



**HAL**  
open science

# Implication de l'urothélium intrarénal dans les mécanismes précoces de régénération au cours de néphropathies obstructive et ischémique expérimentales

Alexis Girshovich

► **To cite this version:**

Alexis Girshovich. Implication de l'urothélium intrarénal dans les mécanismes précoces de régénération au cours de néphropathies obstructive et ischémique expérimentales. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66396 . tel-00829555

**HAL Id: tel-00829555**

**<https://theses.hal.science/tel-00829555>**

Submitted on 3 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Physiologie et Physiopathologie**

(ED394)

Présentée par

**Monsieur Alexis GIRSHOVICH**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de thèse :

**Implication de l'urothélium intrarénal dans les mécanismes précoces de régénération  
au cours de néphropathies obstructive et ischémique expérimentales**

Soutenue le 28 septembre 2012

Devant le jury composé de :

**Monsieur Patrick Bruneval, Rapporteur**

**Monsieur Pierre Mongiat-Artus, Rapporteur**

**Monsieur Olivier Cussenot, Examineur**

**Monsieur Alain Vandewalle, Examineur**

**Monsieur François Vrtovnik, Examineur**

**Monsieur Jean-Philippe Haymann, Directeur de thèse**

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6 Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données Esc G, 2ème étage 15 rue de l'école de médecine 75270-PARIS CEDEX 06	Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35 Fax : 01 42 34 68 40 Tél. pour les étudiants de A à EM : 01 42 34 69 54 Tél. pour les étudiants de EN à ME : 01 42 34 68 41 Tél. pour les étudiants de MF à Z : 01 42 34 68 51 E-mail : <a href="mailto:scolarite.doctorat@upmc.fr">scolarite.doctorat@upmc.fr</a>
--	---

# TABLE DES MATIÈRES

---

	Page
<b>Remerciements</b>	6
<b>Résumé</b>	8
<b>Mots clés</b>	8
<b>Abstract</b>	9
<b>Mots clés</b>	9
<b>Abréviations</b>	10
<b>Partie 1. Introduction</b>	12
<b>A. L'urothélium vésical</b>	13
<b>I. Généralités</b>	13
<b>II. Différents types de cellules urothéliales vésicales</b>	14
<i>1. Cellules superficielles</i>	15
<i>2. Cellules intermédiaires</i>	16
<i>3. Cellules basales</i>	17
<b>III. Complexes jonctionnels serrés</b>	17
<b>IV. Uroplakines</b>	22
<i>1. Caractéristique des protéines</i>	22
<i>2. Assemblage des uroplakines sur la membrane apicale et l'exocytose</i>	24
<i>3. Régulation de l'exocytose des DFV</i>	27
<i>4. Endocytose des cellules en ombrelles</i>	29
<i>5. Fonctions des UPs</i>	30
<i>5. a. Rôle des UPs dans la perméabilité urothéliale et le reflux vésico-urétéral primaire (RVUP)</i>	30
<i>5. b. Implication des UPs sur la fonction vésicale</i>	32
<i>5. c. Rôle des UPs dans l'infection urinaire</i>	32
<b>V. Physiologie de l'urothélium vésical</b>	34
<i>1. Transport des solutés</i>	34

<i>1. a. Transport de sodium</i>	34
<i>1. b. Transport de potassium</i>	34
<i>1. c. Transport de l'urée</i>	35
<i>2. L'urothélium vésical est un senseur</i>	36
<b>VI. Mécanismes de régénération de l'urothélium vésical</b>	37
<b>1. Généralités</b>	37
<b>2. Récepteurs à activité Tyrosine Kinase</b>	38
<b>3. Voie de FGFR</b>	38
<i>3. a. Rôle de FGFR dans la régénération de l'urothélium</i>	45
<i>3. a. 1. Expression de FGFR2IIIb dans l'urothélium vésical</i>	45
<i>3. a. 2. Les ligands de FGFR2IIIb impliqués lors de la régénération de l'urothélium vésical</i>	46
<i>Le FGF7</i>	46
<i>Le FGF 10</i>	47
<i>Autres ligands de FGFR2IIIb</i>	48
<b>4. Voie d'ErbB</b>	49
<i>4. a. Implication de voie EGFR ( ErbB) dans la régénération de l'urothélium vésical</i>	50
<b>5. Autres voies de signalisations potentiellement impliqué dans la prolifération des cellules urothéliales.</b>	54
<b>B. L'urothélium intrarénal</b>	55
<b>I. Structure de l'urothélium intrarénal</b>	55
<i>1. Urothélium de la médullaire interne et de la papille</i>	56
<i>2. Urothélium de la médullaire externe</i>	57
<i>3. Urothélium de la zone corticale</i>	58
<b>II. Fonctions de l'urothélium intrarénal</b>	59
<b>C. Obstruction urétérale</b>	60
<b>1. Généralités</b>	60
<b>2. Modèle de l'obstruction urétérale unilatérale</b>	60
<b>3. Aspects physiopathologiques de l'UUO</b>	61
<i>3. a. Lésions rénales précoces</i>	61

3. b. Prolifération tubulaire	62
3. c. Fibrose et inflammation rénale	63
<b>D. Ischémie rénale aiguë</b>	66
1. Généralités	66
2. Modèle de l'ischémie-réperfusion	67
3. Aspects physiopathologiques de l'IR	67
3. a. IR et activation des cellules endothéliales	67
3. b. IR et inflammation	68
3. c. IR et lésions tubulaires	70
4. Régénération tubulaire	72
4. a. Sources cellulaires de la régénération rénale	72
4. b. Facteurs de croissance impliqués dans la prolifération tubulaire	74
<b>Partie 2. Objectif de l'étude</b>	76
<b>Partie 3. Publications</b>	77
1. Girshovich A, Vinsonneau C, Perez J, Vandermeersch S, Verpont MC, Placier S, Jouanneau C, Letavernier E, Baud L, Haymann JP. <b>Ureteral obstruction promotes proliferation and differentiation of the renal urothelium into a bladder-like phenotype.</b> <i>Kidney Int.</i> 2012 Aug; 82, 428–435	78
1. Vinsonneau C, Girshovich A, M'rad MB, Perez J, Mesnard L, Vandermeersch S, Placier S, Letavernier E, Baud L, Haymann JP. <b>Intrarenal urothelium proliferation: an unexpected early event following ischemic injury.</b> <i>Am J Physiol Renal Physiol.</i> 2010 Sep; 299(3):F479-86	79
<b>Partie 4. Discussion</b>	80
<b>Topographie de l'urothélium intrarénal</b>	81
<b>Spécificité de l'urothélium intrarénal</b>	82
<b>Stimuli induisant une prolifération de l'urothélium intrarénal</b>	83
<b>Voies de signalisation impliquées dans la régénération de l'urothélium intrarénal</b>	83
<b>Prolifération et plasticité de la barrière urothéliale</b>	85
<b>Rôle des cellules urothéliales intrarénales dans la régénération tubulaire?</b>	86
<b>Insuffisance rénale aiguë (IRA) et prolifération de l'urothélium intrarénal</b>	88

<b>Rôle du FGF7 dans la protection du parenchyme rénal ?</b>	<b>89</b>
<b>Rôle délétère des cellules urothéliales intrarénales?</b>	<b>90</b>
<b>Partie 5. Conclusions et Perspectives</b>	<b>91</b>
<b>Partie 6. Annexe</b>	<b>93</b>
<b>Partie 7. Références bibliographiques</b>	<b>107</b>

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance à mon directeur de thèse, Le Professeur Jean-Philippe Haymann, sans lequel ce travail n'aurait pas été possible. Je le remercie très sincèrement pour m'avoir ouvert l'esprit sur la recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger, d'abord, mon Master 2 et, ensuite, cette thèse. Je tiens à le remercier pour ses grands talents de chercheur, pour son soutien, sa disponibilité, ses conseils avisés, et enfin, surtout, pour ses qualités humaines, qui m'ont permis de mener à bien ce projet dans de très bonnes conditions.

Je tiens à remercier Le Professeur Laurent Baud qui m'a accueilli dans son équipe pour son attention, son suivi régulier, sa bienveillance et ses conseils pour la réalisation de ce travail en général et de ce manuscrit en particulier.

Je voudrais remercier vivement les membres du jury : Le Professeur Patrick Bruneval et Le Professeur Mongiat-Artus qui ont eu l'amabilité d'accepter d'en être les rapporteurs; le Professeur Olivier Cussenot, le Docteur Alain Vandewalle, et le Professeur François Vrtovsnik, qui ont eu l'obligeance d'accepter d'en être les examinateurs.

Je remercie Le Professeur Pierre Ronco de m'avoir accueilli dans le laboratoire qui a permis de réaliser cette thèse.

Je remercie également:

Le Docteur Christos Chatziantoniou pour m'avoir accueilli dans son unité.

Madame Joëlle Perez Gamet pour sa présence toujours encourageante à mes côtés durant ces années, les techniques qu'elle m'a apprises, son immense gentillesse, son aide. Merci pour ta sympathie et ta bonne humeur.

Madame Sandrine Placier-Ouanella et Madame Sophie Vandermeersch pour leur patience, leur aide, leur professionnalisme et expertise, mais surtout pour leurs capacités à mettre une ambiance cordiale au laboratoire. Merci !

Le Docteur Christophe Vinsonneau pour m'avoir initié dans ce projet et pour ses conseils.

Le Docteur Emmanuel Letavernier pour ses idées, ses conseils, et son attention.

Merci à Madame Chantal Jouanneau pour sa gentillesse, ses conseils, son aide et sa passion de l'histologie.

Madame Marie-Christine Verpont pour sa gentillesse, et son art de la microscopie électronique.

Le Docteur Boris Dansou, mon ami de Master. Merci pour ces années sympathiques passées dans notre équipe.

Le Docteur Lara Zafrani merci pour tes conseils, ton soutien et ton amitié.

Je voudrais particulièrement remercier Madame Chantal Millot, Madame Carole Martori, et Madame Corinne Da Rold, Monsieur Laurent Benzerara, ainsi que Madame Martine Da Diedad, les collaborateurs du Service des Exploration Fonctionnelles pour leur accueil, leurs encouragements, leur gentillesse et leur aide.

Je remercie Mademoiselle Caroline Martin, Monsieur Claude Kitou et Mademoiselle Jessy Renciot qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions à l'animalerie.

Je voudrais remercier aussi les autres membres de l'équipe ou du laboratoire pour leur contribution et leur implication à chaque fois que je les ai sollicités.

Mouna Mael-Ainin, Fala Elmachhour, Ahmed Abed, je vous remercie pour les bons moments passés ensemble, nos discussions, vos conseils et votre bienveillance. Je vous souhaite bon courage et une grande réussite ! Merci !

Morad Djebbar, j'ai été ravi d'avoir fait ta connaissance j'espère que l'on va continuer à travailler ensemble, je te souhaite bon courage pour la suite.

Je remercie également Beatrice Letavernier, Dominique Guerrot, Pierre Galichon, Laurent Mesnard, Yichun Dubois, Dominique Cathelin, Naïke Bigé, Jonathan Caron, Christos Chadjichristos, Nasim Shweke, Nada Boulos et Julie Toubas pour leur présence, leur sympathie et leur amitié.

Pensées aux Masters et anciens Masters: Guillaume Hanouna, Julie Rode, Morgane Wetzstein, Coralie Poulain, Aude Dorison, Yosu Luque, Carlo Maria Alfieri, Aurélien Bataille, Quentin Raimbourg, Charlène Levi, Ségolène Isambert et tous les membres de l'unité U702. Un grand Merci à tous.

Je remercie également Madame Marie-Christine Poeuf et Madame Béatrice Baudouin-Massot pour leur sympathie et leur disponibilité.

La microdissection laser n'aurait pas été possible sans l'aide du Professeur Michel Peuchmaur et de Madame Brigitte Paris, du Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de l'hôpital Robert Debré.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Michel Delahousse, le chef de service de néphrologie de l'hôpital Foch, de m'avoir accueilli dans son service pendant toutes ces années de thèse et qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche clinique. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre patience, et vos grandes qualités relationnelles.

Je remercie Le Professeur Bernard Gattegno de m'avoir invité en 2004 de Tachkent (Ouzbékistan) pour réaliser une partie de mon internat dans le Service d'Urologie de l'Hôpital Tenon.

Je tiens également à remercier toute ma famille et surtout ma mère Madame Ryzhkova Ludmila et mon père Monsieur Girshovich Evgeniy pour leur soutien au fil de toutes ces années. Sans votre présence et vos encouragements, ma thèse n'aurait pas été possible.

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien de la Société Française de Néphrologie que je remercie chaleureusement.

## Résumé

A la différence de l'urothélium de la vessie qui est bien étudié, le phénotype et la fonction de l'urothélium intrarénal restent méconnus. Ce travail a pour objectif principal de caractériser l'urothélium intrarénal murin normal et au décours de lésions induites par un modèle d'obstruction urétérale unilatérale (UUO), ou par ischémie/réperfusion unilatérale (I/R) avec ou sans insuffisance rénale aigue.

Chez la souris, les espaces urinaires remontent profondément dans le parenchyme rénal jusqu'au fornix localisé au niveau de la zone cortico-médullaire. Alors que l'urothélium vésical est un épithélium pluristratifié, bien différencié, adapté aux stimulations mécaniques intermittentes lui permettant d'accomplir sa fonction de barrière aux substances dissoutes dans les urines et aux agents pathogènes, l'urothélium intrarénal au niveau du fornix est constitué d'une seule assise cellulaire. La plupart des cellules urothéliales intra rénales sont positives pour la cytokératine 14, marqueur des cellules progénitrices épithéliales, mais n'expriment pas certaines uroplakines, qui sont des éléments importants contribuant à l'imperméabilité des structures urothéliales.

Le stretch et l'hyperpression liés à l'UUO induisent à court terme la destruction de la barrière urothéliale avec arrachement des jonctions serrées et desquamation des cellules urothéliales dans la lumière urinaire. Ces événements déclenchent en moins de 24 heures une intense prolifération des cellules urothéliales. Cette prolifération permet la reconstitution de la couche épithéliale qui devient hyperplasique et s'organise en une structure pluristratifiée ressemblant à l'urothélium vésical : i.e différenciation des cellules apicales avec expression de novo de certaines uroplakines habituellement non exprimées.

Au décours de l'I/R, les cellules urothéliales constituent le premier contingent cellulaire qui prolifère (dès la 18<sup>ème</sup> heure) au niveau du fornix. Cette prolifération précède la régénération des cellules tubulaires de voisinage, situées au niveau des zones cortico-médullaires, qui débute entre la 24 et 48<sup>ème</sup> heure après l'ischémie. Ce contingent urothélial n'a pas de propriété de migration à distance pour recoloniser les tubules lésés. La prolifération des cellules urothéliales intrarénales dans les deux modèles est médiée par l'activation de la voie FGF7-FGFR2IIIb en rapport avec une surexpression de FGF7 intra rénal d'origine mésenchymateuse probable.

En réalisant un plan de coupe sagittale systématique, nous avons pu établir, de manière reproductible (variabilité intra et inter individuelle de l'ordre de 20%), la cinétique de la prolifération des cellules urothéliales et tubulaires dans différentes zones rénales après ischémie unilatérale. La prolifération des cellules urothéliales et tubulaires n'est plus observée au cours des 48 heures suivant une insuffisance rénale aiguë ischémique (I/R accompagnée d'une néphrectomie controlatérale). Cette absence de régénération s'accompagne d'une inhibition de transcription de FGF7 dans le rein lésé (contrairement au modèle unilatéral) et peut être prévenue par l'administration de FGF7 avant le clampage du pédicule vasculaire. Ce prétraitement améliore par ailleurs le score histologique des lésions tubulaires et la fonction rénale. L'implication d'une voie anti-apoptotique, responsable de la protection cellulaire, ainsi que la présence possible d'un ou plusieurs facteurs inhibiteurs de prolifération sont en cours d'identification.

Nos résultats suggèrent que l'urothélium intrarénal a potentiellement un rôle clé dans les phénomènes de régénération rénale : il est capable de s'adapter à l'hyperpression et l'hypoxie en reconstituant une barrière efficace et a potentiellement un rôle inducteur dans la prolifération tubulaire. FGF7 pourrait être un facteur de préconditionnement jouant à la fois un rôle dans la prévention de l'intensité des lésions et dans l'accélération de la régénération tubulaire.

**Mots clés:** Urothélium intrarénal ; FGF7 ; FGFR2 ; régénération ; obstruction urétérale ; ischémie rénale

## Abstract

### **Involvement of intrarenal urothelium in the early phase of regeneration in experimental ischemic and obstructive nephropathy**

Conversely to the bladder urothelium, intrarenal urothelium phenotype and function have not raised much interest.

The main focus of this study is to characterize murine intrarenal urothelium in physiological condition and following unilateral ureteral obstruction (UUO) and ischemia/reperfusion (IR) with or without acute renal failure.

Urinary spaces in mouse kidney extend deeply in parenchyma up to the fornices located near the corticomedullary junction in the vicinity of lobar vessels. Whereas bladder urothelium, is an effective, multilayered, well-differentiated, barrier to water and solutes, adapted to intermittent pressure changes depending upon filling or voiding states, intrarenal urothelium phenotype is heterogenous, depending on the location: a monolayered cuboid epithelium covering the renal papilla and a single or two-layered epithelium in the cortico-medullary area, with most urothelial cells staining positive for the progenitor cell marker cytokeratin 14. Renal urothelial structure in contrast to the bladder, do not express all types of uroplakines, which are key molecules for the impermeability of the barrier. The stretch and hyperpressure occurring during UUO are responsible for a short-term destruction of urothelial barrier with broken tight junctions and urothelial cells desquamation. These events trigger an early intense urothelial cell proliferation with a peak at day 2 leading to regeneration of the epithelial structure. 14 days following UUO, intrarenal urothelium appears as a 'bladder-like' urothelium with a bright staining for uroplakins and including *de novo* uroplakin II expression usually not expressed in this structure.

In IR model, renal urothelial cells located near the fornices constitute the first cell contingent to proliferate as soon as 18h following IR. This proliferation precedes tubular regeneration in the corticomedullary junction between 24 and 48 hours after ischemia. Proliferating urothelial cells do not migrate and do not home into injured tubules. In both models intrarenal urothelial cell proliferation is FGF7/FGFR2IIIb-mediated. FGF7 probably originates from mesenchymal cells located in the vicinity of intrarenal urothelium.

After unilateral ischemia, systematic sagittal kidney sections allowed us to establish in a reproducible manner (intra and inter individual variability around 20%) the kinetics of urothelial and renal tubular cell proliferation in selected kidney areas. Within a 48 hours period following ischemic acute renal failure (I/R associated to contralateral nephrectomy), urothelial and tubular cell proliferation are no longer detected. This inhibition may be explained by a down regulation of FGF7 and can be prevented by recombinant FGF7 administration before the time of the surgery. Anti-apoptotic pathway such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt kinase and endogenous proliferation inhibitors, which may account for these results, are under investigation.

Our results suggest that intrarenal urothelium has a potential key role in renal regeneration with a remarkable plasticity allowing an adaptative response to hypoxia and hyperpressure ultimately restoring an effective barrier and probably also triggering tubular proliferation.

Last, FGF7 may be a useful preconditioning factor, acting both for renal injury prevention and tubular recovery acceleration.

**Keywords:** Intrarenal urothelium; FGF7; FGFR2; kidney regeneration; Unilateral ureteral obstruction; Renal ischemia.

## ABRÉVIATIONS

---

**AJ** : *Aderent junctions*  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**AUM** : *asymmetric unit membrane* - membrane plasmique asymétrique  
**C** : *cortex*  
**CAR** : récepteur associé à l'adénovirus Coxsackie  
**Cdc42** : *Cell-division control protein 42*  
**CK** : cytokératine  
**CSF-1** : *colony-stimulating factor -1*  
**Ds** : desmosomes  
**ECM** : matrice extracellulaire  
**ECU** : *Escherichia coli* uropathogène  
**EGFR** : *epidermal growth factor receptor*  
**EMT** : *epithelial–mesenchymal transformation*  
**ENaC** : canal épithélial de sodium  
**EndMT** : transition endothélio-mésenchymateuse  
**eNOS** : endothéliale NO Synthétase  
**ER** : réticulum endoplasmique  
**ERK** : *extracellular signal-regulated kinases*  
**FGFR2IIIb** : *fibroblast growth factors receptor 2IIIb*  
**FGF** : *fibroblast growth factor*  
**FRS2** : FGFR substrat 2  
**FV** : vésicules fusiformes  
**GAB1** : *GRB2- associated binding protein 1*  
**HB-EGF** : *heparin-binding epidermal growth factor*  
**HER** : *human epidermal growth factor receptor*  
**HSPG** : sulfate d'héparine  
**IF** : filaments intermédiaires  
**ICAM-1** : *Intercellular Adhesion Molecule-1*  
**IGFR** : *insulin like growth factor receptor*  
**IM** : *inner medulla*  
**IP<sub>3</sub>** : l'Inositol Trisphosphate  
**IP<sub>3</sub>R** : Inositol Trisphosphate Recepteur  
**IRA** : insuffisance rénale aiguë  
**IR** : Modèle de l'ischémie–réperfusion  
**JAM** : *junctional adhesion molecules*  
**KGF** : *keratinocyte growth factor*  
**LFA-1** : *Lymphocyte function-associated antigen 1*  
**MAPK** : *mitogen-activated protein kinase*  
**MCP-1** : *Monocyte chemo attractant protein 1*  
**MKP1** et **MKP3** : MAPK phosphatase 1 et 3  
**MKP3** : MAPK phosphatase 3  
**MMPs** : Metalloprotéinases  
**MVB** : corps multi-vésiculaires  
**NF-κB** : facteur nucléaire *kappa B*  
**NRG** : 1, 2,3 et 4 : neurégulines  
**NSCC** : *non selective cation channel*  
**OM** : *outer medulla*

**P2XR** : les récepteurs des purines de type 2  
**PAI-1** : Plasminogen Activator Inhibitor-1  
**Pals** : *Protein associated with Lin-7*  
**Par**: *Partition ing defective*  
**Patj** : *Pals associated tight junction*  
**PDGFR** : *platelet-derived growth factor receptor*  
**PIP<sub>2</sub>** : *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*  
**PLC $\gamma$**  : *phospholipase C $\gamma$*   
**PKC** : *protein kinase C*  
**RANTES** : *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*  
**ROMK** : renal outer medullary potassium channel  
**ROS** : réactifs de l'oxygène  
**RTK** : Tyrosine Kinase  
**RVUP** : reflux vésico-urétéral primaire  
**SOS** : *Son of sevenless*  
**STAT** : *Signal Transducers and Activators of Transcription*  
**TGF- $\alpha$**  : *transforming growth factor- $\alpha$*   
**TGF- $\beta$ 1** : *transforming growth factor beta 1*  
**TLRs** : récepteurs *Toll-like*  
**TGN** : *trans-Golgi network* - le réseau trans-golgien  
**UP**: Uroplakine  
**UT-A** et **UT-B** : transporteurs d'urée  
**VD** : vésicules discoïdes  
**ZO** : *zonula occludent*  
**ZONAB** : *ZO associated nucleic acid protein*

# *PARTIE 1. INTRODUCTION*

---

# A. UROTHÉLIUM VÉSICAL

---

## I. GÉNÉRALITÉS

---

Les voies excrétrices sont en majeure partie couvertes par un épithélium spécifique appelé l'uroépithélium ou urothélium.

L'uroépithélium tapisse les voies excrétrices au niveau de la partie proximale de l'urètre, la partie distale des canalicules prostatiques, la vessie, l'uretère, le bassinet et les calices.

L'urothélium est pluristratifié au niveau vésical, la partie distale de l'urètre est recouverte, dans son trajet spongieux, par un épithélium cylindrique, d'abord bi-stratifié et ensuite simple (Romih R, 2005). La papille rénale est recouverte par un épithélium cuboïde ou cylindrique bas (*low columnar*) (Zheng F 1997) L'urothélium représente une structure continue, situé à l'interface des espaces urinaires et des tissus sous-jacents, dont la fonction principale est celle de barrière entre l'urine et le sang. Etant en contact permanent avec l'urine, l'urothélium possède une résistance accrue aux substances dissoutes, aux métabolites toxiques, ainsi qu'aux agents pathogènes. Cette barrière extensible est la plus imperméable du corps : elle s'adapte au large changement de volume de la vessie et aux variations de la pression mécanique en empêchant tout échange non régulé entre l'urine et le sang. (Acharya P et al 2004 ; Lewis SA et al 1976. Varley CL 2006).

