11): 1145-53.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* **284**(5417): 1168-70.
- Petersen, B. E., V. F. Zajac, et al. (1998). "Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats." *Hepatology* **27**(4): 1030-8.
- 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.
- Pohl-Ruling, J., P. Fischer, et al. (1986). "Chromosomal damage induced in human lymphocytes by low doses of D-T neutrons." *Mutat Res* **173**(4): 267-72.
- Poiarkov, S. O. (1999). "[The dynamic characteristics of morbidity with temporary loss of work capacity in river fleet workers with digestive tract diseases before and after the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]." *Lik Sprava*(2): 36-9.
- Ponder, B. A., G. H. Schmidt, et al. (1985). "Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells." *Nature* **313**(6004): 689-91.
- 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.
- Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." *Development* **110**(4): 1001-20.
- Potten, C. S., J. A. O'Shea, et al. (2001). "The effects of repeated doses of keratinocyte growth factor on cell proliferation in the cellular hierarchy of the crypts of the murine small intestine." *Cell Growth Differ* **12**(5): 265-75.
- Potten, C. S., G. Owen, et al. (1990). "The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine." *Int J Radiat Biol* **57**(1): 185-99.
- Poulsom, R., S. J. Forbes, et al. (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." *J Pathol* **195**(2): 229-35.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." *Science* **276**(5309): 71-4.
- Prockop, D. J., I. Sekiya, et al. (2001). "Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells." *Cytotherapy* **3**(5): 393-6.
- Radtke, F. and H. Clevers (2005). "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin." *Science* **307**(5717): 1904-9.
- Reddi, A. H. (1998). "Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S66-72.
- Reidy, J. J. and G. Ramsay (1990). "Clinical trials of selective decontamination of the digestive tract: review." *Crit Care Med* **18**(12): 1449-56.
- Renault, V., E. Rolland, et al. (2002). "Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging." *Exp Gerontol* **37**(12): 1513-4.
- Reyes, M., A. Dudek, et al. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." *J Clin Invest* **109**(3): 337-46.
- Reyes, M., T. Lund, et al. (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." *Blood* **98**(9): 2615-25.
- Reyes, M. and C. M. Verfaillie (2001). "Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells." *Ann N Y Acad Sci* **938**: 231-3; discussion 233-5.

- Richards, M., S. P. Tan, et al. (2004). "The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE." *Stem Cells* **22**(1): 51-64.
- Ringden, O., M. Uzunel, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." *Transplantation* **81**(10): 1390-7.
- Ringden, O., M. Uzunel, et al. (2007). "Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon." *Leukemia* **21**(11): 2271-6.
- Ringe, J., C. Kaps, et al. (2002). "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs." *Naturwissenschaften* **89**(8): 338-51.
- Robin, C., F. Pflumio, et al. (1999). "Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells." *J Exp Med* **189**(10): 1601-10.
- Rochat, A., K. Kobayashi, et al. (1994). "Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis." *Cell* **76**(6): 1063-73.
- 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.
- Scanff, P., M. Souidi, et al. (2004). "Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation." *Can J Physiol Pharmacol* **82**(2): 114-24.
- Schachinger, V., S. Dimmeler, et al. (2006). "[Stem cells after myocardial infarction]." *Herz* **31**(2): 127-36; quiz 142-3.
- Schneider, R. K., S. Neuss, et al. (2008). "Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function." *Differentiation* **76**(2): 156-67.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, et al. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." *J Clin Invest* **109**(10): 1291-302.
- Sekiya, I., D. C. Colter, et al. (2001). "BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(2): 411-8.
- Semont, A., S. Francois, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury." *Adv Exp Med Biol* **585**: 19-30.
- Sensebe, L., J. Li, et al. (1995). "Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. I. Growth requirement and myelopoiesis supportive ability." *Exp Hematol* **23**(6): 507-13.
- Shi, M., J. Li, et al. (2007). "Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice." *Haematologica* **92**(7): 897-904.
- Silani, V., L. Cova, et al. (2004). "Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet* **364**(9429): 200-2.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." *Blood* **78**(1): 55-62.
- Singer, M. (1964). "The Trophic Quality of the Neuron: Some Theoretical Considerations." *Prog Brain Res* **13**: 228-32.
- Singer, M. (1974). "Trophic functions of the neuron. VI. Other trophic systems. Neurotrophic control of limb regeneration in the newt." *Ann N Y Acad Sci* **228**(0): 308-22.
- Son, B. R., L. A. Marquez-Curtis, et al. (2006). "Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases." *Stem Cells* **24**(5): 1254-64.