La fonction de barrière est réalisée grâce à une organisation complexe de l'urothélium :

- a) Présence de cellules disposées en multicouches
- b) Présence de complexes jonctionnels serrés au niveau des cellules apicales, (Acharya P 2004 ; Kreft ME et al 2005; Kreft ME, 2006)
- c) Présence d'une couche apicale de glycosaminoglycanes (Hurst RE 1987 ; Parsons CL, 1990) avec une structuration particulière de lipides membranaires (Calderon RO 1998),

d) Présence d'un assemblage de protéines transmembranaires formant des plaques imperméables appelées Uroplakines (UPs) au niveau du pôle apical des cellules en ombrelles. (Hicks M, 1974 ; Hu P, 2002 ; Negrete HO, 1996)

Considéré autrefois comme une barrière inerte et passive, l'urothélium peut toutefois modifier la composition de l'urine via la sécrétion de certains ions et composés organiques. Il sécrète également différents neuromédiateurs et des molécules de signalisation comme l'ATP, l'acétylcholine ou le monoxyde d'azote permettant d'amplifier et de transmettre de l'information du milieu externe aux tissus musculaires et nerveux sous-jacents et inversement (Apodaca G. 2004). L'urothélium s'adapte également aux stimuli mécaniques tels que le changement de pression intravésicale, grâce à des modifications des composants de la paroi vésicale via des mécanismes d'endocytose et d'exocytose. (Apodaca G. 2004; Kreft ME, 2009; Lewis S, 1982 Truschel ST, 2002). Il possède aussi de remarquables capacités de régénération et de différenciation (Kreft ME et al 2005)

## II. DIFFERENTS TYPES DE CELLULES UROTHELIALES VESICALES

---

Au niveau vésical, l'urothélium est composé de trois à six couches cellulaires constituées de trois types de cellules: les cellules basales, intermédiaires et apicales (Jost SP, 1989). Jusqu'au milieu des années quatre vingt, il était admis que les cellules de chaque couche de l'urothélium vésical étaient attachées à la membrane basale par de longues prolongations cytoplasmiques, constituant ainsi un épithélium pseudopluristratifié (Martin BF 1972). Cependant, avec le développement de la microscopie électronique et l'immunohistochimie, cette notion a été revue et corrigée car les extensions cytoplasmiques sont rarement observées au niveau des cellule intermédiaires, et jamais en ce qui concerne les cellules en ombrelles. De fait, il est maintenant admis que l'urothélium est un épithélium stratifié. (Jost SP, 1989; Wu XR, 2009)

## *1. Cellules superficielles*

La couche apicale de l'urothélium est constituée par une mono-assise de cellules hautement différenciées, appelées cellules en ombrelles. (Alroy J, 1980) Selon le niveau de remplissage de la vessie, elles peuvent modifier leurs formes et leurs tailles : elles sont cuboïdes ou polygonales si la vessie est vide, et sont aplaties si la vessie est pleine. Leur taille varie entre 25 et 250  $\mu\text{m}$  de diamètre. (Martin BF, 1972; Truschel ST, 2002). En général, ce sont des cellules plurinucléées (Hicks M, 1974 ; Truschel ST, 2002) car elles proviennent de la fusion des cellules intermédiaires au cours de la différenciation. A leur jonction du côté apical, ces cellules forment des crêtes de 50 nm de hauteur: ce sont des interdigitations de la membrane apicale avec les cellules voisines, juste au-dessus des jonctions serrées qui contribuent à une haute résistance de la barrière paracellulaire. (Kreplak L, 2007)

La structure de la membrane apicale des cellules en ombrelles est très particulière. Elle est constituée par des régions avec des plaques rigides et des régions « charnières ». Les plaques urothéliales, de 600-1500 nm de diamètre, couvrent environ 70% à 90% de la surface apicale des cellules en ombrelles et sont composées, pour la majorité, de protéines spécifiques transmembranaires et cristallines appelées les uroplakines (UPs). Le feuillet externe de la membrane apicale est deux fois plus épais que son feuillet interne, c'est pourquoi la membrane apicale des cellules en ombrelles est appelée **membrane plasmique asymétrique** (AUM pour *Asymmetric Unit Membrane*). Son épaisseur est d'environ 16,5 nm au niveau de l'urothélium vésical. (Hicks RM, 1965; Porter K, 1967; Walser BL, 1988; Staehelin LA, 1972 ; Vergara J, 1969 ; Hicks RM, 1969) Chaque plaque urothéliale contient entre mille et trois mille particules d'UPs. Ces plaques sont rigides et jouent un rôle majeur dans la formation de la barrière imperméable de l'urothélium. (Walz T, 1995 ; Yu J, 1990; Hu P, 2000; Hu P, 2002; Kong XT, 2004 ; Wu XR, 2009) Le reste de la surface des cellules en ombrelles est constitué par des structures non cristallines appelées régions « charnières» qui contiennent une glycoprotéine de 85-100 kDa nommée urohingin. (Liang F, 1999; Yu J,

1992) Les structures protéiques, telles que les récepteurs et les canaux ioniques, sont probablement localisées au niveau des «charnières». (Khandelwal P, 2009) Le cytoplasme des cellules en ombrelle contient des vésicules discoïdes et/ou fusiformes, composées des UPs, qu'elles transportent vers la membrane apicale. (Truschel ST, 1965). La plupart des vésicules ont une forme discoïde chez l'homme et le lapin (Jost SP, 1989 ; Truschel ST, 2002) et, en revanche, une apparence fusiforme chez le rat et la souris. (Kerr DE, 1998)

La surface basolatérale des cellules en ombrelles est riche en actine et en desmosomes qui assurent les interconnexions avec les cellules de la couche sous-jacente. (Romih R, 1999)

Les vésicules sont co-localisées avec le réseau des cytokératines (CK), notamment CK 7 et CK 20, qui sont organisées en « tunnels de trajectoires », perpendiculairement à la membrane apicale. Le réseau des CKs se termine à une profondeur de 150–300 nm de la membrane apicale, où les tunnels de CKs s'élargissent et fusionnent entre eux pour permettre la sortie des protéines. Les vésicules matures sont présentes juste au dessous de la membrane plasmique apicale dans les endroits dépourvus de CKs. (Veranic P, 2002; Veranic P, 2000; Veranic P, 2006)

## ***2. Cellules intermédiaires***

Au dessous des cellules en ombrelles, se trouvent les rangées de cellules intermédiaires qui sont connectées avec les cellules-voisines à l'aide de plusieurs desmosomes. Ce sont des cellules pyriformes mononucléées de 15–50  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'épaisseur de la couche des cellules intermédiaires varie selon les stades de remplissage de la vessie : on compte au moins une ou deux cellules par couche si la vessie est pleine et de quatre à six si elle est vide. En phase de remplissage de la vessie, les cellules intermédiaires glissent probablement les unes par-dessus les autres, ce qui permet de garder l'étanchéité de la barrière urothéliale. De façon intéressante, dans le cytoplasme des cellules intermédiaires qui

se trouvent en contact direct avec les cellules en ombrelle, de petites vésicules discoïdes contenant les UPs ont été décrites, suggérant que les cellules intermédiaires ont des capacités de différenciation rapide vers les cellules en ombrelle, en cas de rupture de la barrière. (Apodaca G. 2004)

### ***3. Cellules basales***

Tout proche du réseau capillaire, au-dessus de la membrane basale, est située une mono-assise de petites cellules, précurseur des cellules urothéliales. Ces cellules, qui ont une taille de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, adhèrent à la membrane basale par les hémidesmosomes et expriment la cytokératine 14, qui est un marqueur des cellules progénitrices épithéliales. (Jost SP, 1989; Jones JC. 2001) Ces cellules sont aussi caractérisées par l'expression des cytokératines 5, et 17, qui ne sont pas exprimées par les autres cellules urothéliales. (Jones JC. 2001). Toutes les couches des cellules urothéliales sont marquées par les CK -7, -8,-18- et -19, les cellules intermédiaires sont positives pour le CK-13 et les cellules en ombrelle pour le CK-20, marqueur de haute différenciation (Veranic P, 2006).

## **III. LES COMPLEXES JONCTIONNELS SERRÉS**

---

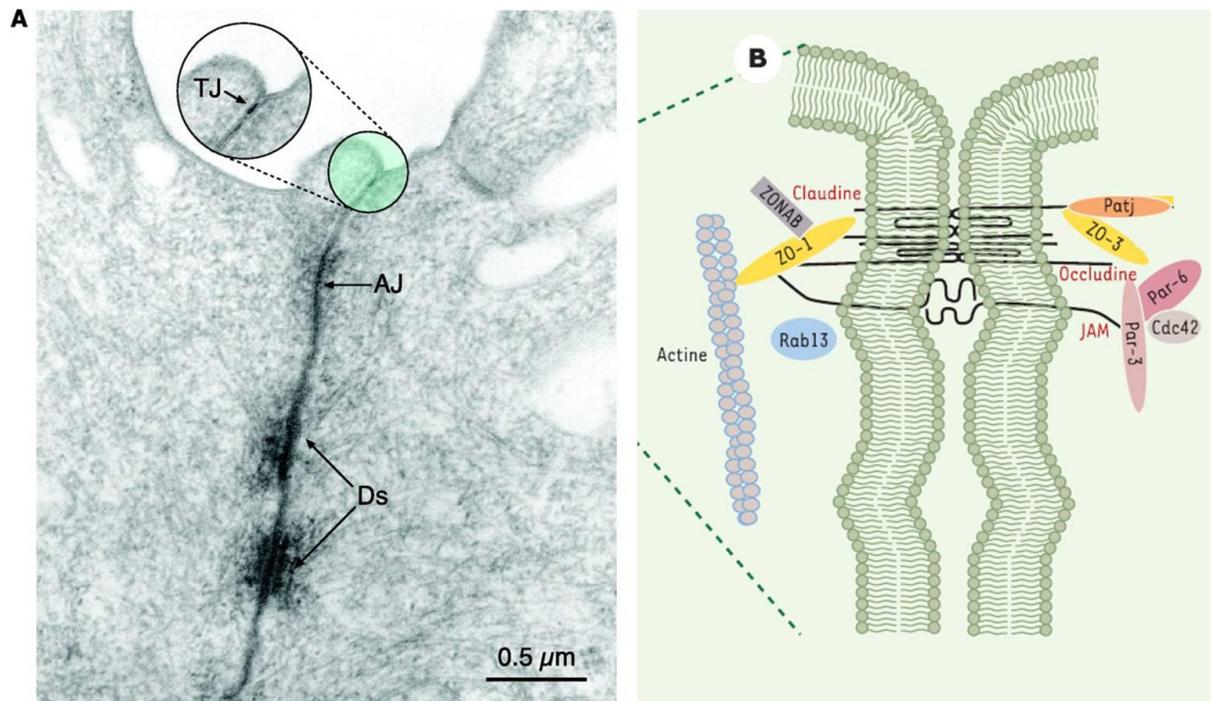
La fonction de barrière de l'urothélium est avant tout associée à la structure de la membrane apicale des cellules en ombrelles, dont la résistance est exceptionnellement importante, entre 20,000 et 75,000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . De plus au niveau des jonctions serrées, la résistance approche de l'infini. (Lewis SA, 1976) Le complexe jonctionnel est une zone d'attachement entre les cellules épithéliales divisant les deux compartiments membranaires: apical et basolatéral. Il forme une barrière très sélective régulant le passage des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire, contribuant au maintien de la polarité cellulaire, car il sépare les protéines et les lipides de la membrane apicale et de la membrane basolatérale. (Zahraoui A, 2004) Au niveau des cellules en ombrelles, le complexe

jonctionnel est composé de trois structures: la jonction serrée, les jonctions adhérentes, et les desmosomes (Figure 1 A). Ces derniers forment de petites plaques individuelles arrondies qui se trouvent juste au-dessous des jonctions adhérentes. Les desmosomes sont aussi présents tout au long de la surface basolatérale. Si les jonctions adhérentes et les desmosomes ont comme rôle principal l'adhésion cellulaire et le maintien de la structure épithéliale, la jonction serrée joue un rôle de «porte», régulant les échanges paracellulaires, empêchant les protéines et les lipides de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale, et inversement (Anderson JM, 2004; Angelow S, 2008).

*Les jonctions serrées* dans les cellules en ombrelles apparaissent, en microscopie électronique, comme des points situés tout près de la membrane apicale, entre deux cellules adjacentes, et sont formées d'un réseau très dense de protéines membranaires, constitué par l'occludine, les claudines, les '*junctional adhesion molecules*' (JAM) et, probablement, le «récepteur associé à l'adénovirus Cocksackie» (CAR) (Acharya P, 2004). Ces protéines constituent le noyau d'un échafaudage moléculaire relié aux multiples protéines cytoplasmiques. Le nom Occludine provient du latin *occludere* – enfermer. L'occludine est le produit d'un seul gène qui donne naissance à deux variantes de protéines transmembranaires d'un poids moléculaire de 64 kDa, et est constituée d'une chaîne polypeptidique à quatre domaines transmembranaires (González-Mariscal L, 2003). Une autre famille de protéines, d'au moins 24 isoformes et d'un poids moléculaire de 20-25 kDa, s'appelle les Claudines, dont le nom est aussi issu du latin *claudere* – fermer. Les claudines possèdent, elles aussi, quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. Les protéines JAM, est constituée par des protéines glycosylées d'un poids moléculaire de 43 kDa avec un seul domaine transmembranaire, une longue région extracellulaire, de 215 acides aminés, et une partie intracellulaire de 45 acides aminés (González-Mariscal L, 2003).

Les claudines, l'occludine et les JAM interagissent *via* leurs domaines extracellulaires avec ceux de la cellule voisine pour établir le contact intercellulaire. Les claudines

s'organisent sous forme des polymères pour former des pores permettant une diffusion sélective des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire (Zahraoui A 2004). Les extrémités carboxyterminales intracellulaires de ces trois molécules contiennent un motif d'acides aminés (Ser/Thr-X-Val/Ile) qui est reconnu par les domaines PDZ. Ces domaines sont des adaptateurs moléculaires permettant la liaison de diverses protéines, comme, par exemple, les protéines de la *zonula occludent*: ZO -1 ZO -2 et ZO -3 qui, à leur tour sont attachées aux éléments du cytosquelette (comme l'actine). (Figure 1 B) (Matter K, 2003; Angelow S, 2008; Acharya P, 2004; González-Mariscal L, 2003).



**Figure 1. Le complexe jonctionnel serré**

**A** : Le complexe jonctionnel serré des cellules en ombrelles.

Les positions des jonctions serrées (*Tight junction-TJ*), des jonctions adhérentes (*Aderent junctions –AJ*), et des desmosomes (Ds) sont indiquées par des flèches. (Khandelwal P, 2009)

**B** : Composants et organisation des complexes protéiques constituant les jonctions serrées.

*Zonula occludens* 1 et 3 (ZO-1 ZO-3) ; Différents types de régulateurs : ZO-1 associated nucleic acid protein (ZONAB), des petites protéines G régulatrices : Rab13 sont impliquées dans l'arrimage des vésicules de transport à la membrane basolatérale; *Junctional adhesion molecule*(JAM) ; *Protein associated with Lin-7* (*Pals*), *Pals associated tight junction* (Patj) et *partition ing defective* 3 et 6 (Par-3 et 6) sont des protéines à domaines PDZ ; et *Cell-division control protein 42* (Cdc42) ( Selon Zahraoui A, 2004)

Chez les mammifères, la protéine JAM sert aussi de point d'ancrage à Par-3, permettant le recrutement du complexe Par-6/Par-3/PKC $\alpha$ , et la formation de nouvelles jonctions adhérentes et serrées. (Zahraoui A, 2004) La protéine ZO-1, se lie avec d'autres protéines cytoplasmiques et peut être impliquée dans la transduction de signaux régulateurs du transport paracellulaire (Acharya P, 2004 ; Matter K 2003). L'expression des différentes claudines a été bien caractérisée dans les cellules urothéliales. Les claudines -4, -8, -12 et probablement -13 sont exprimées dans l'urothélium de la vessie chez le rat, la souris et le lapin. Les claudines 8 et 12 sont localisées plus spécialement dans les jonctions serrées de la membrane apicalo-latérale des cellules en ombrelles, et la claudine-4 est associée surtout avec la membrane basolatérale des cellules en ombrelles, ainsi qu'avec la membrane apicale des cellules intermédiaires adjacentes (Acharya P, 2004). Les claudines-3, -4, -5 et -7 ont été retrouvées au niveau de l'uretère de l'urothélium humain avec des localisations précises de claudines-3 dans les jonctions serrées au niveau apical des cellules en ombrelles, les claudines-5 dans les surfaces baso-latérales des cellules en ombrelles, les claudines-4 dans les espaces intercellulaires des toutes les couches des cellules urothéliales et les claudines-7 au niveau des membranes des cellules basales et intermédiaires (Varley CL, 2006).

Il n'est pas exclu que les protéines des jonctions serrées aient aussi une autre fonction dans la régulation du trafic membranaire suite au changement de volume des cellules en ombrelle lors du remplissage et de la vidange de la vessie. Le dysfonctionnement des jonctions serrées au cours des maladies urothéliales comme la cystite interstitielle, les cystites bactériennes, mais aussi en cancérogenèse est le sujet de plusieurs études actuelles (Wein AJ, 2005).

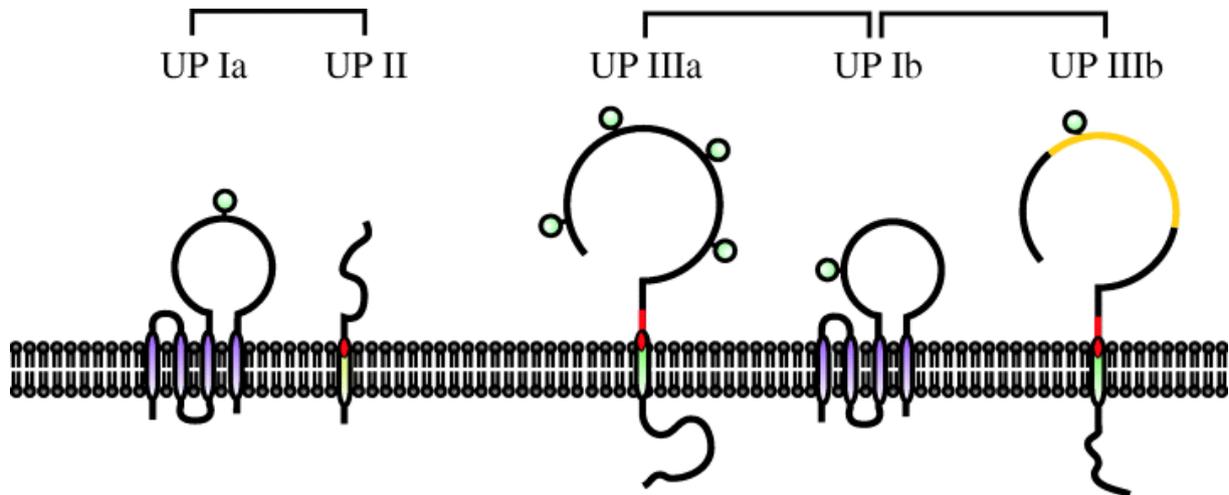
## IV. UROPLAKINES

---

Chez les mammifères supérieurs comme les bovins ou les humains qui possèdent un urothélium épais, les uroplakines sont détectées essentiellement dans la couche des cellules en ombrelle; en revanche, chez les rongeurs qui ont l'urothélium moins épais (3-4 couches cellulaires), les UPs sont retrouvées aussi dans les cellules intermédiaires sous-jacentes.

### *1. Caractéristique des protéines*

Les UPs appartiennent à une famille de quatre protéines transmembranaires UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa et UPIIIb qui en s'associant constituent un composant essentiel de la membrane plasmique asymétrique (AUM). (Figure 2). Le nom AUM vient du fait que les parties extracellulaires des UPs sont plus importantes que leurs domaines cytoplasmiques : le feuillet extérieur de la membrane apicale est deux fois plus épais que le feuillet intérieur (Wu XR, 1993; Lin JH, 1994; Garcia-Espana A, 2006). La structure des UPs est hautement préservée entre les différents mammifères : bovins, rongeurs et l'Homme (Wu XR, 1994).



**Figure 2 Les Uroplakines**

Le schéma représente la structure des uroplakines (UP): UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa, UPIIIb. Les parenthèses indiquent les interactions connues entre les UPs au cours de l'assemblage des plaques (Apodaca G. 2004).

Les UPIa (27 kD), et UPIb (28 kD), qui ont 40% d'homologie, sont des protéines de la famille des tétraspanines. Leur structure se caractérise par quatre régions transmembranaires et deux domaines extracellulaires de tailles inégales (Wu XR, 1994). L'uroplakine UPII mature a un poids moléculaire de 15 kD. C'est une protéine constituée d'un seul domaine transmembranaire (de 25 acides aminés), une importante partie extracellulaire (de 71 acides aminés) et une très courte partie intracellulaire (Lin JH, 1994).

Enfin l'UPIII a deux isoformes: une majeure UP IIIa (47kDa) et une mineure, décrite par Deng et al en 2002, UPIIIb (35kD) (Deng FM, 2002). L'UPIII est constituée d'un seul domaine transmembranaire, d'une boucle N-terminale extracellulaire, et d'une importante partie C-terminale intracellulaire, composée d'environ 50 acides aminés qui semble jouer un rôle très important, surtout pour l'UPIIIa, car elle constitue un point d'ancrage des plaques urothéliales avec le cytosquelette. Sa phosphorylation contribue à la transduction des signaux intracellulaires. (Wu XR, 1993; Lin JH, 1994; Sun TT, 2006)

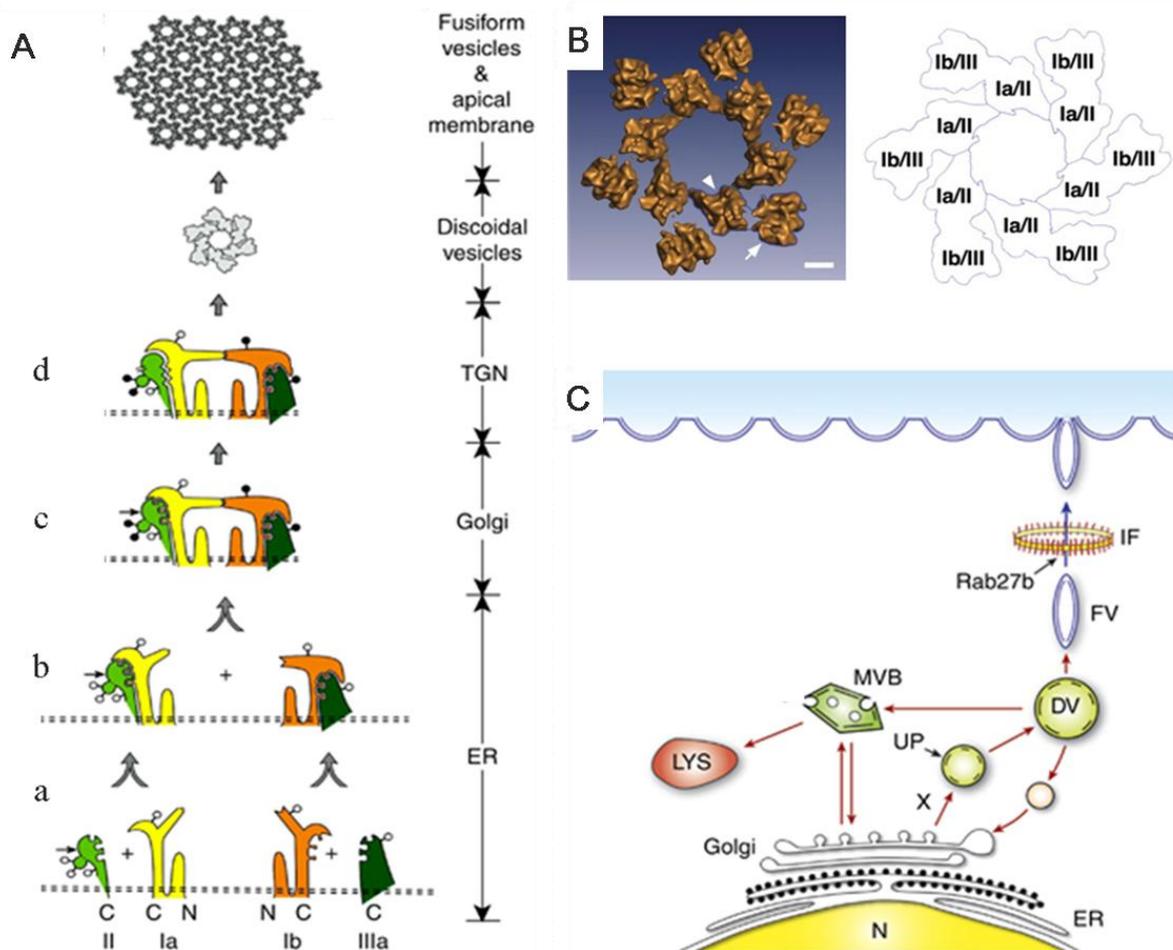
## 2. Assemblage des uroplakines sur la membrane apicale et l'exocytose

L'AUM est constituée de plaques urothéliales de 0.3-1µm de diamètre qui occupent 70% à 90% de la surface urothéliale (Balestreire EM, 2007; Wu XR 2009). Les éléments de ces plaques sont essentiellement les UPs, provenant des vésicules fusiformes présentes en abondance dans le cytoplasme des cellules en ombrelles. Ces vésicules transportent les uroplakines entre le réseau trans-golgien (*trans-Golgi network*) et la membrane apicale, particulièrement au cours du changement de la surface apicale des cellules en ombrelles, pendant les phases de remplissage et de la vidange de vessie (Minsky BD, 1978; Lewis SA, 1982; Hicks RM. 1965; Porter KR, 1967)

La structure très particulière des UPs permet leur dimérisation pour former ensuite des hétérotétramères qui constituent des particules cristallines de 16 nm tapissant la surface apicale des cellules en ombrelles. Les UPs sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE). Immédiatement après leurs synthèses, les UPs sont glycosylées, ce qui permet la formation de deux hétérodimères (Figure 3A, stade a et b) (Tu L, 2002) : UPIa s'hétérodimérise avec pro-UPII, et UPIb avec UPIIIa ou UPIIIb (UPIa/pro-UPII et UPIb/IIIa). Dans le réseau Trans-Golgien (*trans-Golgi network*) (TGN), la pro-UPII est clivée ensuite par une protéase (furine) initiant l'oligomérisation des dimères UPIa/II et UPIb/IIIa(IIIb) et la formation des particules qui assemblent l'AUM. (Figure 3 A : étape d) (Hu CC, 2005). Les UPIa et UPIb interagissent par leurs domaines transmembranaires avec les UPII et les UPIII respectivement formant des « structures-tiges ». Les parties extracellulaires des UPII, UPIIIa et UPIIIb s'étendent vers les domaines extracellulaires des UPIa et UPIb apparentés en s'arrangeant en hétérotétramères. Les dimères des UPIa/UPII s'organisent en cercle intérieur et les dimères des UPIb/UPIIIa (UPIIIb) forment un cercle extérieur. Les interactions entre ces deux cercles se font par les régions extracellulaires des UPII et UPIIIa (Figure 3 B) (Min G, 2006).

Après les différentes étapes de maturation dans le réseau Trans-Golgien, les UPs sont accumulées dans les grandes vésicules discoïdes (VD), (Figure 3C), où l'assemblage en structures cristallines permet la formation des plaques urothéliales. Les VD se transforment en vésicules fusiformes (FV). Ces dernières traversent le réseau des filaments intermédiaires et fusionnent avec la membrane apicale (IF) par un processus d'exocytose. Cette fusion est régulée par Rab27b (Khandelwal P, 2009). Certains VD sont dégradées sans obtenir la phase de maturité via la formation des corps multi-vésiculaires (MVB) et leur livraison aux lysosomes (LYS). Hudoklin S, Romih R. et al (Plos ONE 2011) ont montré par des méthodes de tomographie électronique et d'immuno-microscopie électronique que l'appareil de Golgi est le site de la glycosylation et de tetramérisation des UPs. La formation progressive des plaques urothéliales a lieu principalement dans les différents compartiments post-Golgiens et passe par les étapes suivantes:

- a. Initiation de formation des plaques : les vésicules de transport contenant les uroplakines (*uroplakin-positive transporting vesicles*) transportent des particules individuelles d'UPs et sont fusionnées avec les vésicules fusiformes immatures (*immature fusiform vesicles*);
- b. Etape centrale de la formation des plaques urothéliales : formation des particules d'uroplakines en plaques dans les vésicules fusiformes immatures.
- c. Phase finale de la formation des plaques : la plaque urothéliale atteint sa taille finale, les vésicules fusiformes immatures sont transformées en «vésicules fusiformes matures » (*mature fusiform vesicles*), ces dernières sont prêtes à la fusion avec la membrane apicale (Hudoklin S, 2011).



**Figure 3 : Structure et assemblage des uroplakines sur la membrane apicale**

**A :** Schéma représentant l'assemblage de quatre uroplakines majeures (UPIa, Ib, II, et IIIa) en cristaux bi-dimensionnels de particules urothéliales.

L'étape a et b : les quatre uroplakines acquièrent les glycanes riches en mannose dans le réticulum endoplasmique et forment deux hétérodimères (UPIa/II et UPIb/IIIa). La petite flèche horizontale près de l'UPII marque le site de son clivage par la protéase furine. Au niveau de l'appareil de Golgi les glycanes sont présentes sur deux ou trois sites pour la N-glycosylation de la pro-UPII (stade c) les petits cercles noirs représentent les glycanes riches en mannose. Le clivage par une protéase furine a lieu au niveau du réseau trans-golgien TGN (d), ce qui déclenche l'oligomérisation.

**B :** La reconstruction en 3 dimensions des particules de l'AUM déterminée par cryo-microscopie électronique. Le cercle intérieur est constitué des hétérodimères des Uroplakines (UPs) UPIa/UPII. Le cercle extérieur est composé des hétérodimères UPIb/UPIII(a/b)

**C :** La représentation du transport des vésicules dans les cellules en ombrelle.

Les hétérodimères des UPs s'assemblent dans le réticulum endoplasmique (ER), sont modifiés dans l'appareil de Golgi et s'accumulent dans les petites vésicules du réseau trans-Golgien (*trans-Golgi network*) (TGN). Par la suite, les UPs forment des vésicules discoïdes (VD), puis des vésicules fusiformes (FV) matures traversent le réseau des filaments intermédiaires (IF) et fusionnent avec la membrane apicale.

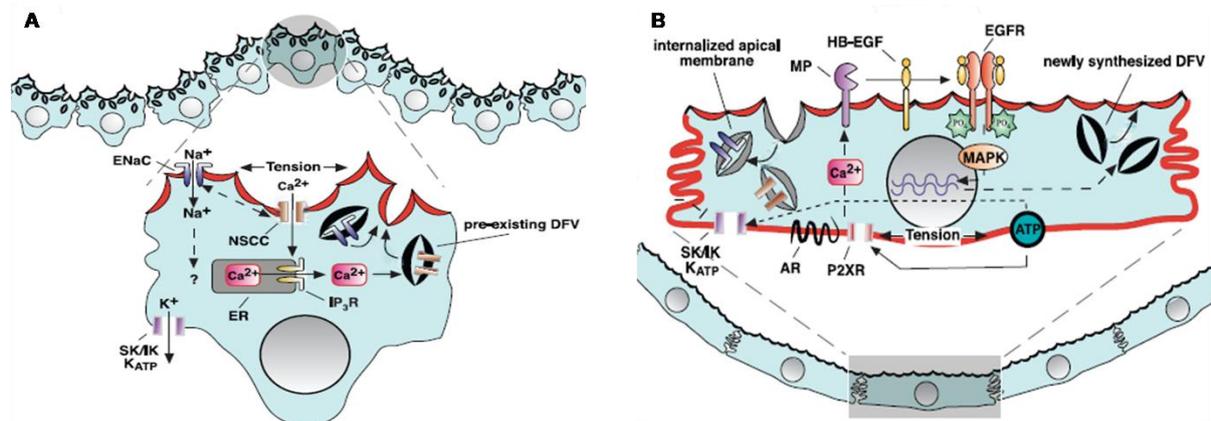
Le renouvellement des UPs se fait grâce à des mécanismes d'exocytose qui sont décrits ci-dessous. (selon Min G, 2006)

### 3. Régulation de l'exocytose des DFV

L'exocytose des DFV est contrôlée par une famille de protéines : les Rab GTPases qui sont impliquées dans le transfert des particules et dans la fusion des DFV avec la membrane apicale (Ménager MM, 2007). Dans les cellules urothéliales, 12 différents mARN de Rab (ou Rab-relatives protéines) ont été détectées par RT-PCR: Rab4, Rab5, Rab8, Rab11, Rab13, Rab15, Rab27b, Rab28, Rab32, RhoA, RhoC, et Ras1 (Chen Y, 2003). La protéine Rab27b est exprimée en abondance par les cellules en ombrelles, colocalisée avec les DFV et l'UPIIIa, ce qui suggère son rôle dans la coordination de la délivrance des DFV vers la membrane apicale (Tiwari S, 2003) alors que Rab 11a est responsable de la régulation de la fusion et de l'exocytose des DFV à la membrane (Khandelwal P, 2008). La fusion des DFV à la membrane apicale est réalisée grâce l'interaction du complexe transmembranaire *trans-membrane-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protéine recepto t-SNAREs* (présent sur la membrane apicale de la cellule avec la *v-SNARE protéine-2 vesicle-associated membrane protein-2*) de la vésicule fusiforme, qui aboutit à une formation de pore de fusion. Cette fusion a probablement lieu dans les régions dépourvues de plaques (c'est à dire les régions charnières) (Hicks M. 1975). Les UPII et UPIIIa (UPIIIb) sont délivrées vers la membrane plasmique uniquement après hétérodimérisation avec leurs homologues UPIa et UPIb. L'UPIb peut sortir du réticulum endoplasmique et migrer vers la membrane apicale sous forme non dimérisée.

Il est important de noter qu'en l'absence de stimuli mécaniques, le processus de l'endo-exocytose au niveau des cellules en ombrelles n'existe quasiment pas (Truschel ST, 2002). Yu et al en 2009 utilisant la «chambre à étirement» (*stretch chamber*) montrent que la migration des DFV dans les cellules en ombrelles est déclenchée par des forces mécaniques au niveau apical et basolatéral (Yu W, 2009). Dans le stade précoce de l'étirement, les vésicules déjà préexistantes dans le cytoplasme des cellules en ombrelle remontent vers la membrane apicale. Au moment du remplissage de la vessie, quand l'urothélium est « déplié »,

la tension augmente au niveau du pôle apical des cellules en ombrelles et déclenche l'ouverture des canaux cationiques non sélectifs (*nonselective cation channel NSCC*), qui stimulent le flux entrant de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Cette augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum endoplasmique via l'activation du récepteur de l'Inositol Trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ), conduit à la fusion des DFV à la surface apicale des cellules en ombrelles. Cette exocytose peut être amplifiée par la stimulation de certains canaux présents à la membrane apicale comme, par exemple, le canal sodium épithélial ENaC (Epithelium sodium channel) (Figure 4 A) Lorsque la vessie est pleine, l'*heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF), exprimé à la surface apicale des cellules en ombrelles est clivé par une métalloprotéase (jusqu'à présent inconnue). Ce clivage permet la fixation de HB-EGF au récepteur de l'EGF (EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*), lui aussi présent à la surface apicale. L'activation de la voie EGFR entraîne la cascade ERK, p38 et MAPK qui déclenche la synthèse de nouvelles uroplakines (Figure 4 B). Le stretch induit également le relargage d'ATP par les cellules en ombrelles (Knight GE, 2002; Wang EC, 2005), qui agit de manière autocrine en se liant avec son récepteur (P2X), qui, à son tour, active la voie EGFR (Khandelwal P, 2009)



**Figure 4 L'exocytose sur la membrane apicale de cellules en ombrelles**

A) L'exocytose au début du remplissage de la vessie est caractérisée par une remontée des vésicules (DFV) présentes : NSCC - *non selective cation channel*, IP<sub>3</sub>R - Inositol Trisphosphate Recepteur, ENaC - canal épithélial de sodium.

B) L'exocytose à un stade tardif (vessie pleine) induit la synthèse de novo d'uroplakines et la formation des nouvelles DFV via l'activation de la voie EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ; HB-EGF - *heparin-binding epidermal growth factor*. P2XR - les récepteurs des purines de type 2. (Khandelwal P, 2009)

#### 4. Endocytose des cellules en ombrelles

Après la miction, l'urothélium doit rapidement diminuer sa surface. L'endocytose des plaques urétrales est une des possibilités d'ajustement de la superficie. L'endocytose a été initialement proposée comme une voie de stockage des plaques urothéliales à l'intérieur des cellules en ombrelles afin de diminuer la superficie des cellules après la miction (Hicks RM, 1975). Il est reconnu actuellement que la majorité des DFV sont synthétisées de nouveau après chaque cycle mictionnel (Amano O, 1991; Porter KR, 1967) Les vésicules de l'endocytose, deviennent des endosomes de tri (*sorting endosomes*) puis des corpuscules multivésiculaires (*multivesicular bodies*) (MVB) qui livre les UPs pour dégradation aux lysosomes (Tiwari S, 2003).

Curieusement, l'endocytose dans les cellules en ombrelles est provoquée non seulement par la vidange de la vessie, mais aussi par l'étirement dû au remplissage (*stretch-induced endocytosis*). Dans cette dernière circonstance, l'endocytose a lieu simultanément à l'exocytose, et semble induite par une augmentation de la pression et de l'étirement au niveau

basolatéral des cellules en ombrelles. Cette pression est transmise à des intégrines, famille de glycoprotéines membranaires qui ont un rôle de récepteur d'adhésion cellulaire. (Katsumi A, 2004 Schwartz MA, 2001) La signification physiologique de l'endocytose dans cette circonstance n'est pas bien connue; elle sert probablement à internaliser les canaux et les récepteurs de la membrane apicale (Khandelwal P, 2009).

## **5. Fonctions des UPs**

En plus de leur fonction essentielle de formation et de maintien de la barrière entre l'urine et les milieux intérieurs de l'organisme (Hu P, 2000 ; Hu P, 2002), les uroplakines sont impliquées dans un large spectre de processus physiologiques et physiopathologiques, en rapport avec le bon fonctionnement de la vessie (Aboushwareb T, 2009), et le développement normal des voies excrétrices (Jenkins D, 2006). L'UPIa a également un rôle particulier : il sert de récepteur à *l'Escherichia coli* uropathogène (ECU). (Liang F, 1999) Les UPs servent également de site d'accrochage des éléments du cytosquelette à la membrane apicale (Wu XR, 1990).

La génération de souris KO, déficientes en UPs a permis de mieux évaluer et de préciser les fonctions des UPs et notamment leur fonction de barrière.

### **5.a. Rôle des UPs dans la perméabilité urothéliale et le reflux vésico-urétéral primaire (RVUP)**

La génération de souris KO, déficientes en UPs a permis de mieux évaluer et de préciser les fonctions des UPs. *Hu et al*, en 2000 ont généré des souris monozygotes invalidées pour UPIIIa (Hu P, 2000). Ces souris présentent de petites cellules en ombrelles, dont la membrane apicale est composée de plaques urothéliales de petites tailles, avec un élargissement des régions charnières. Les plaques urothéliales de petites tailles sont constituées des dimères UPIb / UPIIIb (Kong XT, 2004). Dans le cytoplasme de ces cellules,

les vésicules discoïdes immatures prédominent sur les vésicules fusiformes matures, et l'expression de l'UPIb est cytoplasmique diffuse et non apicale. Par ailleurs, ces souris présentent des anomalies de formation des voies excrétrices: élargissement de l'orifice urétéro-vésical, reflux vésico-urétéral et hydronéphrose dans 70% des cas (Hu P, 2000).

L'invalidation de UPII est responsable de modifications majeures du phénotype non seulement des cellules en ombrelle, mais aussi de l'urothélium tout entier. Ce dernier devient hyperplasique, de trois à six fois plus épais, par rapport à l'urothélium normal. Cette hyperplasie est liée à une prolifération accrue des cellules basales (augmentation d'environ 11% par rapport à l'urothélium normal). Cette prolifération est expliquée par les auteurs par une augmentation de la perméabilité urothéliale. Les cellules superficielles sont cuboïdes avec de nombreuses vésicules cytoplasmiques petites et rondes, qui remplacent les vésicules fusiformes. Ces cellules sont dépourvues de plaques urothéliales sur leur surface apicale. L'absence d'UPII s'accompagne également d'un reflux vésico-urétéral. L'hydronéphrose et l'insuffisance rénale obstructive observé chez ces souris, soit expliqué non seulement par la présence de ce reflux, mais aussi par l'obstruction urétérale générée par l'hyperplasie de l'urothélium (Kong XT 2004).

Chez l'Homme, les causes génétiques de reflux vésico-urétéral primaire (RVUP) ne semblent pas en rapport avec des anomalies des UPs. Jiang S et al ont étudié en 2004 une population de 76 patients atteints d'un RVUP, et seulement deux mutations « faux-sens », ont été retrouvées: une sur le gène d'UPIa et une autre sur le gène d'UPIII (Jiang S, 2004). Une autre étude menée sur 25 patients avec RVU primaire n'a trouvé aucune mutation du gène de l'UPIII (Giltay JC, 2004) Ces résultats suggèrent donc que, chez l'homme, les mutations des UPs ne semblent pas fréquentes. (Kong XT, 2004; Kelly H, 2005)

### **5. b. Implication des UPs sur la fonction vésicale**

UPII et UPIIIa ont un impact sur la fonction vésicale, et notamment sa contractilité. En effet, à l'état basal, la pression intravésicale reste basse dans la phase de remplissage et augmente rapidement pendant la miction, ce qui permet l'évacuation de l'urine. Chez les souris UPIIIa KO et UP II KO, une hyperactivité détrusorienne a été enregistrée, elle se traduit par des augmentations significatives de pression intravésicale et des contractions qui ne s'accompagnent pas de miction. Un important résidu post mictionnel est constaté chez ces souris (Aboushwareb T, 2009).

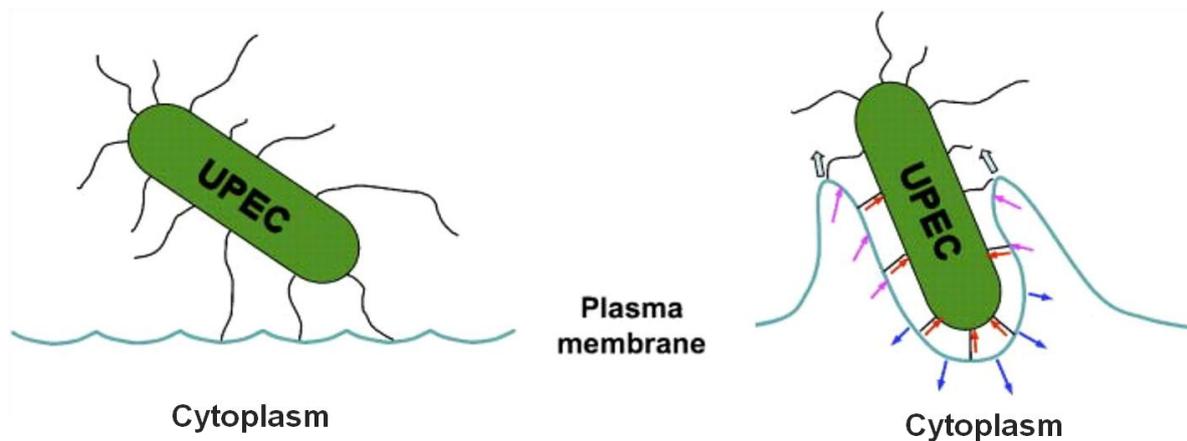
### **5. c. Rôle des UPs dans l'infection urinaire**

Bien que la phagocytose soit très limitée dans les cellules épithéliales différenciées des mammifères, les *Escherichia coli uropathogènes (ECU)* se fixent aux cellules en ombrelles grâce à la liaison des pili d'adhésion de type 1 appelés fimbriae à la molécule d'UP1a qui jouent le rôle de récepteur. Cette liaison déclenche une cascade de réactions en aval aboutissant à une phagocytose du microorganisme via un « zipper-mechanism » ou mécanisme de « fermeture-éclair ». Cet événement semble crucial au cours du début de l'infection des voies excrétrices (Finlay BB, 1997), dont *E. coli* est responsable dans plus de 80% des cas (Lewis S, 1984). Les pili de l'ECU ont des prolongements de 7 nm de diamètres et une longueur variable entre 500 et 2000 nm se terminant par des domaines spécifiques de lectine *FimH* (Hung C.S, 2002). Leurs interactions avec la membrane plasmique induisent un changement de sa structure: cette dernière perd son aspect festonné et s'enroule autour de la bactérie. Il existerait probablement des forces mécaniques d'attractions créées par les *pili* bactériens qui pourraient être supérieures à la structure rigide des plaques urothéliales. (Wang H, 2008) Ce phénomène d'« étirement » servirait également à activer une voie de signalisation aboutissant à un réarrangement du cytosquelette permettant la formation d'une

vésicule de phagocytose. *P.Cossart et P.J. Sansonetti (2004)* définissent ainsi trois étapes au cours de l'entrée des bactéries dans les cellules urothéliales:

1. Attachement de l'E.coli avec son récepteur urothélial;
  2. Formation d'une coupe de phagocytose, structure contenant les filaments d'actine qui englobe la bactérie;
  3. Fermeture de la coupe de phagocytose, aboutissant à l'internalisation du microorganisme.
- (Cossart P, 2004)

Il est intéressant de noter que chaque bactérie est enfermée dans sa propre vacuole et se tient à distance de son «enveloppe», probablement à cause de la rigidité des *pili*. Une fois internalisée, la bactérie commence une division cellulaire et forme ainsi des « colonies bactériennes intracellulaires » (*intracellular bacterial communities*), (Anderson GG, 2004)



**Figure 5 Phagocytose de l'*Escherichia coli* uropathogénique**

Les forces exercées par *E.Coli* contribuent à la formation de « coupe phagocytaire ». Les forces générées par la rétraction des *pili* (flèches rouges), s'opposent aux forces rétractiles générées par la polymérisation de l'actine (flèches bleues), les flèches de couleur magenta correspondent aux forces générées par la rétraction des pili qui auront la même direction que les forces de la polymérisation de l'actine, conduisant à la fermeture de la coupe phagocytaire (flèches transparentes) (Selon Wang H, 2008)

### *1. Transport des solutés*

Les transporteurs et les canaux ioniques présents dans l'urothélium contribuent probablement à une réabsorption et une sécrétion des électrolytes et des substances dissoutes participant ainsi à une régulation du volume, de la tonicité et de l'osmolarité des cellules urothéliales aux contacts avec l'urine, milieu ayant des variations osmotiques et de pH importantes. (Spector DA, 2002 ; Spector DA, 2011)

#### *1. a. Transport de sodium*

Un transport actif des ions sodium de l'urine vers l'urothélium vésical est connu depuis 1964. Ce transport de sodium bien que non quantifié serait peu important en débit en conditions physiologiques (Wickham JE. 1964). Il se ferait grâce au canal sodium épithélial (ENaC), localisé à la membrane apicale des cellules en ombrelle. Le transport de  $\text{Na}^+$  par l'ENaC serait couplé à une  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase, localisée au niveau basolatéral qui génère un gradient électrochimique favorisant l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans les cellules. Comme il a été décrit précédemment, l'ENaC serait aussi impliqué dans la transduction des signaux mécaniques lors de l'exocytose précoce dans les cellules en ombrelles (Xie B, 2006).

#### *1. b. Transport de potassium*

La fonctionnalité des **canaux potassiques**, ROMK Kir 1.1, qui sont exprimés à la membrane apicale des cellules en ombrelles, et Kir 6.1 au niveau des membranes basolatérales de ces cellules, n'est pas claire (Spector DA, 2008).

### ***1. c. Transport de l'urée***

Parmi les deux sous-familles de **transporteurs d'urée UT-A et UT-B**, seul UT-B est exprimé dans l'urothélium de la vessie (mais aussi au niveau de l'uretère et du pelvis rénal). Il est localisé à la membrane basolatérale des cellules en ombrelle et des cellules intermédiaires sous-jacentes (Spector DA, 2004). Lors du passage de l'urine à travers l'uretère, l'urée est réabsorbée par l'urothélium urétéral chez les rats (Walser BL, 1988).

De manière intéressante, le nombre des transporteurs d'urée augmente significativement dans l'uretère chez les animaux en restriction hydrique (Spector DA, 2004). Une étude réalisée *in vivo*, sur les vessies isolées, a montré une réabsorption de 39% de l'urée chez les rats qui étaient pendant les 24 heures précédant l'expérience en restriction hydrique, versus 18% dans le groupe de contrôle ayant accès à l'eau avant l'expérience. En revanche, chez les rats en surcharge hydrique, aucune réabsorption de l'urée n'était constatée (Spector DA, 2011). Les mécanismes de cette réabsorption sont actuellement mal expliqués car UT-B n'est pas présent au niveau de la membrane apicale des cellules en ombrelles. La diffusion d'urée pourrait avoir lieu directement à travers la double couche lipidique au niveau des 10 % de membrane apicale non couverte par des plaques (Spector DA, 2004).

## ***2. L'urothélium vésical est un senseur***

L'urothélium reçoit un large éventail de signaux provenant du milieu extérieur et joue un rôle dans la transmission des informations au réseau nerveux sensoriel localisé près des cellules urothéliales basales dans la couche sub-urothéliale, ainsi qu'au niveau des myofibroblastes sub-épithéliaux et du détrusor (Apodaca G, 2007). En réponse aux stimuli mécaniques : stretch durant le remplissage de la vessie; aux stimuli chimiques ou thermiques, les cellules urothéliales libèrent des médiateurs solubles comme l'acétylcholine, l'adénosine, ATP etc. Ces médiateurs de manière paracrine ou autocrine interagissent avec leurs récepteurs P2X, P2Y, les récepteurs d'adénosines etc. présents sur les cellules en ombrelle et participent à l'initiation et au contrôle des exo- et endocytose des DFV au niveau de la membrane apicale (Yu W, 2006). D'un autre côté, le relargage de l'acétylcholine, de l'adénosine, de l'ATP, du NO, des prostaglandines est capté par les récepteurs des nerfs afférents et déclenche la transduction du signal vers le système nerveux central. Toutefois il existe probablement aussi une action directe de ces médiateurs sur le système musculaire de la vessie.

Ces interactions permettent de coordonner et de synchroniser la fonction urothéliale de barrière avec le fonctionnement (la relaxation et la constriction) des cellules musculaires lisses, durant les différentes phases du cycle mictionnel. La perturbation du fonctionnement de ce réseau est susceptible de conduire à un dysfonctionnement de la vessie (Birder LA, 2010; Parsons CL. 2007; Apodaca G, 2007).

## VI. MECANISMES DE REGENERATION DE L'UROTHELIUM VESICAL

### 1. Généralités

L'épithélium de l'épiderme se renouvelle assez rapidement entre 36 heures et 40 jours (Weinstein GD, 1984). La durée de vie des cellules intestinales est estimée entre trois jours et trois semaines (Cremer B, 1961). L'urothélium, en revanche, malgré les changements réguliers de superficie, se renouvelle, en conditions physiologiques, très lentement : entre 6 et 12 mois avec une espérance de vie des cellules en ombrelle qui excède 3 mois. L'uroépithélium possède cependant de remarquables capacités de régénération en cas d'agression, et peut alors se reconstituer en quelques jours même si les blessures sont importantes (Hainau B 1974 ; Kreft ME, 2005). Les cellules urothéliales répondent d'abord par l'apoptose aux différentes agressions ou manipulations (Yu HJ 2004), puis par la nécrose et ensuite par la desquamation (Lavelle J; 2002; Veranic P, 2000) 24 à 48 heures après l'agression, survient une phase de prolifération intense avec reconstitution de la barrière urothéliale à partir des cellules basales (cellules progénitrices urothéliales) (Jost SP, 1989; Jones JC, 2001). Cette prolifération aboutit à une hyperplasie réversible de l'urothélium qui retrouve plus tardivement son état normoplasique avec des cellules en ombrelles bien différenciées au niveau apical (Kreft ME, 2005; Romih R, 2001).

Plusieurs facteurs de croissances peuvent, de manière paracrine ou autocrine, déclencher la prolifération des cellules urothéliales et la régénération de l'urothelium après les blessures (Lendvay TS, 2007). Les 2 voies les mieux étudiées sont : 1- la voie des récepteurs de facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor EGFR*) avec l'implication de *Epidermal growth factor* (EGF), de l'Amphiréguline (Baskin LS, 1996), de *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) et de *transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF-  $\alpha$ ) (de Boer WI, 1996); 2- la voie des récepteurs de facteur de croissance des fibroblastes 2 IIIb (*fibroblast growth factorsreceptor2IIIb FGFR2IIIb*) avec implication des ligands : *fibroblast growth factors* 1, 7, et 10 (FGF1, FGF7, FGF10) (Lendvay TS, 2007).

## **2. Récepteurs à activité Tyrosine Kinase**

Les récepteurs impliqués dans la prolifération de l'urothélium vésical sont des récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK). Les RTK font partie d'une large famille de 58 membres de récepteurs de surface cellulaire, et sont caractérisés par la liaison à un ligand dans leur région extra-cellulaire, un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Ce dernier possède un site de liaison à l'ATP, nécessaire à la phosphorylation, et un site de liaison au substrat. Les facteurs de croissance ligands interagissent avec le domaine extra-cellulaire, entraînant la dimerisation des récepteurs, ce qui initie la phosphorylation des plusieurs résidus tyrosine et entraîne l'activation des voies de signalisations intracellulaires. Les RTK sont responsables du contrôle des différents processus vitaux des cellules, comme la division cellulaire, la différenciation, la migration, l'adhésion ainsi que l'apoptose (Robinson DR, 2000).

## **3. Voie de FGFR**

Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) et leurs récepteurs (FGFRs) sont des polypeptides dont les activités biologiques sont souvent cruciales. Ils sont impliqués dans les voies fondamentales du développement tissulaire, par exemple la structuration du mésoderme de l'embryon vers les multiples systèmes (Turner N, 2010), dans plusieurs processus physiologiques y compris la régulation de l'angiogenèse, la croissance, la différenciation, la migration et la morphogénèse cellulaire (Schoorlemmer J, 2001), la réparation des différents épithéliums (Warburton D, 2004; Takenaka H, 2002), enfin l'autorenouvellement des cellules souches (Coutu DL, 2011). Une activation de la voie FGFR « aberrante », joue un rôle dans la pathogénie de nombreux cancers en favorisant le développement tumoral, par la prolifération des cellules cancéreuses, mais aussi la stimulation de l'angiogenèse et la survie de ces cellules (Wesche J, 2011).

La découverte des FGFs remonte à 1939 quand il a été démontré que l'extrait de cerveau bovin induisait la prolifération des fibroblastes *in vitro* (Mohammadi M, 2005). Actuellement, il est décrit vingt-trois membres de la famille FGF, toutefois seulement 18 sont les ligands des récepteurs FGFRs. Quatre membres de la famille FGF (FGF11, FGF12, FGF13 et FGF14) ne possèdent pas de sites de liaison avec ces récepteurs, et, restant intracellulaires, ne portent pas la fonction de ligands. Ils sont appelés aussi FHF (*FGF homologous factors*).

Les autres FGFs sont regroupés selon la structure et la phylogénèse en 6 sous-familles:

1. FGF1 et FGF2;
2. FGF3, FGF7, FGF10, FGF22;
3. FGF4, FGF5, FGF6;
4. FGF 8, FGF17, FGF18;
5. FGF9, FGF16, FGF20;
6. FGF19, FGF21 FGF23;

Les FGFs sont des glycoprotéines avec un poids moléculaire entre 17 et 34 kDa. La plupart des FGFs (FGF 3-8, 10, 17-19, 21 et 23) ont des peptides signaux N-terminaux, nécessaires pour le transport de la protéine à la membrane, et sont donc facilement sécrétés par les cellules et agissent de façon classique: autocrine ou paracrine. Les FGF 9, FGF16 et FGF20, qui ne possèdent pas de peptides signaux, sont néanmoins sécrétés via le réticulum endoplasmatique (ER). La sous-famille des FGF1 et FGF2 est sécrétée de manière indépendante de l'ER (Eswarakumar VP, 2005). Ces facteurs de croissance peuvent être libérés soit par les cellules endommagées soit par un mécanisme d'exocytose (Ornitz D.M. 2001).