- Souidi, M., P. Scanff, et al. (2007). "Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat." C R Biol **330**(12): 861-70.
- Strain, A. J. and H. A. Crosby (2000). "Hepatic stem cells." Gut **46**(6): 743-5.
- Strauer, B. E., R. Kandolf, et al. (2001). "[Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy]." Med Klin (Munich) **96**(10): 608-25.
- Suzuki, A., Y. Zheng, et al. (2000). "Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver." Hepatology **32**(6): 1230-9.
- Suzuki, A., Y. W. Zheng, et al. (2002). "Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver." J Cell Biol **156**(1): 173-84.
- Takahama, Y., T. Ochiya, et al. (1999). "Adenovirus-mediated transfer of HST-1/FGF-4 gene protects mice from lethal irradiation." Oncogene **18**(43): 5943-7.
- Takahashi, N., N. Udagawa, et al. (2007). "Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity." Methods Mol Med **135**: 285-301.
- 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.
- Tani, T., M. Fujino, et al. (2000). "Bacterial translocation and tumor necrosis factor-alpha gene expression in experimental hemorrhagic shock." Crit Care Med **28**(11): 3705-9.
- Thomson, J. A. and J. S. Odorico (2000). "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." Trends Biotechnol **18**(2): 53-7.
- Thorgeirsson, S. S. (1996). "Hepatic stem cells in liver regeneration." Faseb J **10**(11): 1249-56.
- Thorgeirsson, S. S., R. P. Everts, et al. (1993). "Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment." Proc Soc Exp Biol Med **204**(3): 253-60.
- Thorgeirsson, S. S. and J. W. Grisham (2006). "Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence." Hepatology **43**(1): 2-8.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-22.
- Togel, F., Z. Hu, et al. (2005). "Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms." Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F31-42.
- 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.
- 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.
- 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.
- Trounson, A. (2006). "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." Endocr Rev **27**(2): 208-19.
- Tuan, R. S., G. Boland, et al. (2003). "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering." Arthritis Res Ther **5**(1): 32-45.
- Tubiana, M. and M. Lalanne (1963). "[Hematologic Course Of Patients Subjected To Total-Body Irradiation For Organ Transplantation.]." Ann Radiol (Paris) **17**: 561-80.
- Uyama, S., P. M. Kaufmann, et al. (2001). "Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts." Transplantation **71**(9): 1226-31.
- Van der Meeren, A., P. Monti, et al. (2005). "Abdominal radiation exposure elicits inflammatory responses and abscopal effects in the lungs of mice." Radiat Res **163**(2): 144-52.

- Van der Meeren, A., M. A. Moush, et al. (2004). "Combinations of cytokines promote survival of mice and limit acute radiation damage in concert with amelioration of vascular damage." Radiat Res **161**(5): 549-59.
- Ventura, C., C. Cavallini, et al. (2008). "Stem cells and cardiovascular repair: a role for natural and synthetic molecules harboring differentiating and paracrine logics." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **6**(1): 60-8.
- Vescovi, A. L., E. A. Parati, et al. (1999). "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation." Exp Neurol **156**(1): 71-83.
- Vigneulle, R. M., S. Rao, et al. (2002). "Structural and functional alterations of the gastrointestinal tract following radiation-induced injury in the rhesus monkey." Dig Dis Sci **47**(7): 1480-91.
- Visani, G., R. Lemoli, et al. (1999). "Use of peripheral blood stem cells for autologous transplantation in acute myeloid leukemia patients allows faster engraftment and equivalent disease-free survival compared with bone marrow cells." Bone Marrow Transplant **24**(5): 467-72.
- Von Luttichau, I., M. Notohamiprodjo, et al. (2005). "Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4." Stem Cells Dev **14**(3): 329-36.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, et al. (2002). "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells." Science **297**(5590): 2256-9.
- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1994). "Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **76**(4): 579-92.
- Wakitani, S. and T. Yamamoto (2002). "Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect." Microsc Res Tech **58**(1): 14-8.
- Wang, G., E. Reed, et al. (2004). "Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications (Review)." Int J Mol Med **14**(1): 23-34.
- Wang, X., M. Foster, et al. (2003). "The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100** **Suppl 1**: 11881-8.
- Wang, X., H. Willenbring, et al. (2003). "Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes." Nature **422**(6934): 897-901.
- Whetton, A. D. and G. J. Graham (1999). "Homing and mobilization in the stem cell niche." Trends Cell Biol **9**(6): 233-8.
- White, J. F. and M. S. Parshley (1951). "Growth in vitro of blood vessels from bone marrow of adult chickens." Am J Anat **89**(2): 321-45.
- Willenbring, H., A. S. Bailey, et al. (2004). "Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver." Nat Med **10**(7): 744-8.
- Wislet-Gendebien, S., F. Wautier, et al. (2005). "Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin." Brain Res Bull **68**(1-2): 95-102.
- Woodbury, D., E. J. Schwarz, et al. (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." J Neurosci Res **61**(4): 364-70.
- Wynn, R. F., C. A. Hart, et al. (2004). "A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow." Blood **104**(9): 2643-5.
- Yamaguchi, Y., T. Kubo, et al. (2005). "Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing." Br J Dermatol **152**(4): 616-22.
- 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.

- 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.
- 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.
- Zvibel, I., A. S. Fiorino, et al. (1998). "Phenotypic characterization of rat hepatoma cell lines and lineage-specific regulation of gene expression by differentiation agents." Differentiation **63**(4): 215-23.