Tous les FGF possèdent une région homologue de 120-130 acides aminés constituant 12  $\beta$ -brins ( $\beta$ 1– $\beta$ 12) antiparallèles. Les FGFs sont sécrétés dans la matrice extracellulaire à la surface membranaire et interagissent avec leur récepteurs par l'intermédiaire des

protéoglycanes héparine sulfate (protéines associées à la matrice extracellulaire et modifiées par l'addition de sulfate d'héparine). Les protéoglycanes héparine sulfate stabilisent l'interaction entre FGFs et leurs récepteurs (FGFRs) (Harmer NJ, 2004), protègent les ligands de la dégradation dans la matrice extracellulaire, et déterminent la diffusion des ligands (Häcker U, 2005).

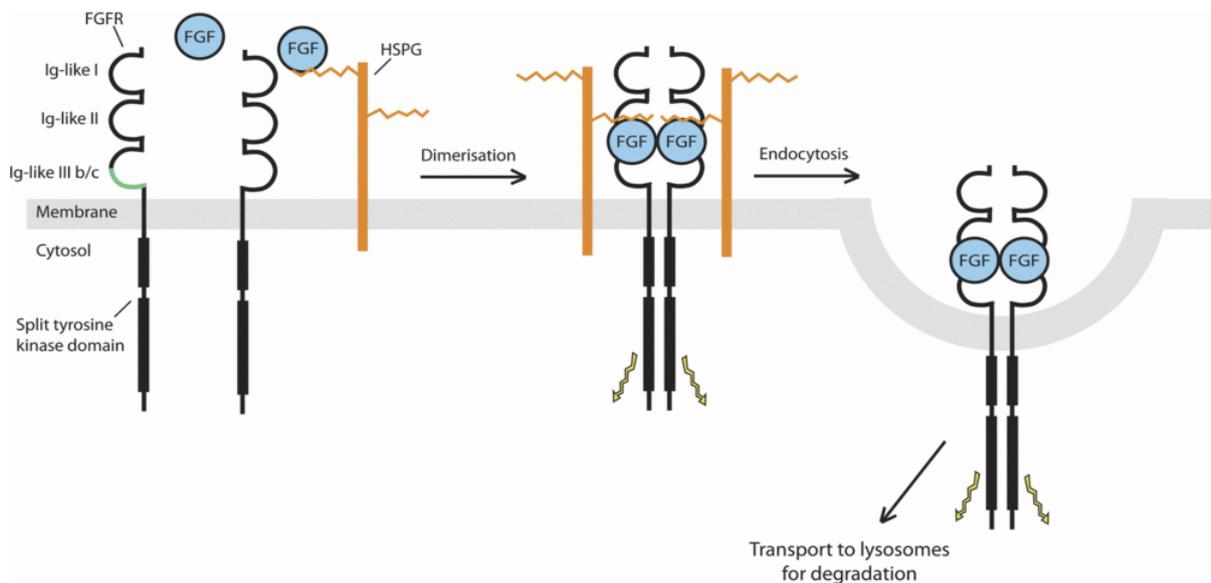
Les FGF19, FGF21 et FGF23, sont secrétés dans la circulation sanguine et ont une fonction d'hormones. Le FGF15 chez l'homme est présent par son orthologue, le FGF19.

Les dix-huit FGFs exercent leurs actions via quatre récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (FGFR1, FGFR2, FGFR3, et FGFR4) (Mohammadi M). Le cinquième récepteur FGFR5 appelé FGFR5 a été identifié en 2000 au niveau du cartilage humain et ne possède pas de domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Ayant une forte affinité pour les FGFs, c'est un récepteur decoy (leurre). Il est en concurrence avec les autres FGFRs pour l'interaction avec les ligands et est donc impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation (Wiedemann, M. 2000; Steinberg F, 2010).

Les récepteurs des FGFs ont une région N-terminale extracellulaire composée d'un peptide signal, de trois domaines de type immunoglobuline (*Ig-like I*, *Ig-like II* et *Ig-like III b/c*), d'une région acide située entre les boucles I et II constituée de séquences riches en serine, appelée aussi « la boîte acide » qui joue un rôle essentiel dans la fonction du récepteur et notamment dans son auto-inhibition (Chaudhuri MM, 1993). Le site de liaison avec les FGFs se trouve au niveau des boucles II et III. La boucle *Ig-like III* distingue les récepteurs en deux types : les isoformes a et b (FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c) avec une spécificité différente pour différents ligands. Ces isoformes sont tissus spécifiques, notamment le FGFR3b qui a une localisation épithéliale et qui est activé par les ligands secrétés par des cellules mésenchymateuses. En revanche, l'isoforme FGFR3c a une expression principalement mésenchymale et est activé par les ligands, secrétés par des cellules

épithéliales. Le FGF1 représente une exception en se liant aux deux isoformes de récepteur (Grose R, 2005)

Pour se fixer à leurs récepteurs, les FGFs doivent être préalablement dimérisés. Cette dimérisation est facilitée par l'interaction avec des glycoprotéines spécifiques: l'héparine et les sulfates d'héparine. Les sulfates d'héparine sont un des composants de la matrice extracellulaire, où ils sont présents sous la forme de protéoglycanes riches en sulfate d'héparine (HSPG) (Spivak-Kroizman T, 1994). La fixation du FGF à son récepteur induit la dimérisation du récepteur et son activation. Au final, l'unité fonctionnelle de FGF-FGFR consiste en la présence à la fois de dimères de FGF, de dimères de FGFR et de dimères de HSPG (Beenken A, 2009). La région C-terminale intracellulaire des récepteurs FGFR comprend deux sous-domaines tyrosine kinase : TK1 et TK2, interrompus par une courte séquence interkinase (Wesche J, 2011). (Figure 7)



**Figure 7 Formation du complexe FGF, FGFR, HSPG et initiation de voie FGFR**

La structure de base du FGFR est présentée à gauche. Ig-like I, Ig-like II et Ig-like III b/c correspondent à trois domaines de type immunoglobuline. Le site de distinction de deux isoformes de récepteurs FGFRb et FGFRc est représenté en vert. Le complexe est constitué d'une paire de FGF, de deux chaînes de sulfate d'héparine (HSPG) et de deux FGFR et provoque la phosphorylation par les kinases de plusieurs résidus de tyrosine dans la

partie intracellulaire du récepteur, activant, en aval, des cascades de signalisation. Après activation, le complexe est internalisé par endocytose et transporté vers les lysosomes pour dégradation (Wesche J, 2011).

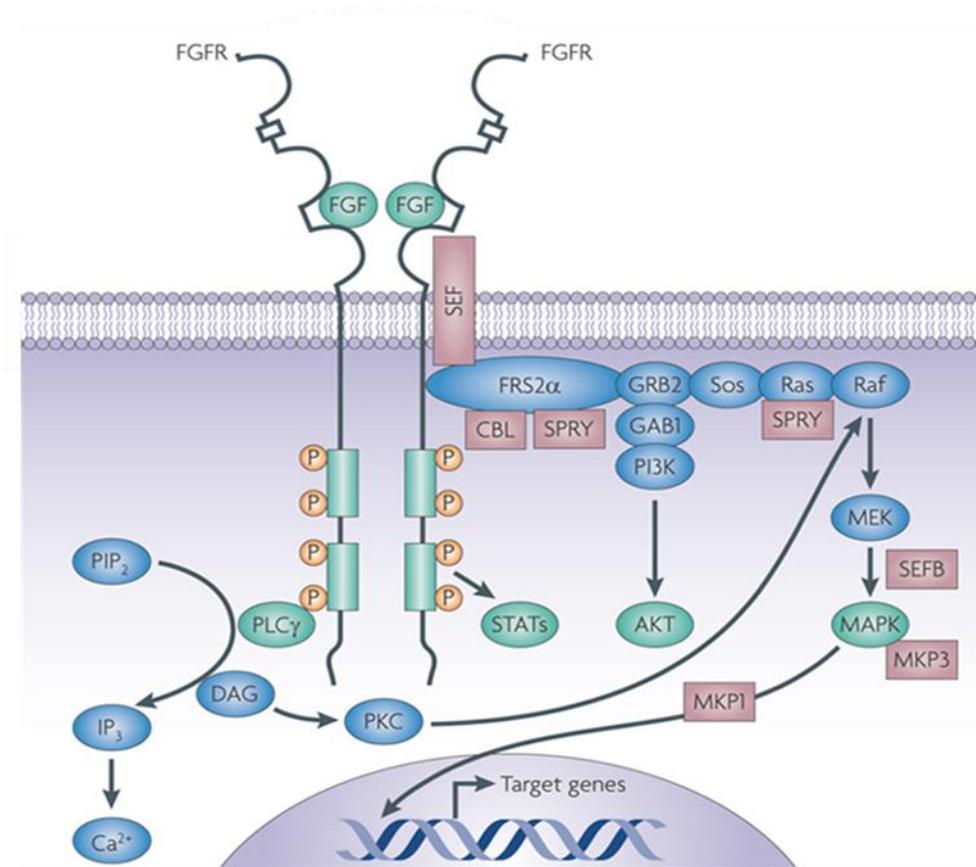
La dimérisation du récepteur en activant les sous-domaines tyrosine kinase intracellulaires induit leur autophosphorylation. Ces domaines tyrosine kinase phosphorylés servent de site d'ancrage pour des protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de plusieurs voies de transduction de signal. Une des plus importantes de ces protéines est le *FGFR substrat 2* (FRS2) car elle relie plusieurs voies de transduction de signal FGFR. Sa phosphorylation induit la fixation de protéine adaptatrice GRB2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) permettant de recruter la protéine adaptatrice SOS (*Son of sevenless*) pour activer les protéines *Ras* et *Raf* en aval et la voie de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Turner N, 2010). Indépendamment de la voie MAPK, GRB2 recrute la *GRB2-associated binding protein 1* (GAB1) et le *Phosphatidylinositol 3-kinases* (PI3K) ce qui permet l'activation d'une voie anti-apoptotique dépendant de l'AKT kinase (ou *protein kinase B*) (Altomare DA, 2005).

La PLC $\gamma$  (*phospholipase C $\gamma$* ) est une autre protéine qui se lie directement avec le domaine C-terminal du récepteur phosphorylé. PLC $\gamma$  hydrolyse PIP<sub>2</sub> (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) pour produire DAG (*diacylglycerol*) et IP<sub>3</sub> (*inositol 1,4,5-triphosphate*), ce qui déclenche la libération de calcium et active la PKC (*protein kinase C*) qui renforce en partie la voie MAPK en phosphorylant Raf.

De nombreuses autres molécules et cascades de signalisation sont décrites pour la voie FGFR, notamment STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) impliquées dans la régulation, la croissance, la différenciation, la survie ou l'apoptose. (Figure 8) (Turner N, 2010; Wesche J, 2011).

La voie FGFR possède plusieurs mécanismes d'inhibition. Tout d'abord, le récepteur dimérisé et autophosphorylé est internalisé pour être livré ensuite aux lysosomes

pour dégradation ou recyclage. (Figure 8) (Haugsten EM, 2008). La protéine *Sprouty* est une importante protéine régulatrice négative de la voie FGFR : 1- tout d'abord en se liant directement avec GRB2, elle « coupe » la transduction du signal en aval ; 2- en interagissant avec Ras, *Sprouty* empêche l'activation de Raf et donc bloque la voie MAPK (Casici T, 1999; Hacohen N, 1998). Indépendamment de *Sprouty*, la voie de MAPK peut être inhibée également par SEL, une protéine transmembranaire, qui interagit avec le domaine cytoplasmique de FGFR et bloque la phosphorylation de Raf (Kovalenko D, 2003) et par MAPK phosphatase 3 (MKP3), qui, comme SEL diminue la phosphorylation de ERK1 et ERK2 (Figure 8) (Zhao Y, 2001).



**Figure 8 Voie de signalisation FGFR**

La fixation du ligand et la dimérisation du récepteur induisent la phosphorylation des domaines à l'activité tyrosine kinase, et l'ancrage des protéines adaptatrices ce qui entraîne l'activation des quatre voies principales de transduction de signal: a) RAS/ RAF en amont de la voie MAP kinase, b) la voie anti-apoptotique PI3K/AKT, c) la voie de transduction du signal et des activateurs de la transcriptions (STAT), et d) la voie de phospholipase Cy (PLC $\gamma$ ), renforçant la voie de MAPK (en vert). La voie FGFR peut être inhibée à plusieurs niveaux par l'internalisation du récepteur ou l'induction de régulation négative par SEF, Sprouty (Spry), CBL, MAPK phosphatase 1 (MKP1) et MKP3 (en marron) (modifié Turner N, 2010).

### 3. a. Rôle de FGFR dans la régénération de l'urothélium

Plusieurs récepteurs de FGF sont exprimés par les cellules urothéliales de la vessie. Leurs rôles et fonctionnalités sont étudiés en général au cours du développement des voies excrétrices pour FGFR1 et FGFR2 (Bates CM. 2011) et au cours de la tumorigenèse urothéliale pour FGFR1, FGFR2, et FGFR3 (Tomlinson DC, 2009; Knowles MA, 2008; Knowles MA. 2007)

#### 3. a. 1. Expression de FGFR2IIIb dans l'urothélium vésical

Le récepteur FGFR2IIIb est présent dans l'urothélium normal. Ce récepteur est exprimé dans toutes les couches cellulaires y compris au niveau de la membrane apicale des cellules en ombrelle mais davantage au niveau des cellules basales (Zhang D, 2006) FGFR2IIIb est activé avec une forte spécificité par FGF-1, FGF-3, FGF-7, FGF-10 et de manière moins exclusive par FGF 21 et FGF22 (Figure 9) (Umemori H, 2004; Kaess BM, 2010).

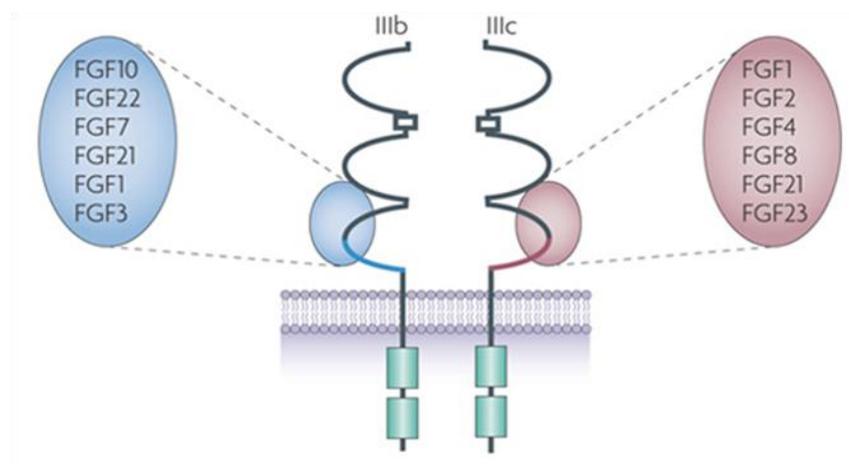


Figure 9 La spécificité du FGFR2IIIb et FGFR2IIIc (Turner N, 2010)

Les ligands de FGFR2IIIb sont synthétisés dans la *lamina propria* de la vessie, traversent la membrane basale et interagissent avec le récepteur situé au niveau des cellules basales de l'urothélium pluristratifié. (Figure 10) (Tash JA, 2001)

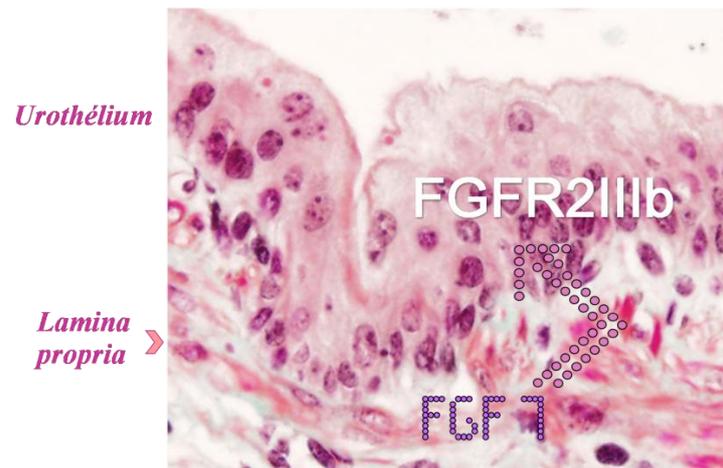


Figure 10 L'interaction entre le mésenchyme de la vessie et l'urothélium (selon Tash JA, 2001)

### 3. a. 2. Les ligands de FGFR2IIIb impliqués lors de la régénération de l'urothélium vésical

#### *FGF7*

Le FGF7 aussi connu comme le facteur de croissance des kératinocytes (KGF *Keratinocyte Growth Factor*) est synthétisé et sécrété par les cellules stromales mésenchymateuses situées au contact des cellules épithéliales et agit comme un médiateur paracrine sur la prolifération des cellules épithéliales. Dans un modèle d'obstruction partielle de la vessie, une augmentation des mARN de FGF7 est observée entre 48h et une semaine, entraînant la prolifération des cellules urothéliales vésicales (Baskin LS, 1996). Une autre étude a démontré une augmentation de 6 à 8 fois de la quantité de mARN de FGF7 à 12 heures après la blessure chirurgicale de la vessie (Baskin LS, 1997). FGF 7 induit la prolifération *in vivo* de l'urothélium normal, en absence de situations pathologiques préalables. En effet, l'injection répétée de FGF7 recombinant chez le rats et chez le macaque

rhésus induit la prolifération des cellules urothéliales de la vessie du bassinet et des canaux collecteurs (Yi ES, 1995) où le récepteur FGFR2IIIb est exprimé (Bonventre JV, 2003 ; Powers CJ, 2000). FGF7 est, de plus, un des facteurs essentiels à la pluristratification de l'urothélium vésical *in vivo*. En effet, les souris invalidées pour FGF7 (*Fgf7<sup>-/-</sup>*) sont dépourvues de cellules urothéliales intermédiaires. Leur urothélium vésical est composé uniquement de 2 ou 3 couches de cellules (Tash JA, 2001). En revanche, les injections quotidiennes pendant 14 jours de 100µg de *Palifermin* (FGF7 recombinant), chez des souris, non seulement stimulent la prolifération des cellules urothéliales mais aussi augmentent le nombre de couches des cellules de l'urothélium de la vessie. De manière intéressante, les souris déficientes pour FGF7 répondent également à l'obstruction partielle de la vessie par une prolifération des cellules urothéliales. Il est probable que le déficit de FGF7 est compensé par une synthèse de FGF10 ou par des ligands d'EGFR (Lendvay TS, 2007).

### ***FGF 10***

Plusieurs publications suggèrent que FGF 10 est engagé également dans la régulation de la croissance, la différenciation, et la réparation de l'urothélium. Sa structure est proche de celle de FGF7 et il interagit avec la même spécificité sur FGFR2IIIb (Igarashi M, 1998). La protéine FGF 10 est détectée dans les fibroblastes de la *lamina propria*, dans les cellules musculaires lisses de *submucosa*, et dans les cellules urothéliales. En revanche les mRNA de FGF 10 sont présents surtout au niveau de *lamina propria*, et absentes au niveau des cellules urothéliales vésicales (un argument en faveur de la synthèse mésenchymateuse de protéine) (Zhang D, 2006). Comme FGF7, FGF 10 induit la prolifération des cellules urothéliales humaines *in vitro*. Les injections de FGF10 recombinante chez une souris de contrôle pendant 14 jours augmentent également le nombre des couches de cellules urothéliales vésicales de 4-5 à 20, et de manière spectaculaire induisent la prolifération et augmentent le nombre des couches cellulaires dans l'urothélium de la vessie chez la souris *Fgf7<sup>-/-</sup>* (Bagai S,

2002). Les données de la littérature montrent que synthétisées au-dessous de la membrane basale, les particules de 4- 5-nm de protéine FGF-10 traversent la membrane basale de  $82 \pm 49$  nm d'épaisseur (Abrams GA, 2003; Yeh BK, 2003). Les expériences *in vivo* montrent que FGF10, comme FGF7, (ensemble ou en se substituant), est un des médiateurs des interactions épithelio-mésenchymales urothéliales, et de manière paracrine régule la croissance de l'urothélium normale mais est aussi impliqué dans la réparation de l'urothélium vésical.

### ***Autres ligands de FGFR2IIIb***

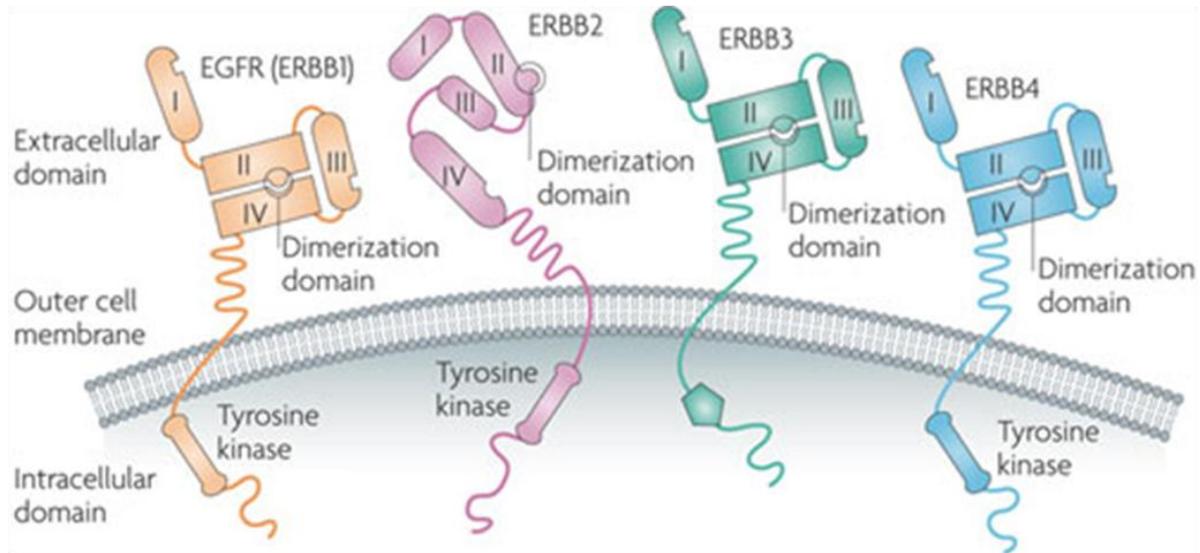
Dans les cellules urothéliales en culture, **FGF1** semble stimuler la migration cellulaire et la formation des multicouches, imitant la pluristratification (Rebel JM, 1994). *In vivo* dans le modèle de l'étirement de la vessie par un sur-remplissage de 5 minutes, le FGF1 est surexprimé au niveau de l'urothélium au cours des premières 24h après la manipulation (de Boer WI, 1994).

A notre connaissance, il n'y a pas de publication évoquant le rôle et l'expression des **FGF22** et **FGF 23** dans l'urothélium.

#### 4. Voie d'ErbB

Décrit en 1962, la protéine EGF a reçu son nom pour ses propriétés à induire la prolifération des cellules épithéliales. Son récepteur a été isolé en 1974 et cloné en 1984 au niveau des cellules placentaires normales et d'une lignée de cellules tumorales (Wheeler DL, 2010). La famille, historiquement appelée EGFR, est impliquée dans le développement et le fonctionnement des différents organes : peau, cœur, poumons, voies excrétrices. De façon générale, l'EGFR règle la différenciation, la croissance et le contrôle du métabolisme cellulaire; leurs mutations sont impliquées dans l'oncogenèse. Cette famille de récepteurs porte différents noms: Erbb, d'après leur analogie avec un oncogène d'un virus : l'érythroblastose aviaire; HER pour *Human Epidermal Growth Factor Receptor* ou enfin EGFR pour *Epidermal growth factor receptor*. Ce sont les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase et ubiquitaires (Yarden Y, 2001).

La famille Erbb chez l'homme (HER) contient quatre récepteurs homologues et onze ligands: EGFR soit (ErbB1/HER1); HER2 appelé aussi « Neu » (oncogène chez le rat) (ErbB2) ; HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Tous les membres de la famille possèdent un domaine extracellulaire (appelé ectodomaine) composé de quatre sous-domaines (I-IV), dont les sous-domaines I et III servent pour l'interaction avec les ligands (Yarden Y, 2001). La région extracellulaire poursuivie par un court domaine transmembranaire de 23-24 acides aminés se prolonge du côté intracellulaire par un domaine juxtamembranaire dont le rôle n'est pas clair, une partie à activité tyrosine kinase et un domaine C- terminal, riche en sites de phosphorylation dont le rôle est très important pour la transduction de signal, Figure 11 (Holbro T, 2003; Holbro T, 2004).



**Figure 11 Structure des quatre membres de la famille de récepteur Erbb (ErbB1; Erbb2; Erbb3; Erbb4)**

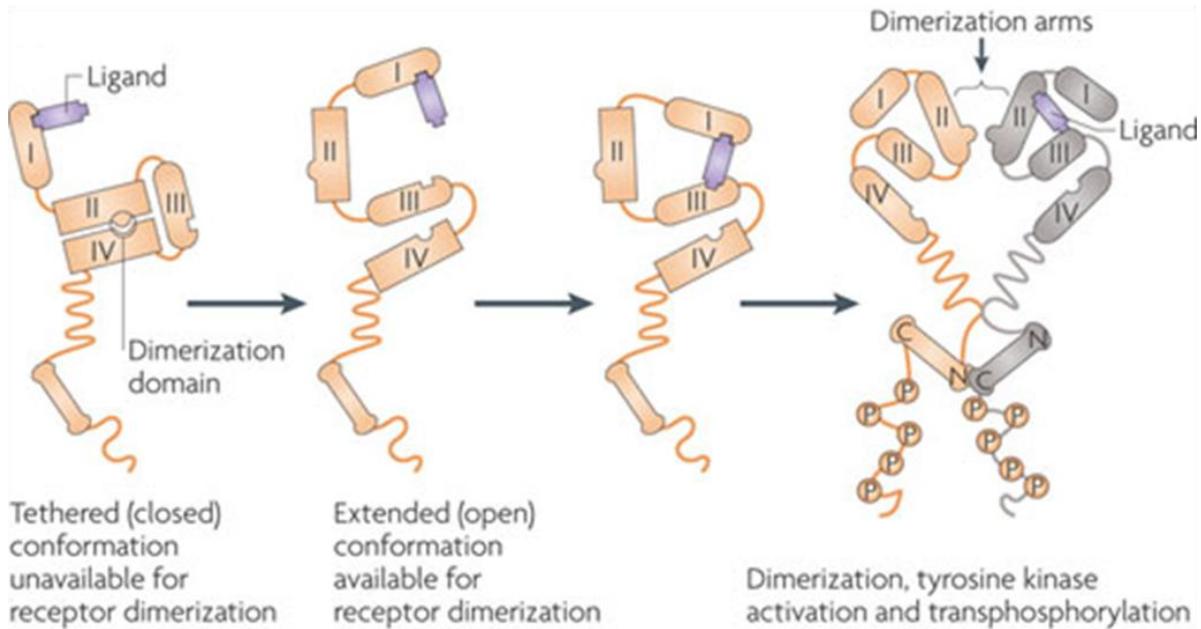
Les récepteurs qui sont présents sur la surface cellulaire ont une configuration «fermée» quand la dimérisation n'est pas possible en l'absence de ligand. L'ERBB2 est présent en configuration «ouverte» et disponible pour la dimérisation. ERBB3 est dépourvu d'activité kinase. (Baselga J, 2009)

Les ligands de ErbB sont des protéines solubles d'environ 55 acides aminés et sont classés selon leur spécificité pour les récepteurs :

- l'EGF (*Epidermal growth factor*), *Transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), l'Amphiréguline et l'Epiréguline sont plus spécifiques pour l'ErbB1/HER1 (EGFR);
- la Bêtacelluline, *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) et l'Epiréguline se lient avec les deux récepteurs: l'ErbB1/HER1 et à HER4 (ErbB4) ;
- les différents Neurégulines (NRG-1, 2,3 et 4) se fixent avec HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4).
- les ligands pour ErbB2 ne sont pas encore connus (Wheeler DL, 2010).

En l'absence de ligand, les récepteurs sont sous la forme de monomères inactifs. La fixation d'un ligand aux domaines extracellulaires I et III, entraîne une dimérisation des récepteurs. Si la dimérisation du récepteur est réalisée à partir de deux monomères identiques, elle s'appelle homodimérisation, si les monomères sont de nature différente, il s'agit d'hétérodimérisation.

La différente combinaison des monomères génère l'activation de diverses cascades de signalisation intracellulaire (Yarden Y, 2001). La dimérisation des monomères induit la phosphorylation des résidus de tyrosine, présents sur les récepteurs au niveau C-terminal et le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices possédant les motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines, (Figure 12) (Jorissen RN, 2003).



**Figure 12 Dimérisation et autophosphorylation de EGFR (ErbB1; ErbB3; ErbB4)**

La fixation du ligand induit un changement dans la configuration du récepteur, qui «découvre» son domaine de dimérisation et devient prêt pour l'activation de la voie de signalisation (Jorissen RN, 2003).

Le récepteur ErbB2 est assez particulier car il ne possède pas de ligands mais il est activé lors de son association à un autre membre de la famille ErbB. Les dimères ErbB2-ErbB2 n'étaient retrouvés que dans certains cancers (Yarden Y, 2001). La présence de plusieurs sites de phosphorylation explique la diversité des voies de signalisation activées en fonction des ligands et de l'importance de la combinaison des monomères. Les cascades de signalisations sont activées par quasiment tous les ligands d'ErbB, incluent la voie de

*mitogen-activated protein kinase* (MAPK), et la voie PI3 kinase (activant la voie anti-apoptotique Akt) (Soltoff SP, 1996).

Une fois activé, le récepteur est ensuite internalisé dans une vésicule recouverte de clathrine et délivré aux endosomes. Ce processus permet d'interrompre le signal et de recycler le récepteur (Yarden Y, 2001). Les résultats finaux de cette voie de signalisation sont selon les cas : la division cellulaire, la migration, l'adhésion, la différenciation ou l'apoptose (Freeman MR, 1997; Wheeler DL, 2010; Yarden Y, 2001).

#### **4. a. Implication de voie EGFR ( ErbB) dans la régénération de l'urothélium vésical**

Plusieurs études ont démontré l'implication de la voie EGFR dans la régénération et la prolifération de l'urothélium vésical *in vivo* et *in vitro*. La présence de ligands tels HB-EGF, TGF- $\alpha$ , Amphirégulin et EGF est détectée au niveau des cellules urothéliales dans l'urothélium de la vessie (Lau JL, 1988), tandis que le récepteur EGFR (ErbB1) est exprimé par les cellules basales urothéliales (versant basolatéral) (Messing EM, 1987; Noguchi S, 1990).

Baskin LS et coll ont démontré que la cicatrisation d'une plaie de vessie chez le rat après lésions chirurgicales était associée, non seulement à une surexpression de mRNA de KGF, mais aussi de TGF- $\alpha$ , suggérant l'implication de deux voies de signalisation FGFR et EGFR (Baskin LS, 1997). Les autres études ont démontré l'implication de l'amphiréguline, d'EGF, de TGF- $\alpha$  ou d'HB-EGF dans la prolifération des cellules urothéliales vésicales via l'activation des récepteurs ErbB1, ErbB2 et ErbB3 *in vitro* (Cooper CS, 1992) et *in vivo* (Freeman MR, 1997 ; Bindels EM, 2002 ; Daher A, 2003).

Etudiant la croissance et la différenciation d'explants urothéliaux obtenus à partir de biopsies urétérales Daher A et coll ont montré que la prolifération urothéliale est maximale entre 5 et 10 jours, avec une augmentation simultanée de HB-EGF, TGF- $\alpha$ , et Amphirégulin, suggérant leur implication dans cette prolifération de manière autocrine. En revanche l'expression de l'EGF, de l'Epiregulin, de Betacellulin et des quatre récepteurs de la famille ErbB est restée stable (Daher A, 2004). Le traitement du macaque *cynomolgus* par EGF recombinant pendant deux semaines conduit à une hyperplasie importante de l'urothélium vésical (Reindel JF, 2001). Chez la souris transgénique qui surexprime EGFR, une prolifération excessive des cellules urothéliales accompagnée par une hyperplasie de l'urothélium vésical et une incidence accrue du cancer sont observées (Cheng J, 2002; Bindels EM, 2002).

En résumé, la voie de l'ErbB semble jouer un rôle dans la régénération et le maintien de la barrière urothéliale. Les mutations de ce récepteur sont impliquées dans la cancérogenèse d'épithélium transitionnel.

### **5. Autres voies de signalisation potentiellement impliquées dans la prolifération des cellules urothéliales.**

Il a été suggéré que la régénération des cellules urothéliales pouvait être régulée via la voie IGFR (*Insulin Like Growth Factor Receptor*) et PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) par analogie avec les phénomènes existant au cours de la régénération de la peau où ces voies de signalisation sont impliquées au même titre que de FGFs, EGF, TGF- $\alpha$  (Lynch SE, 1989).

Actuellement peu de travaux sont disponibles en faveur de ces voies de signalisation en dehors de la publication de de Boer WI et coll 1994. Les auteurs, en utilisant une technique d'hybridation *in situ* dans l'urothélium vésical normal, ont détecté et permis de détecter la présence d'ARN de IGF1R et PDGF en quantités faibles. En étudiant l'urothélium, après un sur-remplissage de la vessie pendant 5 minutes, la surexpression des ARN de IGF1R dans toutes les couches des cellules urothéliales vésicales est observée dès 24 heures, accompagnée de la surexpression des ARN de IGF 2 (de Boer WI, 1994).

## B. UROTHELIUM INTRARENAL

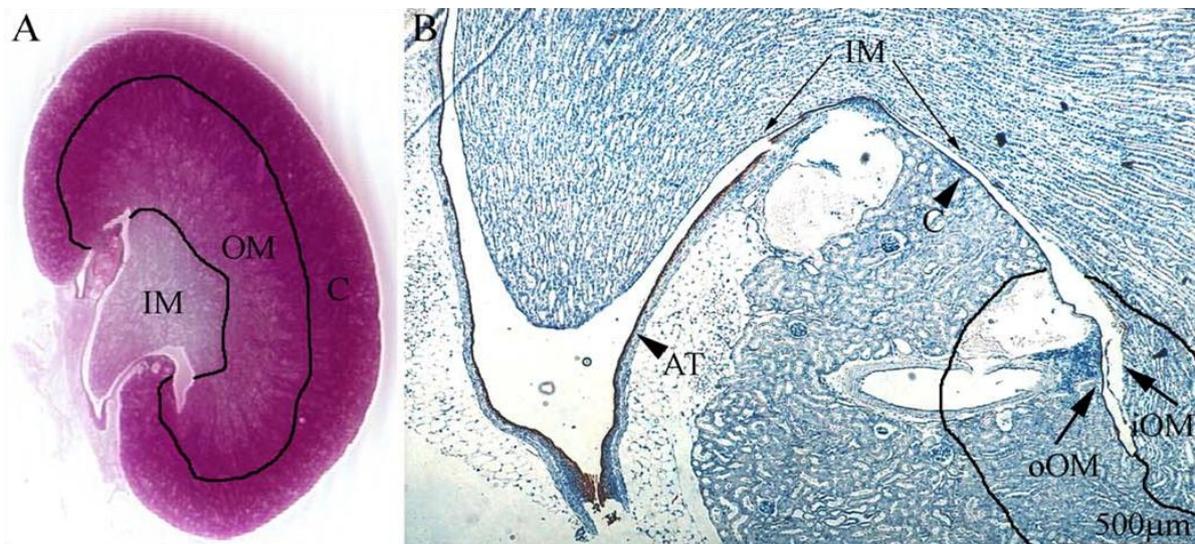
### I. STRUCTURE DE L'UROTHELIUM INTRARENAL

Rok Romih et coll. en 2005 ont décrit les différences de phénotype de l'épithélium qui couvre les voies excrétrices chez la souris. Une grande partie de ce travail est consacré à l'urothélium intrarénal.

Le rein de souris ne possède qu'une seule papille relativement longue qui est entourée par le bassinnet.

Sur un plan de coupe dorsale (Figure 14 A et B), le rein est divisé en trois grandes zones correspondant au structure des tubules rénaux: la médullaire interne avec la papille (*inner medulla (IM)*), la médullaire externe (*outer medulla(OM)*) et la zone corticale (*cortex (C)*).

L'urothélium intrarénal tapisse les voies excrétrices à partir du bassinnet adjacent à la zone corticale, il se poursuit dans la zone médullaire externe vers le pôle du rein en faisant un repli pour se rediriger vers la papille. (Romih R, 2005)



**Figure 14** La coupe dorsale du rein de la souris

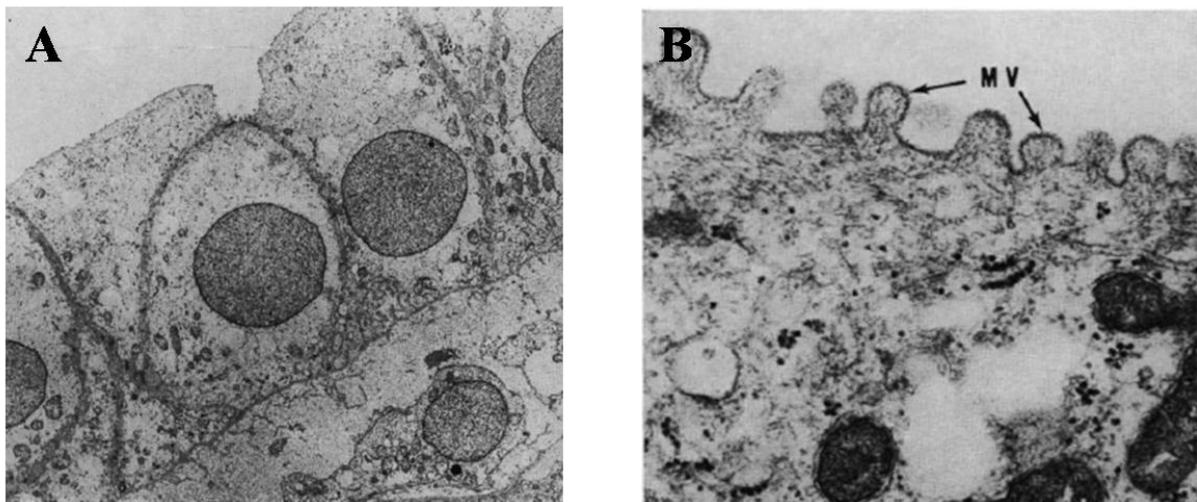
**A.** La médullaire interne avec la papille (*The inner medulla with papilla (IM)*), la médullaire externe (*outer medulla(OM)*) et la zone corticale (*cortex (C)*).

**B.** Le bassinnet rénal entoure la papille (AT tissus adipeux de bassinnet). L'urothélium est marqué par immunomarquage anti-UPIa (couleur marron). La papille et la zone médullaire interne (*The inner medulla (IM)*)

sont négatives pour UPIa. L'immunomarquage augmente du versant intérieur de la zone médullaire externe (*the inner band (iOM)*) vers le versant extérieur de la médullaire externe (*the outer band (oOM)*), et le cortex rénal (C) (Romih R, 2005)

### ***1. Urothélium de la médullaire interne et de la papille***

Comme présenté sur le tableau 1, l'urothélium de la papille est constitué par une seule couche de cellules épithéliales qui s'étend de l'orifice des tubes collecteurs (situés à la pointe de la papille) vers la médullaire interne. Les cellules ont une apparence cuboïdes à la pointe de la papille, et plus aplaties en regard de sa base, au niveau de la médullaire interne. (Figure 15a) (Silverblatt FJ, 1974; Romih R, 2005). Toutes ces cellules sont négatives pour les UPs et CK20 et présentent des microvillosités sur les images de la microscopie électronique (Romih R, 2005). (Figure 15b)



**Figure 15 La microscopie électronique de l'épithélium cuboïde de la papille.**

Microphotographie de l'urothélium simple cuboïde de la papille rénale chez un rat (x2640) (A); avec des microvillosités (MV) sur la surface apicale de ces cellules (x39600) (B) (Silverblatt FJ, 1974).

### ***2. Urothélium de la médullaire externe***

La transition entre l'épithélium simple et l'épithélium où les cellules expriment certains marqueurs de différenciation urothéliale se fait au niveau du versant intérieur de la zone médullaire externe (haut de la papille). Lorsque l'urothélium simple est constitué de deux couches cellulaires, certaines cellules commencent progressivement à être positives pour les UPs. Les cellules qui forment la couche supérieure ont des prolongations qui les attachent à la membrane basale (urothélium pseudostratifié). En microscopie électronique, la plupart des cellules ont encore des microvillosités, possèdent peu de vésicules discoïdes dans leur cytoplasme et n'expriment aucun marqueur de formation des AUM à leur membrane apicale.

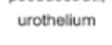
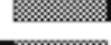
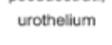
Au niveau du fornix (zone de repli de l'urothélium), certaines cellules superficielles commencent à perdre contact avec la membrane basale. Dans le cytoplasme de ces cellules, des vésicules discoïdes sont présentes avec un faible immunomarquage pour les UPs. De façon intéressante, les cellules superficielles de l'urothélium bi-stratifié ayant des prolongations vers la membrane basale présentent une faible expression de UPs, tandis que les cellules qui n'ont pas de contact avec la membrane basale sont plus fortement marquées par les UPs. Cependant cette expression des UPs est plus faible que celle présente dans les cellules en ombrelles vésicales. Dans l'urothélium bi-stratifié certaines cellules urothéliales deviennent positives pour CK20. Ces cellules ressemblent aux cellules intermédiaires de l'urothélium vésical, « partiellement » différenciées, capables de synthétiser de petites quantités d'UPs, sans parvenir à former des plaques urothéliales et à composer l'AUM.

Progressivement, au-delà du fornix, en regard du versant extérieur de la médullaire externe, apparaît la troisième couche des cellules urothéliales. La membrane apicale des cellules superficielles de cette partie de l'urothélium intrarénal a une apparence festonnée avec une présence de vésicules discoïdes dans le cytoplasme. Le cytoplasme de la plupart des cellules superficielles expriment le CK20 qui est organisé en réseau continu. La majorité de ces cellules sont aussi positives pour l'UPIa, l'UPIb, l'UPII et l'UPIII, mais de manière plus

faible que dans l'urothélium vésical. Les cellules superficielles possèdent soit des microvillosités sur leur surface apicale, soit présentent des AUM, soit combinent les deux.

### 3. Urothélium de la zone corticale

L'urothélium qui tapisse la zone corticale chez la souris est complètement différencié. Il est composé au minimum de trois couches cellulaires avec des vésicules fusiformes dans le cytoplasme des cellules en ombrelles et de l'AUM bien formé. Cet urothélium est comparable à celui de l'uretère ou de la vessie (Silverblatt FJ, 1974; Romih R, 2005), Tableau 1

	Kidney			Ureter	Bladder	Urethra
	Inner medulla	Outer medulla Inner band Outer band	Cortex			
Epithelium	simple	pseudostrat., urothelium urothelium	urothelium	urothelium	urothelium	stratified
Cell layers	1	1 - 2	2 - 3	3	3 - 4	3 - 4
UPs						
Fusiform vesicles						
Microvilli						
AUM plaques						
CK 20						

**Tableau 1 Différenciation de l'urothélium intrarénal et extrarénal**

Expression des marqueurs de différenciation dans les cellules superficielles de l'épithélium qui couvre les voies excrétrices à partir de la zone médullaire interne jusqu'à l'urètre chez la souris. Un damier correspond à une population de cellules épithéliales superficielles, exprimant ou non le marqueur de différenciation. La bande noire indique que toutes les cellules épithéliales superficielles expriment le marqueur de différenciation (Romih R, 2005)

## II. FONCTIONS DE L'UROTHELIUM INTRARENAL

---

L'urothélium qui tapisse les cavités rénales modifie progressivement sa structure et son niveau de différenciation entre la papille rénale, où l'épithélium est cuboïde monostratifié, et le cortex rénal où l'urothélium est « classique » pluristratifié.

Cette structure particulière de l'urothélium intrarénal peut correspondre à une double fonctionnalité de ce dernier : à la fois une fonction de barrière, mais aussi probablement une fonction de « modification » de la composition de l'urine.

Lacy ER et coll ont démontré en 1979 que, chez le hamster, la zone de la médullaire interne et de la papille constitue environ un quart de la surface totale du bassinnet rénal. Etant couvert par un épithélium cuboïde avec des microvillosités qui ressemblent morphologiquement à l'épithélium du canal collecteur (absence d'AUM), le rôle probable de cet épithélium est de contribuer à la formation de l'urine finale (Lacy ER, 1979). De plus, les changements progressifs de phénotype de l'urothélium intrarénal observés en regard du cortex, où toutes les cellules apicales présentent des AUM, sont en accord avec les valeurs d'osmolarité parfois très différentes entre le cortical et l'urine du liquide interstitiel. L'osmolarité, détectée au niveau de la papille rénale, est comparable à l'osmolarité de l'urine. Ce fait suggère que cet épithélium simple ne contribue pas ou peu à la fonction de barrière entre le sang et les urines. En revanche, l'osmolarité diminue progressivement dans les tissus, au niveau du cortex rénal, où les cellules urothéliales sont bien différenciées et forment une barrière imperméable (Romih R, 2005).

## *C. OBSTRUCTION URÉTERALE*

---

### **1. Généralités**

La néphropathie obstructive est une cause d'insuffisance rénale relativement fréquente. Elle peut être soit congénitale, soit acquise. L'obstruction congénitale s'associe en général à un syndrome de jonction pyélo-urétérale, ou à des anomalies de la jonction urétéro-vésicale. Les principales étiologies d'obstruction urétérale secondaire sont les obstacles endoluminaux : les lithiases, les tumeurs des voies excrétrices ; les compressions extrinsèques par les tumeurs, la fibrose rétropéritonéale ou la grossesse. Les conséquences tissulaires et fonctionnelles de l'obstruction dépendent de son degré, complet ou non, et de la durée d'obstruction (Chevalier RL, 2009).

### **2. Modèle de l'obstruction urétérale unilatérale**

Le modèle de l'obstruction urétérale unilatérale (UUO) est reconnu comme un modèle reproductible de maladies rénales chroniques progressives, liées à une accumulation de matrice extracellulaire avec fibrose et perte des cellules tubulaires.

L'UUO est réalisée, en général, soit par une ligature, soit par un clampage de l'uretère. Elle peut être complète ou partielle. Afin d'étudier la régénération rénale, l'UUO peut être réversible, nécessitant souvent une nouvelle opération pour enlever l'obstacle (Chevalier RL, 2009).

Pendant les 30 dernières années, les effets de l'obstruction urétérale et les mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose ont été étudiés chez l'homme et sur les différentes espèces des animaux de laboratoire. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas de travaux portants sur le rôle et le devenir de l'urothélium intrarénal dans ce modèle alors que l'urothélium est la première structure anatomique rénale subissant une hyperpression et un stretch au cours d'un obstacle des voies excrétrices.

### 3. Aspects physiopathologiques de l'UO

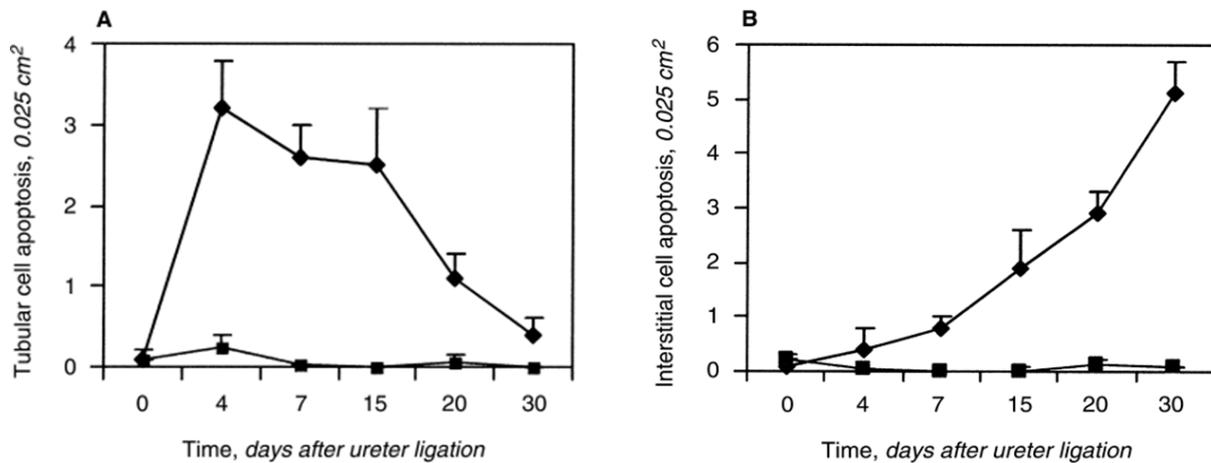
#### 3. a. Lésions rénales précoces

La physiopathologie des altérations rénales secondaires à l'obstruction est complexe. Elle repose sur les augmentations de la pression intraluminaire, qui initie une séquence d'événements entraînant rapidement des changements de l'hémodynamique rénal, puis des modifications histologiques, l'activation de la réponse inflammatoire, et l'installation progressive d'une fibrose rénale (Docherty NG, 2006).

Les premières heures après l'augmentation de la pression intratubulaire, sont marquées par une augmentation transitoire du flux sanguin rénal, une hyperfiltration glomérulaire liées à la production locale de l'oxyde nitrique (NO) à partir de la conversion enzymatique de L-arginine, via l'expression de iNOS (*inductible ON Synthétase*) et de eNOS (*endothéliale NO Synthétase*). Dans le rein eNOS a été localisé dans les vasa recta, les tubes collecteurs de la médulla interne et dans les glomérules, iNOS est exprimée par les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules tubulaires rénales et les cellules inflammatoires comme les monocytes, les macrophages, et les neutrophiles (Legrand M, 2008). Le NO dilate plus spécifiquement l'artériole afférente et augmente ainsi le débit de filtration glomérulaire (Moody TE, 1975; Vaughan ED 2004; Docherty NG, 2006).

A partir de la troisième heure après le début de l'obstruction survient une phase de diminution de la filtration glomérulaire provoquée par une activation du système renine-angiotensine, qui permet de diminuer la pression intratubulaire élevée (Esteban V, 2004). Cependant, l'élévation persistante de la pression intratubulaire associée à la résistance mécanique de l'interstitium rénal, induit un aplatissement des cellules épithéliales tubulaires en même temps qu'une dilatation tubulaire (Kida Y, 2007). La mort des cellules tubulaires par apoptose est provoquée par un grand nombre de facteurs dus à l'obstruction : le stretch en rapport avec la dilatation tubulaire, l'ischémie, l'hypoxie, et le stress oxydatif (Chevalier RL, 2009). L'apoptose des cellules tubulaires est maximale entre le 4ème et le 14ème jour (selon les

études) contribuant à une « désertification » et à une dilatation tubulaire (Truong LD, 1996; Truong LD, 2001; Choi YJ, 2000), (Figure 16) :

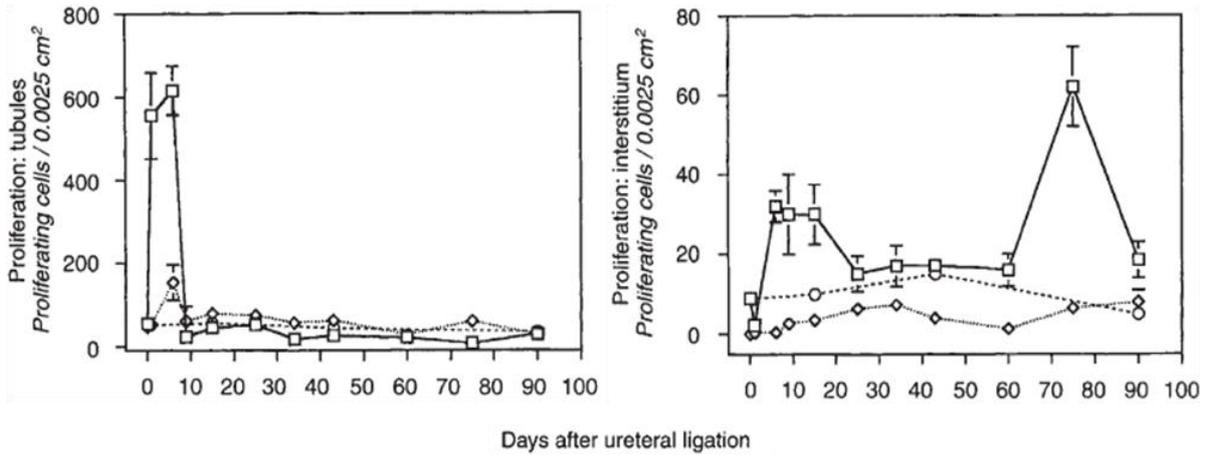


**Figure 16 L'incidence de l'apoptose au cours de l'UUO.**

A. Apoptose des cellules tubulaires rénales; B. Apoptose des cellules interstitielles rénales. Le Symbole ◆ correspond au rein obstrué. Le Symbole ■ correspond au rein controlatéral (Truong LD, 2001).

### 3. b. Prolifération tubulaire

Luan D. Truong et coll en 1996 ont constaté que l'apoptose des cellules rénales au cours de l'UUO survient simultanément à une période de prolifération des cellules tubulaires entre le 1er et 10ème jour de l'UUO. La prolifération de cellules interstitielles rénales est moins forte et plus tardive. Les cellules glomérulaires ne prolifèrent pas dans ce modèle (Truong LD, 2011; Forbes MS, 2012). (Figure 17).



**Figure 17 La prolifération des cellules rénales au cours de l'UUO**

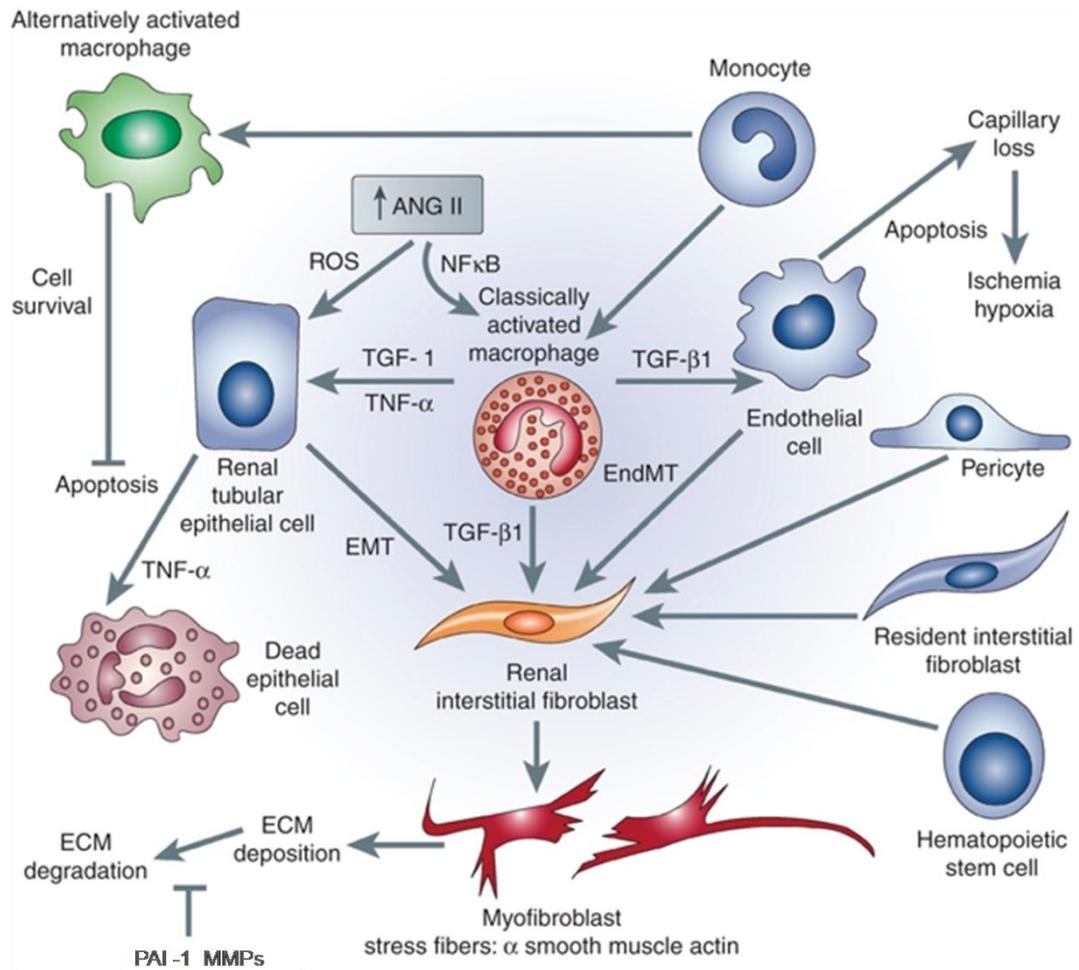
Symbole □ correspond au rein obstrué, le symbole ◇ correspond au rein controlatéral, le symbole ○ correspond au rein contrôle (Truong LD, 1996).

### 3. c. Fibrose et inflammation rénale

Le rôle de l'angiotensine II (ANGII) au cours de l'UUO ne se limite pas seulement à une vasoconstriction préglomérulaire mais contribue à plusieurs processus aggravant les lésions rénales. Comme présenté Figure 18, l'ANGII est aussi impliquée dans l'activation des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species, ROS*). En activant la production de **Facteur Nucléaire Kappa B** (NF-κB), acteur régulant l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires, l'ANGII contribue à l'infiltration des macrophages dans l'interstitium rénal. Activés, les monocytes se transforment en macrophages et libèrent des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β, *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) et *tumor necrosis factor - alpha* (TNF-α), contribuant, à leur tour, soit à la mort des cellules tubulaires, voire à la transformation des cellules tubulaires en cellules mésenchymateuses qui deviendraient des fibroblastes et migreraient dans l'interstitium (*epithelial-mesenchymal transformation, EMT*) (Strutz FM, 2009; Chevalier RL, 2009). En revanche, certains macrophages activés pourraient améliorer la survie des cellules tubulaires du fait d'une fonction immunosuppressive (synthèse de cytokines anti-inflammatoires, comme, par exemple l'IL-10) (Ricardo SD, 2008).

Les cellules endothéliales peuvent, soit devenir des fibroblastes au cours d'une transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) soit, entrer en apoptose, conduisant à une réduction de la vascularisation, une ischémie et une hypoxie rénale secondaire (Zeisberg EM, 2008). Les péricytes résidants et les cellules souches hématopoïétiques pourraient également se différencier en fibroblastes. Sous l'influence du TGF- $\beta$ 1 synthétisé par les macrophages, les fibroblastes synthétisent des fibres de stress et se différencient en myofibroblastes. Ces derniers contribuent à la formation d'une fibrose interstitielle en produisant une matrice extracellulaire (ECM) abondante. L'augmentation de l'expression de certains inhibiteurs spécifiques de protéases, comme le PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), au cours de l'UUO, inhiberait l'activité des Metalloprotéinases (MMPs) contribuant à diminuer dans le même temps la dégradation de la matrice extracellulaire (Chevalier RL, 2009; Du X, 2012).

Ces événements aboutissent ainsi à une perte d'environ 33% de l'épaisseur du parenchyme rénal 14 jours après constitution d'une UUO chez la souris, associée à une perte considérable de la fonction rénale (Figure 18) (Forbes MS, 2012).



**Figure 18 Interactions des cellules dans le rein au cours de l'obstruction urétérale**

**unilatérale** (Selon Chevalier RL, 2009 et Misseri R, 2004).

## *D. ISCHEMIE RENALE AIGUË*

---

### **1. Généralités**

Le terme d'insuffisance rénale aiguë (IRA) englobe plusieurs pathologies rénales et est diagnostiqué chez 5% des patients hospitalisés, avec une prévalence de 10 à 30% dans les services de soins intensifs aux Etats-Unis (Kribben A, 1999). Elle est associée à une mortalité élevée entre 50% et 80%, malgré les progrès thérapeutiques. L'IRA est caractérisée par une dégradation de la fonction d'excrétion rénale se traduisant par une importante diminution ou une interruption complète de la filtration glomérulaire, survenant de façon brutale ou rapidement progressive. C'est une incapacité à éliminer les déchets métaboliques notamment azotés et à maintenir l'homéostasie hydroélectrolytique. Les conséquences biologiques sont une augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique, une hyperkaliémie, une acidose métabolique et une rétention hydrosodée (Schrier RW, 2004).

L'IRA a été classée en 3 grandes catégories:

- a) L'IRA fonctionnelle ou « pré-rénale » correspond à une altération de la fonction rénale due à une diminution de la perfusion rénale sans lésion histologique préalablement existante.
- b) L'IRA parenchymateuse ou organique correspond à une défaillance des fonctions rénales due à des lésions cellulaires.
- c) L'IRA d'origine obstructive ou post-rénale : ce terme s'applique à toutes les IRA dues à une obstruction aiguë des voies urinaires supravésicales (Suc J-M. 2001).

L'ischémie est une cause commune des insuffisances rénales aiguës organiques et intra-rénales. Cette pathologie est assez répandue en clinique au cours de la transplantation rénale (Tilney NL, 1997), du traitement chirurgical de l'anévrisme de l'aorte thoraco-abdominale sus-rénale, des interventions reconstructives des artères rénales (Ellenberger C, 2006), des situations de chocs, ou lors d'un arrêt cardio-circulatoire (Yap SC, 2012). La

pathophysiologie des lésions ischémiques est complexe et s'accompagne de la mort des cellules tubulaires par nécrose et/ou apoptose, conséquence d'un stress oxydatif et d'un afflux de cellules inflammatoires (Molitoris BA, 2004).

## **2. Modèle de l'ischémie-réperfusion (IR)**

Le modèle de l'ischémie-reperfusion est un modèle reproductible de lésions rénales. Il est réalisé par un clampage de l'artère rénale avec un clamp vasculaire atraumatique. Elle peut être uni- ou bilatérale. Le degré des lésions rénales varie entre les espèces animales, dépend du sexe, et est corrélé directement avec le temps de l'ischémie. En général, le temps de l'occlusion pratiqué chez les rongeurs est entre 25 et 50 minutes. En cas d'I/R bilatérale ainsi que d'I/R accompagnée d'une néphrectomie controlatérale, l'insuffisance rénale aiguë s'installe pendant les 24 premières heures suivant la reperfusion (Singh AP, 2012).

## **3. Aspects physiopathologiques de l'IR**

### ***3. a. IR et activation des cellules endothéliales***

L'activation des cellules endothéliales après l'ischémie joue un rôle crucial dans la physiopathologie de l'insuffisance rénale post-ischémique. Une phase de reperfusion est marquée par une réduction allant jusqu'à 50% du débit sanguin rénal (Summers WK, 1971). Ces modifications hémodynamiques sont liées à un déséquilibre des médiateurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs : d'une part, une augmentation au niveau tissulaire des concentrations des substances vasoconstrictrices comme l'endothéline-1, l'angiotensine II, le thromboxane A2, la prostaglandine H2 et, d'autre part, une inhibition de la production de monoxyde d'azote via l'inhibition de la voie eNOS, de la bradykinine et d'autres substances vasodilatatrices (Legrand M, 2008; Kwon O, 2009; da Silveira KD, 2010). Cette réduction du flux sanguin rénal est plus importante dans la zone de la médullaire externe (Karlberg L,

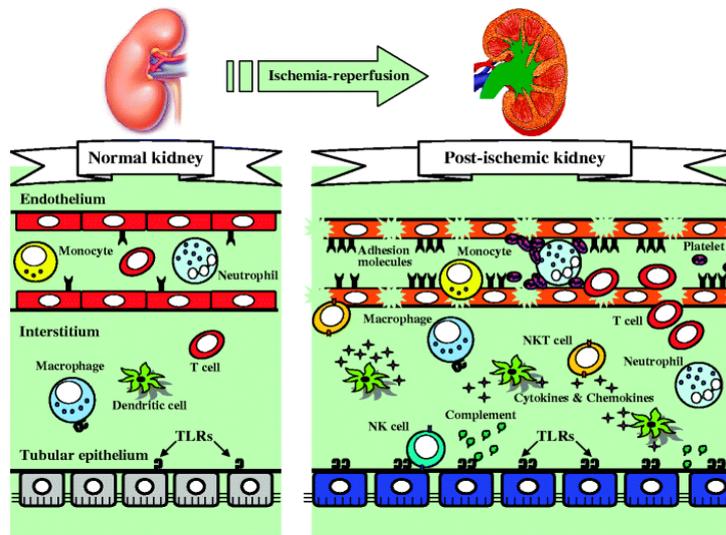
1983). L'ischémie et la production accrue des radicaux libres est responsable d'une désorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales, de la perte des jonctions serrées et de l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium aboutissant à une formation d'un œdème interstitiel et d'une compression des capillaires péri-tubulaires, compromettant la microcirculation rénale (Kevil CG, 2000; Kwon O, 2002).

### **3. b IR et inflammation**

Le relargage des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, ou les radicaux hydroxyles est corrélé à la durée de l'ischémie rénale. Les ROS sont synthétisés à la fois par les cellules tubulaires proximales abîmées (Nath KA, 2000 ; Chien CT, 2001) mais aussi par les neutrophiles et macrophages activés (Kelly KJ, 1996, Rembish SJ, 1994). Les ROS réagissent immédiatement après leur libération sur les tissus de voisinage, passent librement à travers les bicouches lipidiques des membranes en alternant les composants de base de la structure cellulaire: les lipides, les glucides, les protéines et les acides nucléiques (Nath KA, 2000). Ils peuvent activer la voie NF- $\kappa$ B, qui induit la transcription des gènes responsables de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires (Roebuck KA, 1999). Les ROS peuvent également contribuer à la surexpression des molécules d'adhésion leucocytaires comme ICAM-1, ligand de LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) exprimé sur les cellules inflammatoires. Ces dernières, après activation par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , se lient à l'endothélium, formant le complexe ICAM-1/LFA-1 et pénètrent ainsi dans le parenchyme rénal. Le blocage ou un déficit de l'ICAM-1 est associé à une réduction de la séquestration des leucocytes et à une protection rénale contre l'ischémie (Kelly KJ, 1996; Nath KA, 2000, Burne-Taney MJ, 2003). A l'inverse, la surexpression des L-, E-, et P-sélectines, présentes à la surface des leucocytes, des cellules endothéliales et des plaquettes, amplifie la réaction inflammatoire (Takada M, 1997).

Il parait évident que l'épithélium tubulaire n'est pas une simple cible « subissant passivement l'ischémie ». Les cellules tubulaires lésées produisent des médiateurs pro-inflammatoires et des cytokines : le TNF- $\alpha$ , *Monocyte chemo attractant protein 1* (MCP-1), les interleukines IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , le TGF- $\beta$ , *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted* (RANTES) etc. (Bonventre JV, 2004). Les cellules tubulaires expriment également des fractions du complément et des récepteurs *Toll-like* (TLRs) et notamment les récepteurs TLR2 et TLR4. Cette expression semble être proportionnelle aux lésions tubulaires après l'IR (Jang HR, 2009). Les neutrophiles s'accumulent dans les reins, et particulièrement, dans le réseau capillaire péri-tubulaire de la médullaire externe, produisent des protéases, les ROS et des cytokines, contribuant à une perméabilité vasculaire et aggravant les lésions rénales (Jang HR, 2009).

Attirés par MCP-1, les monocytes affluent dans le rein dès la première heure après la réperfusion, avec un pic, chez la souris, à 24 heures, leur nombre restant élevé pendant 7 jours. Provenant des monocytes « pro-inflammatoires », les macrophages de type 1 produisent des ROS et des cytokines pro-inflammatoires (y compris IL-1 $\beta$ , et TNF- $\alpha$ ). Ils peuvent contribuer au développement de la fibrose. En revanche, les monocytes « non-inflammatoires » : globalement considérées comme « réparateurs » (Friedewald JJ, 2004; Li L, 2008). Les lymphocytes affluent dans le rein entre le troisième et le dixième jour après l'ischémie et, étant stimulés différemment, jouent un double rôle : pro- et anti- inflammatoire (Gandolfo MT, 2009; Linfert D, 2009). (Figure 19)



**Figure 19 : Schéma représentant les interactions entre les lésions microvasculaires et tubulaires, ainsi que le recrutement des cellules inflammatoires (D'après Legrand M, 2008 et Jang HR,2009).**

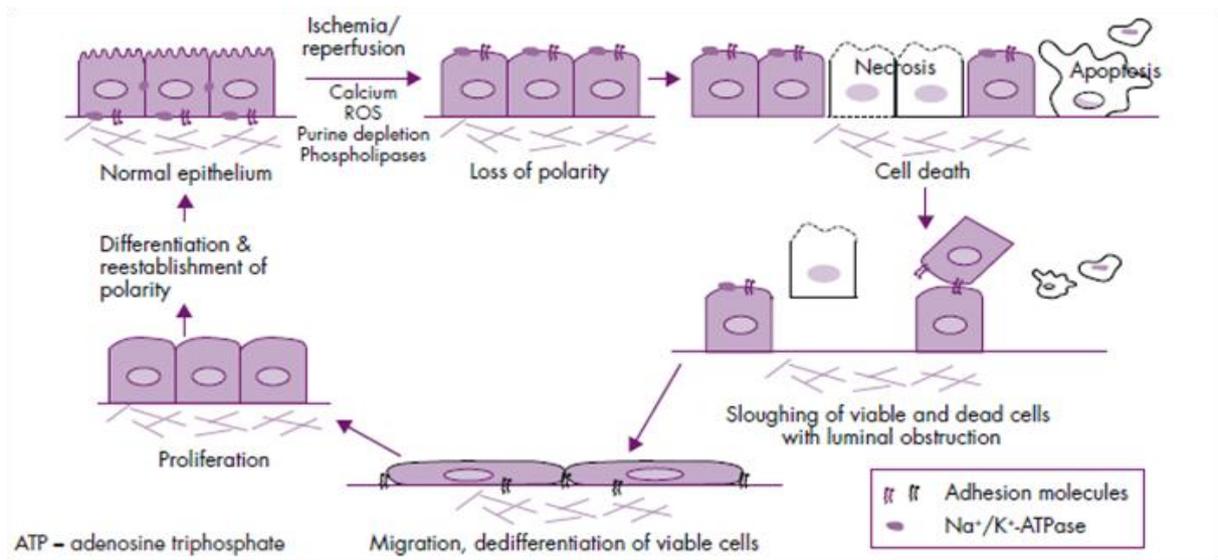
### 3. c. IR et lésions tubulaires

Les tubules proximaux semblent souffrir davantage de l'ischémie que les tubules distaux. La baisse de l'ATP au cours de l'ischémie rénale entraîne une augmentation rapide de la concentration du calcium intracellulaire qui a des conséquences sur l'activation des protéases et des phospholipases entraînant une dissociation du cytosquelette.

En effet, le premier signe de souffrance tubulaire est une perte de la polarité des cellules tubulaires se traduisant par une disparition de la bordure en brosse, ainsi que la délocalisation de la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase de la partie baso-latérale vers la membrane apicale des cellules. Ensuite se produit la perte des molécules d'adhérence comme les intégrines et les jonctions intercellulaires (Figure 20).

En fonction du degré d'ischémie, de nombreuses cellules tubulaires meurent soit par nécrose soit par apoptose, suite à l'activation notamment des caspases 1 et 3. Les cellules mortes et certaines cellules vivantes desquament, laissant la membrane basale dénudée. Les débris nécrotiques dans la lumière tubulaire, interagissent avec des protéines, comme la Tamm-

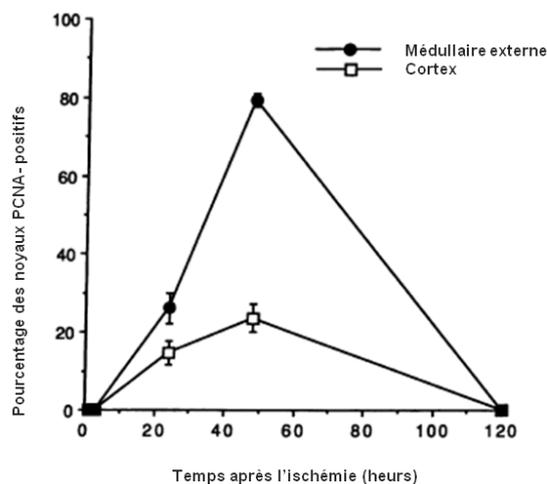
Horsfall et la fibronectine, obstruant les tubules en augmentant la pression intratubulaire en amont (Edelstein CL, 1999; Schrier RW, 2004). Les cellules des tubules distaux sont plus résistantes à l'hypoxie, et sont moins endommagées au cours de l'IR. Probablement, ces cellules sont capables de mieux convertir leur métabolisme oxydatif en métabolisme glycolytique lorsque, dans les situations de carence en oxygène, la fonction mitochondriale est limitée. De plus, une activation remarquable de la voie ERK et la production d'une protéine anti-apoptotique Bcl-2 coïncident avec la surexpression des facteurs de croissances comme EGF, IGF-1, et HGF dans ces cellules et peuvent ainsi minimiser la mort cellulaire, et augmenter leur résistance aux lésions ischémiques (Gobé G, 2000; Bonventre JV, 2011).



**Figure 20** Schéma représentant les étapes de la destruction et de la régénération des cellules tubulaires rénales après l'ischémie reperfusion (Bonventre JV, 2011)

#### 4. Régénération tubulaire

Le rein possède des capacités remarquables de réparation après les lésions créées par l'ischémie. Le taux faible de prolifération des cellules tubulaires en conditions physiologiques augmente de façon spectaculaire après une ischémie. Ces capacités de régénération se manifestent très tôt, dès 18 heures après l'ischémie, avec une prolifération des cellules des tubules proximaux localisées dans les zones médullaires externes. Très peu de cellules prolifèrent au niveau des zones du cortex rénal (Witzgall R, 1994; Maeshima A, 2002). (Figure 21)



PCNA – Proliferative Cell Nuclear Antigen

**Figure 21** Cinétique de prolifération des cellules rénales dans le modèle IR (Witzgall R, 1994)

##### 4. a. Sources cellulaires de la régénération rénale.

L'origine des cellules qui prolifèrent et colonisent les tubules lésés n'est pas clairement identifiée. Plusieurs hypothèses sont proposées. La régénération de l'épithélium tubulaire

pourrait être réalisée à partir des cellules tubulaires survivantes qui sont capables de se différencier, de proliférer et de se différencier de nouveau. Les cellules souches intrarénales résidentes peuvent migrer vers les sites de réparation et se différencier en cellules épithéliales (Humphreys BD, 2007). Plusieurs études ont suggéré que certaines cellules souches hématopoïétiques ou mésenchymateuses avaient vocation à s'installer et à se différencier à la place des cellules épithéliales endommagées (Kale S, 2003; Lin F, 2003; Morigi M, 2004).

Toutefois, des études récentes n'ont pas pu démontrer la contribution directe des cellules souches issues de la moelle osseuse dans la réparation des dommages tubulaires après l'I/R (Duffield JS, 2005). Les injections dans le parenchyme rénal de cellules souches mésenchymateuses améliorent la fonction rénale et le score histologique après I/R, sans différenciation de ces cellules en épithélium tubulaire. Le mécanisme en jeu implique probablement la sécrétion paracrine de facteurs de croissances qui peuvent contribuer à la prolifération, ou à la protection de l'épithélium tubulaire (Lange C, 2005; Morigi M, 2008). Différents types de cellules souches intrarénales résidentes ont été proposées en fonction de différents critères et phénotypes: 1- Des cellules à prolifération lente ont été identifiées au niveau de la papille rénale (Oliver JA, 2004). 2- Des cellules exprimant les marqueurs des cellules souches : CD24 et CD133 et les facteurs de transcriptions Oct-4 et BmI-1 ont été trouvées au niveau de la capsule de Baumann (Sagrinati C, 2006). 3- Des cellules progénitrices à cycle lent pourraient « se cacher » parmi les cellules tubulaires et, lors de la phase de régénération, ces cellules survivantes après l'ischémie se différencieraient, migreraient le long de la membrane basale, pour rétablir un nouvel épithélium tubulaire fonctionnel (Lin F, 2005; Humphreys BD; 2008 Kim J, 2011). De plus, la vimentine, ainsi que *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) qui sont exprimées dans le mésenchyme du métanéphros au cours du développement rénal, ne sont pas exprimées dans le néphron mature. Ces molécules ont été retrouvées en abondance dans les tubules proximaux après l'ischémie :

un argument en faveur d'une de cellule progénitrice résidente. (Witzgall R, 1994; Abbate M, 1999).

De fait, l'hypothèse de la présence des cellules souches intra-rénales a été récemment contestée par Humphreys BD et al. (2011). En utilisant comme marqueurs de la prolifération des analogues de base d'ADN, les auteurs ont montrés que la présence de cellules à cycle lent au niveau de la papille rénale, supposé être des progéniteurs ne prolifèrent pas après l'ischémie rénale et ne migrent pas vers les tubules proximaux, de la jonction cortico-médullaire. (Humphreys BD, 2011).

Ghielli M et al.(1998) proposent que les cellules inflammatoires puissent participer à la régénération des tubules rénaux grâce à la sécrétion des cytokines et de facteurs de croissance comme l'FGF, le TGF-alpha, l'EGF-like, et l'IL-2 (Ghielli M, 1998; Humphreys BD, 2008).

Toutefois, l'origine des cellules impliquées, soit directement, soit par l'intermédiaire de la sécrétion des facteurs de croissances dans la régénération de l'épithélium tubulaire rénal reste une question ouverte (Duffield JS, 2005; Humphreys BD, 2011).

#### ***4. b. Facteurs de croissance impliqués dans la prolifération tubulaire.***

Il est connu depuis longtemps que plusieurs facteurs de croissance sont synthétisés par les cellules tubulaires. Un grand nombre de ces facteurs participent au processus de régénération après l'ischémie : directement en induisant une prolifération des cellules tubulaires rénales mais aussi en améliorant la survie cellulaire en activant les voies anti-apoptotiques et en diminuant l'impact du stress oxydatif (Nigam S, 2000).

Les facteurs de croissance de la famille EGF sont synthétisés au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tube contourné distal (Rall LB, 1985). L'EGF et HB-EGF induisent la prolifération des cellules tubulaires rénales en culture (Homma T, 1995), et, l'administration d EGF recombinant augmente significativement la prolifération des cellules

tubulaires rénales. De fait, la transcription de l'HB-EGF est induite par l'ischémie (Humes HD, 1989).

L'HGF est connu pour ses propriétés anti-apoptotiques et mitogènes au cours des lésions tubulaires ischémiques. La concentration urinaire de HGF augmente significativement le premier jour après la transplantation rénale (Kwiatkowska E, 2010).

Le *colony-stimulating factor -1* (CSF-1), qui est le facteur principal de croissance des macrophages, contribue aussi à la réparation des cellules tubulaires rénales après l'ischémie, stimulant leur prolifération et diminuant l'apoptose (Alikhan MA, 2011).

Enfin, la voie FGFR contribue également à la réponse proliférative après l'I/R. En effet, le blocage de récepteur FGFR2 diminue nettement la prolifération des cellules tubulaires et augmente, de manière importante, les marqueurs des lésions rénales et l'infiltration par les macrophages (Villanueva S, 2008).

## *PARTIE 2. OBJECTIFS DE L'ETUDE*

---

Cette recherche avait pour but initial d'étudier la prolifération épithéliale intrarénale précocement après une agression rénale. L'objectivation d'une prolifération cellulaire dès la 18<sup>ème</sup> heure après ischémie rénale unilatérale, nous a permis à identifier l'urothélium intrarénal comme étant ce premier contingent cellulaire impliqué dans ce processus de régénération.

Nous avons donc centré notre étude sur cette structure particulière qui a jusqu'à présent fait l'objet d'un nombre d'études limitées.

Les objectifs de notre recherche ont donc consisté à :

- 1) Caractériser le phénotype et la topographie de l'urothélium intrarénal chez la souris normale.
- 2) Etudier les mécanismes de régénération précoce de l'urothélium intrarénal au décours de deux modèles différents d'agression rénale : l'Obstruction Urétérale Unilatérale et l'ischémie rénale unilatérale.

Les prolongements de ce travail (actuellement non publiés) concernent le rôle de l'urothélium intrarénal au cours d'un modèle d'insuffisance rénale aigue et notamment l'étude des interactions potentielles entre l'urothélium intrarénal et les tubules au voisinage localisés au niveau de la jonction cortico-médullaire.

## *PARTIE 3. PUBLICATIONS*

---





## *PARTIE 4. DISCUSSION*

---

Ce travail a pour objectif principal d'étudier l'urothélium intrarénal, ses lésions et les mécanismes de sa régénération dans un modèle murin d'obstruction urétérale unilatérale l'UUO et d'ischémie rénale unilatérale (IR).

Chez la souris, nous avons montré que les espaces urinaires remontent profondément dans le parenchyme rénal, atteignant ainsi la zone cortico-médullaire. A cet endroit, au niveau du fornix, l'urothélium est composé d'une seule assise cellulaire alors que l'urothélium devient pluristratifié en direction du hile, au niveau du versant pariétal du bassinet. A la différence de l'urothélium vesical, les cellules urothéliales intrarénales semblent être moins différenciées (absence d'expression de certaines UPS en fonction de la localisation intrarénale) et possèdent presque toutes un phénotype de cellules progénitrices épithéliales (cytokératine 14 positives).

Le stretch et l'hyperpression liées à l'UUO induisent, à court terme, la destruction de la barrière urothéliale intrarénal déclenchant une intense prolifération des cellules urothéliales. Cette prolifération permet la reconstitution de l'urothélium avec en cas d'obstruction urétérale persistante, une prolifération importante des cellules urothéliales intrarénales modifiant ainsi le phénotype de cette structure qui devient pluristratifiée (à l'instar de l'urothélium vésical) contribuant ainsi au renforcement de la fonction de barrière.

Nous avons montré également que, dans le modèle d'IR, les cellules urothéliales intrarénales représentent le premier contingent cellulaire entrant en division vers la 18<sup>ème</sup> heure, suivi de la prolifération des cellules tubulaires de voisinage situées au niveau des zones cortico-médullaires entre la 24 et 48<sup>ème</sup> heure. Dans les deux modèles, la prolifération des cellules urothéliales intrarénales est dépendante de la voie FGF7-FGFR2IIIb.

## Topographie de l'urothélium intrarénal

En accord avec les travaux de Romih et al. 2005, nous avons démontré que l'urothélium intrarénal est différent de celui de la vessie. Cet urothélium est hétérogène, sa structure dépendant de sa localisation dans le rein. (Romih et al. 2005). La réalisation de plans de coupe sagittale systématiques du rein décrits dans notre article (C. Vinsonneau et al. 2010, *Figure 1A, B et C*) nous a permis de montrer que les espaces urinaires s'enfoncent profondément dans le parenchyme rénal jusqu'à la zone cortico-médullaire. Ce plan de coupe permet de dégager une topologie particulière : un axe de symétrie central (cf annexe, figure 1) avec de part et d'autre les espaces urinaires ayant un rapport de proximité étroit avec 2 à 3 axes vasculaires (artère et veine inter lobaires) (*Figure 1A, B et C de l'article C. Vinsonneau et al. 2010*).

Ce plan de coupe réalisé dans le modèle d'I/R a permis d'identifier sur des coupes congelées les cellules urothéliales de la région du fornix, qui sont visibles, après marquage au Ki67 ou au BrdU positives, sous la forme de structures linéaires dès la 18ème heure. Ces cellules urothéliales se trouvant à proximité des tubes proximaux (marqués par la mégaline) et distaux (marqués par l'uromodulin) (*Figure 1 de l'article C. Vinsonneau et al. 2010*). Comme le montrent les coupes sériées, l'urothélium est composé d'une seule assise cellulaire au niveau des fornix et devient progressivement pluristratifié, du côté du versant pariétal du bassinet. (*Figure 1A, C de l'article A. Girshovich et al. 2012*).

Nous avons pu ainsi établir une cinétique de prolifération des cellules urothéliales après I/R unilatérale à trois niveaux différents dans les reins.

Le niveau 1 correspond à la zone proche des fornix; le niveau 2 correspond à la zone au dessus de la papille (zone de la médullaire interne profonde), et le niveau 3 est situé près de la pointe de la papille.

Nous avons montré que la prolifération des cellules urothéliales est plus importante au niveau 1 et 2 et moins intense au niveau papillaire. En accord avec les travaux de l'équipe de Al-Awqati Q (Oliver JA, 2004) nous n'avons pas observé de prolifération des cellules urothéliales cuboïdes situées à la pointe de la papille. L'utilisation systématique de ce plan de coupe, nous permet d'obtenir une grande reproductibilité : la variation intra-groupe et inter-groupe est comparable de l'ordre de 10% à 24 heures et de 20% à 48 heures (Annexe Figure 1). Cette reproductibilité de l'index de prolifération au cours de la phase précoce de l'IR est surprenante, et suggère un déterminisme puissant car l'intensité de l'ischémie et la qualité de la reperfusion sont des phénomènes susceptibles de variations entre les différents animaux.

### **Spécificité de l'urothélium intrarénal**

Les cellules urothéliales intrarénales situées au niveau des fornix (niveau 1) sont positives pour l'UPIII et l'UPIb, mais n'expriment pas ou faiblement les UPII et l'UPIa, contrairement aux cellules urothéliales vésicales (*Figure 3 de l'article A. Girshovich et al. 2012*). Cette diminution de l'expression de l'UPII et de l'UPIa n'empêche néanmoins pas la formation des structures de l'AUM malgré la prédominance des vésicules discoïdes, considérées comme des formes immatures de vésicules fusiformes dans le cytoplasme des cellules en ombrelles de la vessie (Chang A, 1994 ; Negrete HO, 1996 ; Hudoklin S, 2012). De fait, les vésicules discoïdes sont retrouvées dans les cellules apicales de l'urothélium vésical au cours de la régénération, (Hudoklin S, 2009) et chez les souris invalidées pour les UPs et notamment UPII (Kong XT, 2004). Un argument en faveur du caractère progéniteur et faiblement différencié de ces cellules est la présence de cytokératine 14, dans la plupart des cellules urothéliales de la région des fornix (*Figure 1 B, D, G de l'article A. Girshovich et al. 2012*), alors que l'expression de la cytokératine 14 n'est présente au niveau vésical que dans certaines cellules basales (Kurzrock EA, 2008).

## **Stimuli induisant une prolifération de l'urothélium intrarénal**

L'étirement dû à l'augmentation de la pression dans les cavités urinaires dans le modèle de l'UUO provoque une destruction de la barrière urothéliale avec une ouverture des jonctions serrées et l'élargissement de l'espace intercellulaire (Figure 2, de l'article A. Girshovich et al. 2012). En cas d'obstruction plus sévère, la desquamation des cellules urothéliales intrarénales entraîne une dénudation de la membrane basale (Annexe, Figure 2). Le phénomène de desquamation des cellules urothéliales en réponse à diverses agressions est connu dans la littérature non seulement à cause du stretch mais aussi après l'ischémie (Yu HJ, 2004), après agression par des agents toxiques (Lavelle J, 2002) ou invasion par des agents pathogènes (Dhakal BK, 2008). A la suite de ces lésions, une prolifération intense survient avant la 24<sup>ème</sup> heure et implique le couple FGF7/FGFR2.

## **Voies de signalisation impliquées dans la régénération de l'urothélium intrarénal**

Dans nos deux modèles, le couple FGF7 – FGFR2IIIb est impliqué dans la prolifération de l'urothélium intrarénal. En effet, l'FGFR2IIIb est exprimé par les cellules urothéliales intrarénales (*Figure 6 de l'article C. Vinsonneau et al. 2010 et Figure 4A de l'article A. Girshovich et al. 2012*) et la phosphorylation du récepteur FGFR qui témoigne de l'activation de la cascade de signalisation (Turner N, 2010) a pu être mise en évidence (*Figure 6 de l'article C. Vinsonneau et al. 2010 et Figure 4 de l'article A. Girshovich et al. 2012*). L'activation de FGFR2 semble indispensable car l'injection au moment de l'opération (IR ou UUO) d'un antisens de FGFR2 qui inhibe la synthèse du récepteur (Villanueva S, 2008), diminue très significativement la prolifération des cellules urothéliales dans les deux modèles (*Figure 7 de l'article C. Vinsonneau et al. 2010 ; et Figure 5 de l'article A. Girshovich et al. 2012*).

Parmi les différents ligands de FGFR2IIIb, seul FGF7 est surexprimé dans les reins au cours des 48 premières heures dans les deux modèles, alors que le processus de régénération de l'urothélium au décours de l'obstruction de la vessie implique à la fois FGF7 et FGF10 qui sont synthétisées par les cellules stromales mésenchymateuses sous-jacentes (Lendvay TS, 2007; Tash JA, 2001). Par technique de microdissection-laser (appareil *Leica Microsystems ltd.*) nous avons pu analyser précisément différentes zones des reins et tout particulièrement la zone des fornix comprenant l'urothélium intrarénal et les tissus adjacents (notamment les régions péri vasculaires) comme présenté sur figure 4 de l'annexe. Nous avons ainsi confirmé une augmentation significative de la transcription de FGF7 (à l'exclusion des autres ligands de FGFR2IIIb) à 24h et 48h après l'IR dans cette zone (Annexe, figure 4B). Ces résultats suggèrent que dans les reins comme dans la vessie, les cellules stromales mésenchymateuses,  $\alpha$ -SMA positives, situés à proximité de l'urothélium sont probablement la source du FGF7 produit (Figure 4 C, D) (Tash JA et al. *J Urol.* 2001)). Cette surexpression, de FGF7 détectée à partir de la 24<sup>ème</sup> heure uniquement dans cette zone, est contemporaine du pic de prolifération des cellules urothéliales entre 24 et 48 heures.

FGF7 est par ailleurs connu comme agent mitogène des cellules de l'urothélium vésical du fait de la présence constitutive du récepteur FGFR2IIIb dans ces cellules (Yi ES, 1995). Il a été montré que la vitamine A interrompt la transduction du signal de la voie FGFR2 en activant la protéine régulatrice *Sprouty*, qui, à son tour, inhibe la transduction du signal intracellulaire médié par une voie des MAP kinases et ainsi bloque les propriétés mitogènes du récepteur (Tsang M, 2004; Melnik BC, 2009). De fait, le traitement des souris femelles avec de la vitamine A inhibe de manière irréversible la prolifération et la pluristratification de l'épithélium vaginal, médiées par FGF7 (Masui F, 2003). Dans nos expériences, la prolifération des cellules urothéliales intrarénales et vésicales est significativement diminuée chez les souris prétraitées par la vitamine A pendant 7 jours avant une injection de FGF7 par rapport aux souris qui n'ont pas reçu de vitamine A (Figure 5 de

*l'article A. Girshovich et al. 2012*). Au deuxième jour de l'UUO, on observe également une inhibition spectaculaire de la prolifération des cellules urothéliales intrarénales chez un groupe de souris prétraitées avec de la vitamine A (par rapport au groupe non traité), renforçant notre conviction de l'implication du couple FGFR2IIIb–FGF7 dans le processus de régénération de l'urothélium intrarénal après des lésions provoquées par un obstacle ou une ischémie.

A la différence de l'urothélium vésical où l'implication de la voie EGFR dans la prolifération des cellules urothéliales a été démontrée par plusieurs études (Baskin LS, 1997; Cooper CS, S 1992; Bindels EM, 2002; Freeman MR, 1997), la prolifération de l'urothélium intrarénal semble être indépendante de la voie EGFR. En effet, l'administration chez les souris d'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, le Tarceva<sup>®</sup> (erlotinib), ne modifie pas l'index de prolifération des cellules urothéliales au deuxième jour de l'UUO par rapport aux animaux non traités. (Annexe, figure 3). Nous n'avons par ailleurs détecté aucunes surexpressions des ligands d'EGFR dans la zone du fornix au cours des 48 premières heures après IR.

### **Prolifération et plasticité de la barrière urothéliale**

Nos travaux montrent que l'urothélium intrarénal possède de remarquables capacités d'adaptation à l'environnement extérieur.

Comme au niveau vésical, la prolifération des cellules urothéliales intrarénales entraîne une différenciation cellulaire. Cette phase de régénération est responsable d'une hyperplasie réversible de l'urothélium dès le 14<sup>ème</sup> jour si l'obstacle disparaît. En revanche, en cas d'obstruction urétérale prolongée, l'urothélium intrarénal est capable de renforcer son imperméabilité en multipliant le nombre des couches cellulaires : il devient pluristratifié (de 3 à 6 couches de cellules) avec présence de complexes jonctionnels serrés et d'AUM au niveau apical (*Figure 2 de l'article A. Girshovich et al. 2012*), avec non seulement une ré-expression d'UPIII et d'UPIb mais également une apparition *de novo* d'UPII, suggérant un renforcement

de la fonction d'imperméabilité de cette structure (*Figure 1, et 3, de l'article A. Girshovich et al. 2012*). Ce mécanisme adaptatif permet probablement d'isoler le rein des substances dissoutes urinaires et d'éventuels agents pathogènes. L'urothélium intrarénal après 14 jours d'UUO, contient un nombre accru de cellules progénitrices (CK14 positives) localisée en position basale par rapport à l'urothélium vésical. Le même phénomène est observé après la prolifération urothéliale obtenue à la suite d'injections quotidiennes de FGF7 recombinant pendant 7 jours. Ces résultats suggèrent un phénotype « activé ».

Nous n'avons pas réalisé d'expériences au-delà de 14 jours post UUO. Il n'est pas exclu qu'à plus long terme apparaisse la synthèse de novo d'UPIa transformant ainsi le phénotype de l'urothélium intrarénal en un phénotype vésical complet.

### **Rôle des cellules urothéliales intrarénales dans la régénération tubulaire?**

Nos travaux montrent qu'après IR unilatérale, la prolifération des cellules tubulaires est retardée par rapport aux cellules urothéliales avec un décalage de minimum 6 heures. La régénération tubulaire débute par une prolifération des cellules qui se trouvent au voisinage de l'urothélium intrarénal, dans les zones cortico-médullaires.

Comme présenté sur la figure 5 de l'annexe, nous avons établi une « cartographie » et une cinétique de la prolifération des cellules tubulaires rénales après IR unilatérale dans les différentes zones : corticale, cortico-médullaire (au voisinage des espaces urinaires et des axes vasculaires) et médullaire. Le pic observé de prolifération des cellules urothéliales à 24 heures coïncide avec le début de la prolifération des cellules dans les zones cortico-médullaires du voisinage. Cette division des cellules tubulaires dans la zone cortico - médullaire est très transitoire : maximale à 48 heures avec un index de prolifération d'environ 26% (30,5 – 20,5% ; IC 95%) et 4% (6,0 – 1,7% ; IC 95%) vers 72 heures (n=4 animaux par groupe). Aucune prolifération cellulaire importante n'est détectée dans le cortex, ou la zone médullaire (immunomarquage KI67).

Ces pics de prolifération successifs survenant dans les différentes structures urothéliales et tubulaires peuvent être une coïncidence ou avoir un lien de causalité. L'urothélium intrarénal « activé » pourrait en effet déclencher la régénération tubulaire à l'instar des phénomènes observés au cours de l'embryogénèse. Le bourgeon urétéral est un prolongement épithélial dérivant de la partie caudale du canal de Wolff qui pénètre dans le blastème métanéphrogène. Il est à l'origine des voies excrétrices extra et intra-rénales. En entrant dans le blastème métanéphrogène, le bourgeon urétéral se ramifie et forme des branches des tubes collecteurs. Les cellules mésenchymateuses de blastème métanéphrogène (situées autour des tubes collecteurs), se transforment sous l'induction du bourgeon urétéral en cellules épithéliales et forment des vésicules néphroniques. Ces vésicules s'allongent en formant des tubules en forme de «S» pour constituer finalement des parties de néphron mature (Dressler GR, 2006; Bates CM, 2011). Au cours de l'embryogénèse, le couple FGF7/FGFR2 est également impliqué dans la croissance et le branchement du bourgeon urétéral et la formation de système des tubes collecteurs. Chez les souris invalidées pour FGF7, une hypoplasie rénale est observée, avec une diminution de 30% du nombre des néphrons (Qiao J, 1999). De plus, la souris invalidée pour l'expression du récepteur FGFR2 au niveau du bourgeon urétéral ( $FGFR2^{UB^{-/-}}$ ) présente de profondes perturbations de branchement et une diminution du nombre des glomérules (Zhao H, 2004).

Au cours de la régénération rénale, après l'ischémie, il n'est pas exclu que la prolifération précoce des cellules urothéliales puisse reproduire certaines étapes de l'embryogénèse et induire la régénération des tubules rénaux, la démonstration de cette hypothèse reste à faire et les facteurs de croissance à identifier. Un moyen pour y parvenir est de trouver une situation expérimentale où la prolifération urothéliale serait inhibée.

## **Insuffisance rénale aiguë (IRA) et prolifération de l'urothélium intrarénal**

Dans le modèle de l'insuffisance rénale aiguë (IRA), réalisée par néphrectomie unilatérale avec ischémie rénale controlatérale de 45 minutes, nous avons été surpris de constater une absence de prolifération des cellules urothéliales intrarénales à 24 heures et 48 heures après déclampage (respectivement 0,7% et 1,8%) (Annexe, figure 6 A et B; figure 7).

Dans ce modèle, la prolifération des cellules tubulaires dans les zones cortico- médullaires est également abolie à 24 heures et 48 heures (respectivement 0,6% et 2.3%) (Annexe, figure 6 A et B ; figure 8).

L'injection de FGF7 recombinant (Palifermin, Swedish Orphan Biovitrum, Stockholm, Sweden, 60 µg/kg), 24 heures avant l'opération semble restaurer en partie les séquences de prolifération, observées au cours du modèle d'IR sans IRA (IR 45 minutes sans néphrectomie controlatérale): la prolifération à 24 heures est d'environ 75 % (72,3 - 77,9 ; IC 95%) pour les cellules urothéliales et de 14% (12,6 - 16,1; IC 95%),  $p < 0.01$  pour les cellules tubulaires de la zone cortico-médullaires (Annexe, figure 6 C et D ; figure 7, 8)

L'explication de ces phénomènes n'est pas univoque, la disparition de toute prolifération dans le modèle IRA pourrait être due : 1) à l'absence de synthèse de FGF7 intra rénal ; 2) à la présence de facteurs « inhibiteurs de prolifération » ; 3) à des lésions urothéliales plus importantes par un mécanisme qui reste à préciser. Des expériences en cours suggèrent que la synthèse de FGF7 intrarénale est significativement diminuée dans le modèle IRA ( $p = 0.02$ ) (Annexe, figure 9), alors qu'elle est augmentée dans le modèle IR unilatéral (Figure 6 E de l'article Vinsonneau et al 2012). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un facteur endogène inhibant la synthèse de FGF7 soit d'origine rénal soit extra rénal actuellement inconnu. Ces résultats ne permettent pas d'affirmer le rôle central de l'urothélium dans la régénération tubulaire mais suggèrent que l'activation de la voie FGF7/FGFR2 est indispensable. Des expériences sont actuellement en cours pour tester les autres hypothèses évoquées précédemment.

## Rôle du FGF7 dans la protection du parenchyme rénal ?

Dans le modèle d'IRA décrit précédemment, les animaux ayant reçu du FGF7 avant l'opération ont une meilleure fonction rénale que les animaux non traités : la concentration plasmatique de l'urée est de 14,4 mmol/l versus 39.6 mmol/l respectivement ( $p = 0.005$ ) (Annexe, figure 10). Ces résultats sont confirmés et « expliqués » histologiquement : le pourcentage de tubules proximaux dilatés est moins important dans le groupe traité : 20% versus 41% respectivement ( $p < 0.01$ ) (Annexe, figure 11). Ces observations sont à mettre en perspective avec des expériences récentes réalisées au niveau du poumon qui montrent que le l'administration de FGF7 améliore la survie des souris après des lésions alvéolaires causées par un stress oxydant (Lu Y, 2001) grâce à l'activation de plusieurs voies de survie cellulaire, notamment les voies anti-apoptotiques : phosphatidylinositol (PI) 3-kinase, Akt et PAK4 (*p21-activated protein kinase*) (Ray P, 2003; Lu Y, 2003). Dans le poumon, FGF7 stimulerait également la réparation de l'ADN après l'exposition à l' $H_2O_2$  et induirait la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires de type II et leur différenciation vers les cellules de type I, permettant la réparation de l'épithélium. (Panos RJ, 1995, Wu KI, 1998; Waters CM, 1997).

Dans le rein, le rôle protecteur de FGF7 sur les cellules tubulaires rénales pourrait être dû à une action directe de FGF7 sur certaines cellules des tubes collecteurs qui expriment le récepteur FGFR2IIIb (Celli G, 1998). L'activation des voies de survie cellulaire, augmenterait leur résistance au stress oxydatif et diminuerait les phénomènes d'apoptose, expliquant moins de débris cellulaires dans les lumières tubulaires d'où moins de dilatation tubulaire en amont dans les tubes proximaux. Ces hypothèses séduisantes nécessitent bien sûr des confirmations expérimentales.

## **Rôle délétère des cellules urothéliales intrarénales?**

La prolifération des cellules urothéliales intrarénales pourrait avoir également des conséquences néfastes. Les travaux réalisés, en culture, sur les cellules urothéliales ont démontré que, stimulées par *E. Coli* et *Citrobacter*, ces cellules secrètent du *Platelet Derived Growth Factor*, de l'IL-6, de l'IL-8, et, en quantité moins importante, du *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$* . (Fünfstück R, 2001). Les cytokines et facteurs de croissance pourraient stimuler la prolifération des fibroblastes, et activer des cellules d'inflammation favorisant ainsi la fibrose interstitielle rénale (Sommer M, 2000). Il n'existe actuellement aucun argument *in vivo*.

## *PARTIE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

---

Notre travail a permis de montrer un rôle jusqu'à présent méconnu de l'urothélium intra rénal dans les mécanismes précoces de régénération après obstacle ou ischémie et de montrer la capacité de cette structure à s'adapter afin de maintenir une fonction de barrière très probablement nécessaire à un bon fonctionnement des reins. L'utilisation d'un plan de coupe sagittal nous a également permis de mettre en évidence des liens topographiques entre les fornix et les jonctions cortico médullaires, zones particulièrement sensibles à l'hypoxie tissulaire et siège de la prolifération tubulaire à la suite d'une ischémie rénale.

Les prolongements de ce travail portent sur trois points :

- Mieux identifier la fonction de l'urothélium intra rénal en physiologie et au cours de phénomènes lésionnels grâce au développement d'un modèle de souris transgénique exprimant le récepteur humain de la toxine diphtérique sous contrôle du promoteur de l'uroplakine III afin de pouvoir déclencher à la demande une destruction sélective de l'urothélium, notamment au niveau de la monocouche urothéliale des fornix. La destruction importante de l'urothélium chez ces souris au décours d'une IR unilatérale devrait nous permettre de déterminer précisément le rôle de cet urothélium dans les phénomènes de réparation rénale (régénération et inflammation).
- Identifier les facteurs de croissance et/ou les facteurs inhibiteurs de prolifération en jeu dans la régénération des cellules tubulaires de la zone corticomédullaire grâce aux techniques de microdissection laser et confirmer ou non l'hypothèse d'une sécrétion paracrine urothéliale à l'origine de cette prolifération tubulaire.
- Tester chez l'homme l'effet potentiellement protecteur du FGF7 sur les lésions rénales au cours d'une IRA. Un protocole de recherche clinique a été déposé (Pepira sepis, PHRC2012) afin de tester chez 120 patients (étude randomisée à deux bras : 60 patients traités par FGF7 (Képivot), 60 patients recevant un placebo) l'effet sur la fonction rénale d'une administration précoce de FGF7 chez des patients admis en réanimation médicale pour choc

septique sans insuffisance rénale à l'admission. La survenue d'une IRA est en effet un événement fréquent dans cette population (de l'ordre de 40%) et est associée à une mortalité importante.

## *PARTIE 6. ANNEXE*

---



























## *PARTIE 7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

### *A*

Abbate M, Brown D, Bonventre JV. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 2):F454-63

Aboushwareb T, Zhou G, Deng FM, Turner C, Andersson KE, Tar M, Zhao W, Melman A, D'Agostino R Jr, Sun TT, Christ GJ. Alterations in bladder function associated with urothelial defects in uroplakin II and IIIa knockout mice. *Neurourol Urodyn*. 2009;28(8):1028-33

Abrams GA, Murphy CJ, Wang ZY, Nealey PF, Bjorling DE. Ultrastructural basement membrane topography of the bladder epithelium. *Urol Res*. 2003 Oct;31(5):341-6

Acharya P, Beckel J, Wang E, Ruiz W, Rojas R, Apodaca G. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F305–F318, 2004

Alikhan MA, Jones CV, Williams TM, Beckhouse AG, Fletcher AL, Kett MM, Sakkal S, Samuel CS, Ramsay RG, Deane JA, Wells CA, Little MH, Hume DA, Ricardo SD. Colony-stimulating factor-1 promotes kidney growth and repair via alteration of macrophage responses. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1243-56

Alroy J, Weinstein RS. Intraepithelial asymmetric-unit-membrane plaques in mammalian urinary bladder. *Anat Rec*. 1980 May;197(1):75-83

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7455-6. Review

Amano O, Kataoka S, Yamamoto TY. Turnover of asymmetric unit membranes in the transitional epithelial superficial cells of the rat urinary bladder. *Anat Rec*. 1991 Jan;229(1):9-15

Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2004 Sep;12(9):424-30. Review

Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS. Setting up a selective barrier at the apical junctional complex. *Curr Opin Cell Biol* 16: 2004, 140–145

Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Oct;295(4):F867-76

Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*. 2004 Mar;5(3):117-28. Review

Apodaca G, Balestreire E, Birder LA. The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney Int.* 2007 Nov;72(9):1057-64. Epub 2007 Aug 1. Review

Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS. Setting up a selective barrier at the apical junctional complex. *Curr Opin Cell Biol* 2004, 16: 140–145

Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F867–F876

## **B.**

Bagai S, Rubio E, Cheng JF, Sweet R, Thomas R, Fuchs E, Grady R, Mitchell M, Bassuk JA. Fibroblast growth factor-10 is a mitogen for urothelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Jun 28;277(26):23828-37

Balestreire EM, Apodaca G. Apical EGF receptor signaling: regulation of stretch-dependent exocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 18: 1312–1323, 2007

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9(7):463-75. Epub 2009 Jun 18. Review

Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, Hayward SW, Cunha GR. Growth factors and receptors in bladder development and obstruction. *Lab Invest.* 1996 Aug;75(2):157-66

Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, Nguyen HT, Morgan DM, Hayward SW, Hom YK, DiSandro M, Cunha GR. Growth factors in bladder wound healing. *J Urol.* 1997 Jun;157(6):2388-95

Bates CM. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Aug;301(2):F245-51. Epub 2011 May 25. Review

Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Mar;8(3):235-53. Review

Bindels EM, van der Kwast TH, Izadifar V, Chopin DK, de Boer WI. Functions of epidermal growth factor-like growth factors during human urothelial reepithelialization in vitro and the role of erbB2. *Urol Res.* 2002 Sep;30(4):240-7

Birder LA, Kanai AJ, Cruz F, Moore K, Fry CH. Is the urothelium intelligent? *Neurourol Urodyn.* 2010 Apr;29(4):598-602. Review

Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 2199–2210

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):480-5. Review

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011 Nov;121(11):4210-21. doi: 0.1172/JCI45161. Epub 2011 Nov 1. Review

Burne-Taney MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003 Jan;12(1):85-90. Review

## C.

Calderon RO, Glocker M, Eynard AR. Lipid and fatty acid composition of different fractions from rat urinary transitional epithelium. *Lipids*. 1998 Oct;33(10):1017-22

Casci T, Vinós J, Freeman M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*. 1999 Mar 5;96(5):655-65

Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2009 Jun;75(11):1145-52. Epub 2009 Apr 1. Review

Chaudhuri MM, Moscatelli D, Basilico C. Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand-receptor interaction. *J Cell Physiol*. 1993 Nov;157(2):209-16

Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM. De novo demonstration and colocalization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2001 May;12(5):973-82

Chen Y, Guo X, Deng FM, Liang FX, Sun W, Ren M, Izumi T, Sabatini DD, Sun TT, Kreibich G. Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14012-7

Cheng J, Huang H, Zhang ZT, Shapiro E, Pellicer A, Sun TT, Wu XR. Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res*. 2002 Jul 15;62(14):4157-63

Choi YJ, Baranowska-Daca E, Nguyen V, Koji T, Ballantyne CM, Sheikh-Hamad D, Suki WN, Truong LD. Mechanism of chronic obstructive uropathy: increased expression of apoptosis-promoting molecules. *Kidney Int*. 2000 Oct;58(4):1481-9

Cooper CS, See WA. The impact of iatrogenic urothelial trauma on urinary levels of transforming growth factor-alpha. *J Urol*. 1992 Jun;147(6):1647-9

Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. 2004 Apr 9;304(5668):242-8. Review

Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011 Oct;3(10):920-33. Review

Cremer B, Shorter RG, Bamforth J. The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastro-intestinal tract. *Gut*. 1961 Jun;2:110-8

## D.

da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O, de Sousa LP, Teixeira MM, Santos RA, Simões e Silva AC, Ribeiro Vieira MA.

ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *ClinSci (Lond)*. 2010 Jul 23;119(9):385-94

Daher A, de Boer WI, El-Marjou A, van der Kwast T, Abbou CC, Thiery JP, Radvanyi F, Chopin DK. Epidermal growth factor receptor regulates normal urothelial regeneration. *Lab Invest*. 2003 Sep;83(9):1333-41

Daher A, de Boer WI, Le Frère-Belda MA, Kheuang L, Abbou CC, Radvanyi F, Jaurand MC, Thiery JP, Gil Diez de Medina S, Chopin DK. Growth, differentiation and senescence of normal human urothelium in an organ-like culture. *Eur Urol*. 2004 Jun;45(6):799-805

de Boer WI, Schuller AG, Vermey M, van der Kwast TH. Expression of growth factors and receptors during specific phases in regenerating urothelium after acute injury in vivo. *Am J Pathol*. 1994 Nov;145(5):1199-207

de Boer WI, Vermeij M, Diez de Medina SG, Bindels E, Radvanyi F, van der Kwast T, Chopin D. Functions of fibroblast and transforming growth factors in primary organoid-like cultures of normal human urothelium. *Lab Invest*. 1996 Aug;75(2):147-56

Deng FM, Liang FX, Tu L, Resing KA, Hu P, Supino M, Hu CC, Zhou G, Ding M, Kreibich G, Sun TT. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J Cell Biol*. 2002 Nov 25;159(4):685-94

Dikic I, Schmidt MH. Malfunctions within the Cbl interactome uncouple receptor tyrosine kinases from destructive transport. *Eur J Cell Biol*. 2007 Sep;86(9):505-12. Epub 2007 Jun 5. Review

Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Fitzpatrick JM, Watson RW. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jan;290(1):F4-13. Review

Du X, Shimizu A, Masuda Y, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Uchiyama M, Kaneko T, Akimoto T, Iino Y, Fukuda Y. Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy. *Lab Invest*. 2012 May 21doi: 10.1038/labinvest.2012.68

Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1743-55

## ***E.***

Edelstein CL, Shi Y, Schrier RW. Role of caspases in hypoxia-induced necrosis of rat renal proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Sep;10(9):1940-9

Ellenberger C, Schweizer A, Diaper J, Kalangos A, Murith N, Katchatourian G, Panos A, Licker M. Incidence, risk factors and prognosis of changes in serum creatinine early after aortic abdominal surgery. *Intensive Care Med*. 2006 Nov;32(11):1808-16

Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction, *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:1514-1529

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):139-49

## F.

Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 1997 May 2;276(5313):718-25. Review

Forbes MS, Thornhill BA, Minor JJ, Gordon KA, Galarreta CI, Chevalier RL. Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Apr 25

Freeman MR, Yoo JJ, Raab G, Soker S, Adam RM, Schneck FX, Renshaw AA, Klagsbrun M, Atala A. Heparin-binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder. *J Clin Invest.* 1997 Mar 1;99(5):1028-36

Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):486-91. Review

## G.

Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, Crow MT, King LS, Rabb H. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 2009 Oct;76(7):717-29. Epub 2009 Jul 22

Garcia-Espana A, Chung PJ, Zhao X *et al.* Origin of the tetraspanin uroplakins and their co-evolution with associated proteins: implications for uroplakin structure and function. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 41: 355–367

Ghielli M, Verstrepen W, Nouwen E, De Broe ME. Regeneration processes in the kidney after acute injury: role of infiltrating cells. *Exp Nephrol.* 1998 Nov-Dec;6(6):502-7. Review

Gobé G, Zhang XJ, Willgoss DA, Schoch E, Hogg NA, Endre ZH. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Mar;11(3):454-67

Giltay JC, van de Meerakker J, van Amstel HK, de Jong TP. No pathogenic mutations in the uroplakin III gene of 25 patients with primary vesicoureteral reflux. *J Urol.* 2004 Feb;171(2 Pt 1):931-2

González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003 Jan;81(1):1-44. Review

Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):179-86

## *H.*

Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell.* 1998 Jan 23;92(2):253-63

Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson CV, Blundell TL. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol.* 2004 Jun 11;339(4):821-34

Hainau B, Dombernowsky P. Histology and cell proliferation in human bladder tumors. An autoradiographic study. *Cancer.* 1974 Jan;33(1):115-26

Häcker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jul;6(7):530-41. Review

Haugsten EM, Malecki J, Bjørklund SM, Olsnes S, Wesche J. Ubiquitination of fibroblast growth factor receptor 1 is required for its intracellular sorting but not for its endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2008 Aug;19(8):3390-403

Hicks RM. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol.* 1965 Jul;26(1):25-48

Hicks RM, Ketterer B. Hexagonal lattice of subunits in the thick luminal membrane of the rat urinary bladder. *Nature.* 1969;224:1304-1305

Hicks M, Ketterer B, Warren R. The ultrastructure and chemistry of the luminal plasma membrane of the mammalian urinary bladder: a structure with low permeability to water and ions. *Phil Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1974, 268: 23-38

Hicks M. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev* 1975, 50: 215-246

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):99-110. Review

Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:195-217. Review

Hu P, Deng FM, Liang FX, Hu CM, Auerbach AB, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol.* 2000;151:961-972.

Homma T, Sakai M, Cheng HF, Yasuda T, Coffey RJ Jr, Harris RC. Induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in rat kidney after acute injury. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):1018-25

Hu P, Meyers S, Liang FX, Deng FM, Kachar B, Zeidel M, Sun TT. Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, 283: F1200–F1207

Hu CC, Liang FX, Zhou G, Tu L, Tang CH, Zhou J, Kreibich G, Sun TT. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16 (9):3937-50

Hudoklin S, Jezernik K, Neumüller J, Pavelka M, Romih R. Urothelial plaqueformation in post-Golgi compartments. *PLoS One*. 2011;6(8):e23636. Epub 2011 Aug 24. PubMed PMID: 21887288

Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 1989 Dec;84(6):1757-61

Humphreys BD, Bonventre JV. The contribution of adult stem cells to renal repair. *Nephrol Ther*. 2007 Mar;3(1):3-10. Epub 2007 Feb 22. Review

Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6;2(3):284-91

Humphreys BD, Czerniak S, DiRocco DP, Hasnain W, Cheema R, Bonventre JV. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9226-31

Hung, C.S., Bouckaert, J., et al. (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol*, 44, 903-915

Hurst RE, Rhodes SW, Adamson PB, Parsons CL, Roy JB. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. *J Urol*. 1987 Aug; 138(2):433-7

## *I.*

Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*. 1998 May 22;273(21):13230-5

## *J.*

Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Sep;87(9):859-64. Epub 2009 Jun 28. Review

Jiang S, Gitlin J, Deng FM, Liang FX, Lee A, Atala A, Bauer SB, Ehrlich GD, Feather SA, Goldberg JD, Goodship JA, Goodship TH, Hermanns M, Hu FZ, Jones KE, Malcolm S, Mendelsohn C, Preston RA, Retik AB, Schneck FX, Wright V, Ye XY, Woolf AS, Wu XR,

Ostrer H, Shapiro E, Yu J, Sun TT. Lack of major involvement of human uroplakin genes in vesicoureteral reflux: implications for disease heterogeneity. *Kidney Int.* 2004 Jul;66(1):10-9

Jenkins D, Woolf AS. Uroplakins: new molecular players in the biology of urinary tract malformations. *Kidney Int.* 2007 Feb;71(3):195-200. Epub 2006 Dec 20. Review

Jones JC. Hemidesmosomes in bladder epithelial cells. *Urology.* 2001 Jun;57(6 Suppl 1):103

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):31-53. Review

Jost SP, Gosling JA, Dixon JS. The morphology of normal human bladder urothelium. *J Anat.* 1989 Dec;167:103-15

## K

Kaess BM, Barnes TA, Stark K, Charchar FJ, Waterworth D, Song K, Wang WY, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Zukowska-Szczechowska E, Samani NJ, Hengstenberg C, Tomaszewski M. FGF21 signalling pathway and metabolic traits -genetic association analysis. *Eur J Hum Genet.* 2010 Dec;18(12):1344-8

Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(1):42-9

Karlberg L, Norlén BJ, Ojteg G, Wolgast M. Impaired medullary circulation in postischemic acute renal failure. *Acta PhysiolScand.* 1983 May;118(1):11-7

Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 2004, 279: 12001–12004

Kelly H, Ennis S, Yoneda A, Bermingham C, Shields DC, Molony C, Green AJ, Puri P, Barton DE. Uroplakin III is not a major candidate gene for primary vesicoureteral reflux. *Eur J Hum Genet.* 2005 Apr;13(4):500-2.

Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):1056-63

Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol.* 1998 Jan;16(1):75-9

Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Jul;279(1):C21-30

Khandelwal P, Ruiz WG, Balestreire-Hawryluk E et al. Rab11a-dependent exocytosis of discoidal/fusiform vesicles in bladder umbrella cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15773–15778

- Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Dec;297(6):F1477-501. Epub 2009 Jul 8. Review
- Kida Y, Sato T. Tubular changes in obstructed kidney of adult mice evaluated using immunohistochemistry for segment-specific marker. *Histol Histopathol*. 2007 Mar;22(3):291-303
- Kim J, Kim JI, Na YK, Park KM. Intra-renal slow cell-cycle cells contribute to the restoration of kidney tubules injured by ischemia/reperfusion. *Anat Cell Biol*. 2011 Sep;44(3):186-93
- Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol*. 2007 Dec;25(6):581-93. Epub 2007 Oct 3. Review
- Knowles MA. Novel therapeutic targets in bladder cancer: mutation and expression of FGF receptors. *Future Oncol*. 2008 Feb;4(1):71-83. Review
- Kong XT, Deng FM, Hu P, Liang FX, Zhou G, et al. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *J Cell Biol*. 2004;167:1195–1204.
- Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):14087-91
- Kreft ME, Sterle M, Veranic P, Jezernik K. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochem Cell Biol*. 2005 Jun;123(4-5):529-39
- Kreft ME, Sterle M, Jezernik K. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol*. 2006 May;125(5):475-85
- Kreft ME, Jezernik K, Kreft M, Romih R. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. Mechanisms of exocytosis. *Ann NY Acad Sci* 2009, 1152: 18–29
- Kreplak L, Wang H, Aebi U, Kong XP. Atomic force microscopy of mammalian urothelial surface. *J Mol Biol* 2007, 374: 365–373
- Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol*. 1999 Jul-Aug;12Suppl 2:S142-51. Review
- Knight GE, Bodin P, de Groat WC, Burnstock G. ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distention. *Am. J. Physiol*. 2002;282:F281–F288
- Kwiatkowska E, Kędzierska K, Bober J, Dołęgowska B, Dziedziejko V, Gołembiewska E, Ciechanowski K, Wiśniewska M. Urinary hepatocyte growth factor in dicates ischemia - reperfusion injury after kidney transplantation. *Pol Arch Med Wewn*. 2010 Nov;120(11):437-42
- Kwon O, Phillips CL, Molitoris BA. Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells. *Am J PhysiolRenalPhysiol*. 2002 Jun;282(6):F1012-9

Kwon O, Hong SM, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa NOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Jan;296(1):F25-33

## L.

Lacy ER, Schmidt-Nielsen B. Anatomy of the renal pelvis in the hamster. *Am J Anat*. 1979 Mar;154(3):291-320

Lau JL, Fowler JE Jr, Ghosh L. Epidermal growth factor in the normal and neoplastic kidney and bladder. *J Urol*. 1988 Jan;139(1):170-5

Lavelle J, Meyers S, Ramage R, Bastacky S, Doty D, Apodaca G, Zeidel ML. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Aug;283(2):F242-53

Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med*. 2008 Jul-Aug;14(7-8):502-16. Review

Lendvay TS, Sweet R, Han CH, Soygur T, Cheng JF, Plaire JC, Charleston JS, Charleston LB, Bagai S, Cochrane K, Rubio E, Bassuk JA. Compensatory paracrine mechanisms that define the urothelial response to injury in partial bladder outlet obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F1147-56

Lange C, Tögel F, Itrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1613-7

Lewis SA, Eaton DC, Diamond JM. The mechanism of Na<sup>+</sup> transport by rabbit urinary bladder. *J Membr Biol* 1976, 28: 41-70

Lewis S, de Moura J. Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature* 1982, 297: 685-688

Lewis S, de Moura J. Apical membrane area of rabbit urinary bladder increases by fusion of intracellular vesicle: an electrophysiological study. *J Membr Biol* 1984 82: 123-13

Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE Jr, Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2008 Dec;74(12):1526-37

Liang F, Kachar B, Ding M, Zhai Z, Wu XR, Sun TT. Urothelial hinge as a highly specialized membrane: detergent-insolubility, urohingin association, and in vitro formation. *Differentiation*. 1999 Jul;65(1):59-69.

Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*. 2003 May;14(5):1188-99

Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest.* 2005 Jul;115(7):1756-64

Lin JH, Wu XR, Kreibich G *et al.* Precursor sequence, processing, and urothelium-specific expression of a major 15-kDa protein subunit of asymmetric unit membrane. *J Biol Chem* 1994; 269: 1775–1784

Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2009 Jan;23(1):1-10. Review

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989 Aug;84(2):640-6

## *M.*

Maeshima A, Maeshima K, Nojima Y, Kojima I. Involvement of Pax-2 in the action of activin A on tubular cell regeneration. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Dec;13(12):2850-9

Martin BF. Cell replacement and differentiation in transitional epithelium: a histological and autoradiographic study of the guinea-pig bladder and ureter. *J Anat.* 1972 Sep;112(Pt 3):433-55

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 225-36

Ménager MM, Ménasché G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M, Raposo G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):257-67

Messing EM, Hanson P, Ulrich P, Erturk E. Epidermal growth factor--interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol.* 1987 Nov;138(5):1329-35

Min G, Wang H, Sun TT, Kong XP. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-A resolution. *J Cell Biol.* 2006 Jun 19;173(6):975-83

Minsky BD, Chlapowski FJ. Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J Cell Biol* 1978; 77: 685–697

Misseri R, Rink RC, Meldrum DR, Meldrum KK. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. *J Surg Res.* 2004 Jun 15;119(2):149-59. Review

Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):107-37. Review

Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):496-9

Moody TE, Vaughn ED Jr, Gillenwater JY. Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral urethral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance. *Invest Urol.* 1975 Nov;13(3):246-51

Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jul;15(7):1794-804

Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008 Aug;26(8):2075-82

## *N.*

Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 2000 Dec 1;109(8):665-78. Review

Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1996, 271: F886–F894

Nigam S, Lieberthal W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jul;279(1):F3-F11. Review

Noguchi S, Yura Y, Sherwood ER, Kakinuma H, Kashihara N, Oyasu R. Stimulation of stromal cell growth by normal rat urothelial cell-derived epidermal growth factor. *Lab Invest.* 1990 May;62(5):538-44

## *O.*

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3) Review

Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004 Sep;114(6):795-804

## *P.*

Parsons CL, Boychuk D, Jones S, Hurst R, Callahan H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *J Urol.* 1990 Jan;143(1):139-42

Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology.* 2007 Apr;69(4 Suppl):9-16. Review

Porter KR, Kenyon K, Badenhausen S. Specializations of the unit membrane. *Protoplasma* 1967; 63: 262–274

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):165-97. Review

## Q.

Porter K, Kenyon K, Badenhausen S. Specializations of the unit membrane. *Protoplasma* 1967, 63: 262–274

## R.

Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*. 1985 Jan 17-23;313(5999):228-31

Rembish SJ, Trush MA. Further evidence that lucigenin-derived hemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolarmacrophages. *Free Radic Biol Med*. 1994 Aug;17(2):117-26

Rebel JM, De Boer WI, Thijssen CD, Vermey M, Zwarthoff EC, Van der Kwast TH. An in vitro model of urothelial regeneration: effects of growth factors and extracellular matrix proteins. *J Pathol*. 1994 Jul;173(3):283-91

Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol*. 2001 Mar-Apr;29(2):159-73

Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3522-30. Review

Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000 Nov 20;19(49):5548-57. Review

Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol*. 1999 Mar;65(3):291-8. Review

Romih R, Veranic P, Jezernik K. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol*. 1999 Nov; 112(5):375-80.

Romih R, Koprivec D, Martincic DS, Jezernik K. Restoration of the rat urothelium after cyclophosphamide treatment. *Cell Biol Int*. 2001;25(6):531-7

Romih R, Korosec P, de Mello W Jr, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res*. 2005 May;320(2):259-68

## S.

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2443-56

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004 Jul; 114(1):5-14. Review

Schoorlemmer J, Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol*. 2001 May 15;11(10):793-7

Schwartz MA, Assoian RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*. 2001 Jul;114(Pt 14):2553-60. Review

Silverblatt FJ. Ultrastructure of the renal pelvic epithelium of the rat. *Kidney Int*. 1974 Mar;5(3):214-20

Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep*. 2012 Jan;64(1):31-44

Soltoff SP, Cantley LC. p120<sup>cas</sup> is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem*. 1996 Jan 5;271(1):563-7

Spector DA, Wade JB, Dillow R, Steplock DA, Weinman EJ. Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jun;282(6):F1034-42

Spector DA, Yang Q, Liu J, Wade JB. Expression, localization, and regulation of urea transporter B in rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Jul;287(1):F102-8

Spector DA, Deng J, Stewart KJ. Hydration status affects urea transport across rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Dec;301(6):F1208-17. Epub 2011 Sep 7

Spector DA, Yang Q, Klopouh L, Deng J, Weinman EJ, Steplock DA, Biswas R, Brazie MF, Liu J, Wade JB. The ROMK potassium channel is present in mammalian urinary tract epithelia and muscle. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Dec;295(6):F1658-65. Epub 2008 Sep 17

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*. 1994 Dec 16;79(6):1015-24

Stahelin LA, Chlapowski FJ, Bonneville MA. Lumenal plasma membrane of the urinary bladder. I. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images. *J Cell Biol*. 1972;53:73-91

Steinberg F, Zhuang L, Beyeler M, Kälin RE, Mullis PE, Brändli AW, Trueb B. The FGFR1 receptor is shed from cell membranes, binds fibroblast growth factors (FGFs), and antagonizes FGF signaling in *Xenopus* embryos. *J Biol Chem*. 2010 Jan 15;285(3):2193-202

Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int*. 2009 Mar;75(5):475-81. Epub 2008 Aug 20. Review

Suc Jean-Michel, Durand Dominique. *Manuel de néphrologie clinique* Paris: Elipses, 2001 Partie 4, p 364- 365

Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest*. 1971 Dec;25(6):635-43

Sun TT. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jul;291(1):F9-21. Epub 2006 Apr 11. Review

## T

Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest*. 1997 Jun 1;99(11):2682-90

Takenaka H, Yasuno H, Kishimoto S. Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors in normal and wounded human skin. *Arch Dermatol Res*. 2002 Oct;294(7):331-8

Tash JA, David SG, Vaughan ED ED, Herzlinger DA. Fibroblast growth factor-7 regulates stratification of the bladder urothelium. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2536-41

Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation*. 1997 Oct 15;64(7):945-7 Review

Tiwari S, Italiano JE Jr, Barral DC, Mules EH, Novak EK, Swank RT, Seabra MC, Shivdasani RA. A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3970-9

Tomlinson DC, Lamont FR, Shnyder SD, Knowles MA. Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer. *Cancer Res*. 2009 Jun 1;69(11):4613-20

Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, Zeidel M, Stoffer D, Apodaca G. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Mar;13(3):830-46

Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, Zeidel M, Stoffer D, Apodaca G. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 13: 830–846, 2002

Truong LD, Petrusevska G, Yang G, Gurpinar T, Shappell S, Lechago J, Rouse D, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int.* 1996 Jul;50(1):200-7

Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, Suki WN. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int.* 2001 Sep;60(3):924-34

Truong LD, Gaber L, Eknayan G. Obstructive uropathy. *Contrib Nephrol.* 2011;169:311-26. Epub 2011 Jan 20

Tu L, Sun TT, Kreibich G. Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4221–4230

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Feb;10(2):116-29. Review

## V.

Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell.* 2004 Jul 23;118(2):257-70

## V.

Vaughan ED Jr, Marion D, Poppas DP, Felsen D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *J Urol.* 2004 Dec;172(6 Pt 2):2563-9

Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol.* 2006 Aug;208(2):407-17.

Veranic P, Jezernik K. The response of junctional complexes to induced desquamation in mouse bladder urothelium. *Biol Cell.* 2000 Apr;92(2):105-13

Veranic P, Jezernik K. Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2002 Dec;53(4):317-25.

Veranic P, Jezernik K. The cytokeratins of urinary bladder epithelial cells. *Asian J Cell Biol* 2006, 1: 1–8

Vergara J, Longley W, Robertson JD. A hexagonal arrangement of subunits in membrane of mouse urinary bladder. *J Mol Biol.* 1969;46:593–596

Villanueva S, Cespedes C, Gonzales AA, Roessler E, Vio CP. Inhibition of bFGF-receptor type 2 increases kidney damage, and suppresses nephrogenic protein expression after ischemic renal failure. *Am J PhysiolRegulIntegrCompPhysiol* 294: R819–R828, 2008

## W.

Walser BL, Yagil Y, Jamison RL. Urea flux in the ureter. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1988, 255: F244–F249

Walz T, Haner M, Wu XR, Henn C, Engel A, et al. Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed “twisted ribbon” structure. *J Mol Biol.* 1995;248:887–900

Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA, Birder LA, Apodaca G. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2412-22

Wang H, Liang FX, Kong XP. Characteristics of the phagocytic cup induced by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Histochem Cytochem.* 2008 Jun;56(6):597-604. 2008 Mar 17

Warburton D, Bellusci S. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S283-7. Review

Wein AJ. An antiproliferative factor from interstitial cystitis patients is a frizzled 8 protein-related sialoglycopeptide. *J Urol.* 2005 Mar; 173(3):909-10

Weinstein GD, McCullough JL, Ross P. Cell proliferation in normal epidermis. *J Invest Dermatol.* 1984 Jun;82(6):623-8

Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J.* 2011 Jul 15;437(2):199-213. Review

Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Sep;7(9):493-507. Epub 2010 Jun 15. Review

Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics.* 2000 Oct 15;69(2):275-9

Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994 May;93(5):2175-88

Wickham JE. Active transport of sodium ion by the mammalian bladder epithelium. *InvestUrol.* 1964 Sep;2:145-53

Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994 May;93(5):2175-88

Wu XR, Manabe M, Yu J, Sun TT. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem.* 1990 Nov 5;265(31):19170-9

Wu XR, Sun TT. Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein. *J Cell Sci* 1993; 106: 31–43

Wu XR, Lin JH, Walz T, Häner M, Yu J, Aebi U, Sun TT. Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *J Biol Chem*. 1994 May 6;269(18):13716-24

Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int*. 2009 Jun; 75(11):1153-65

## X.

Xie B, Zhou G, Chan SY, Shapiro E, Kong XP, Wu XR, Sun TT, Costello CE. Distinct glycan structures of uroplakins Ia and Ib: structural basis for the selective binding of FimH adhesin to uroplakin Ia. *J Biol Chem*. 2006 May 26;281(21):14644-53. Epub 2006 Mar 27.

## Y.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37. Review

Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology*. 2012 May;116(5):1139-48

Yeh BK, Igarashi M, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Sher I, Ron D, Aaronson SA, Mohammadi M. Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2266-71

Yi ES, Shabaik AS, Lacey DL, Bedoya AA, Yin S, Housley RM, Danilenko DM, Benson W, Cohen AM, Pierce GF, et al. Keratinocyte growth factor causes proliferation of urothelium in vivo. *J Urol*. 1995 Oct;154(4):1566-70

Yu H J, Chien CT, Lai YJ, Lai MK, Chen CF, Levin RM, Hsu SM. Hypoxia preconditioning attenuates bladder overdistension-induced oxidative injury by up-regulation of Bcl-2 in the rat. *J Physiol*. 2004 Feb 1;554(Pt 3):815-28

Yu J, Manabe M, Wu XR, Xu C, Surya B, et al. Uroplakin I: a 27-kD protein associated with the asymmetric unit membrane of mammalian urothelium. *J Cell Biol*. 1990; 111:1207–1216

Yu J, Manabe M, Sun TT. Identification of an 85-100 kDa glycoprotein as a cell surface marker for an advanced stage of urothelial differentiation: association with the inter-plaque ('hinge') area. *Epithelial Cell Biol*. 1992 Jan;1(1):4-12

Yu W, Zacharia LC, Jackson EK, Apodaca G. Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Aug;291(2):C254-65. Epub 2006 Mar 29

Yu W, Khandelwal P, Apodaca G. Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical surface of bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*. 2009 Jan;20(1):282-95

## Z.

Zahraoui A Les jonctions serrées : plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires M/S : médecine sciences, Volume 20, numéro 5, mai 2004, p. 580-585

Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Dec;19(12):2282-7

Zheng F, Lawson SN. Neurokinin A in rat renal afferent neurons and in nerve fibres within smooth muscle and epithelium of rat and guinea-pig renal pelvis. *Neuroscience*. 1997 Feb;76(4):1245-55

Zhao Y, Zhang ZY. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):32382-91

Zhang D, Kosman J, Carmean N, Grady R, Bassuk JA. FGF-10 and its receptor exhibit bidirectional paracrine targeting to urothelial and smooth muscle cells in the lower urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Aug;291(2):F481-94