

Fibrose rénale

Glomérulosclérose progressive et fibrose interstitielle accompagnent la plupart des affections rénales chroniques, aboutissant à l'insuffisance rénale terminale. Leur pathogénie est pratiquement inconnue, mais on sait qu'elles ont un certain déterminisme génétique. La matrice extracellulaire glomérulaire comporte de nombreux éléments synthétisés par les cellules glomérulaires stimulées par des cytokines. Cette synthèse accrue, objectivée par l'augmentation de leurs ARNm, a été étudiée dans des souris transgéniques développant spontanément une glomérulosclérose. La fibrose interstitielle est moins bien connue : les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules tubulaires sont tous trois susceptibles de synthétiser l'excès de matrice extracellulaire.

Liliane J. Striker
Emmanuel P. Peten
Ci-Jiang He
Gary E. Striker

Le terme « fibrose » dérivé de fibres, suggère l'existence d'un processus pathologique lié à la présence anormale de fibres, tandis que sclérose signifie « dur » en grec. Pour des raisons historiques, les termes de glomérulosclérose et fibrose glomérulaire ou de fibrose et sclérose rénales sont employés indifféremment pour désigner des affections chroniques du parenchyme rénal ayant abouti à la destruction des éléments fonctionnels du néphron.

La fibrose du rein, phénomène tardif, cicatriciel, n'a guère suscité d'intérêt pendant des décennies jusqu'à l'apparition d'outils permettant d'en disséquer la composition et d'en mieux comprendre les causes. De multiples affections évoluent vers la fibrose et cet article n'a pas pour objet d'en donner une liste exhaustive. Le rein est un organe formé d'unités fonctionnelles hétérogènes : les glomérules, le tissu interstitiel et les tubules. Bien que ces divers éléments

communiquent entre eux, on distingue habituellement la fibrose d'origine glomérulaire et la fibrose interstitielle qui seront envisagées séparément car les divers compartiments du rein obéissent à des systèmes de régulation différents. Nos propres travaux ont été consacrés à la pathologie du glomérule sur laquelle sera centré cet article.

Glomérulosclérose/ Fibrose glomérulaire

Le terme de glomérulosclérose désigne des affections glomérulaires variées ayant en commun l'envahissement progressif du flocculus par un matériel fibreux qui contribue à sa destruction par oblitération (*figure 1*). Ce phénomène, bien connu depuis les descriptions classiques de Bright, fait l'objet d'une excellente description dans un article de Becquerel en 1841 [1]. Celui-ci écrit ainsi que les « corpuscules » de Malpighi « se touchent », et finissent par s'oblitérer au

ADRESSE

L.J. Striker : *senior investigator*. E.P. Peten : *visiting associate*. C.J. He : *visiting associate*. G.E. Striker : *senior investigator*. Renal cell Biology Section, NIDDK, National Institute of Health, Building 10, Room 3N110, Bethesda, Maryland 20892, États-Unis.

RÉFÉRENCES

1. Becquerel A. Traité de la maladie de Bright aux divers âges de la vie. In: *Sémiologie des urines*, 1 vol. Paris: Fortin, Masson et Cie, 1841.
2. Morel-Maroger Striker LJ, Killen PD, Chi E, Striker GE. The composition of glomerulosclerosis: 1. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 1984 ; 51 : 181-92.
3. Bruneval P, Foidart JM, Nochy D, Camilleri JP, Bariety J. Glomerular matrix proteins in nodular glomerulosclerosis in association with light chain deposition disease and diabetes mellitus. *Hum Pathol* 1985 ; 16 : 477-84.
4. Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Path* 1991 ; 139 : 889-99.
5. Couchman JR, Beavan LA, McCarthy K J. Glomerular matrix : synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 328-36.
6. Striker GE, Striker LJ. Glomerular cell culture. *Lab Invest* 1986 ; 53 : 181-91.
7. Tryggvason K, Zhou J, Hostikka S, Sariola H. Type IV collagen in normal and diseased glomerular basement membrane. In: Grunfeld JP, Bach JF, Kreis H, Maxwell M, eds. *Advances in nephrology*. St-Louis : Mosby, 1993 : 1-13.
8. Floege J, Radeke HR, Johnson RJ. Glomerular cells *in vitro* versus the glomerulus *in vivo*. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 360-9.
9. Striker GE, Peten EP, Carome MA, Pesce CM, Schmidt K, Yang CW *et al*. The kidney disease of diabetes mellitus (KDDM) : a cell and molecular biology approach. *Diabetes Metab Rev* 1993 ; 9 : 37-56.
10. Abboud HE. Resident glomerular cells in glomerular injury: mesangial cells. *Semin Nephrol* 1991 ; 11 : 304-10.

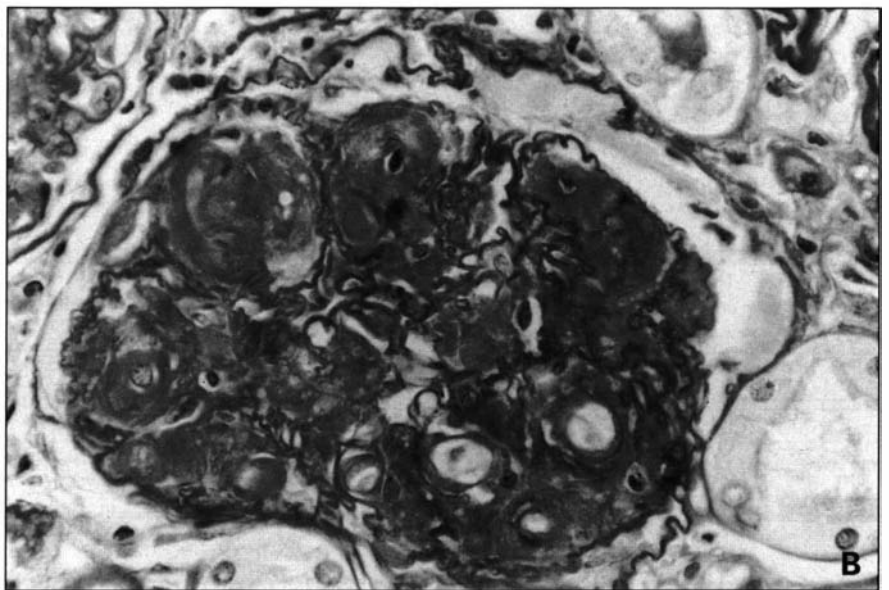
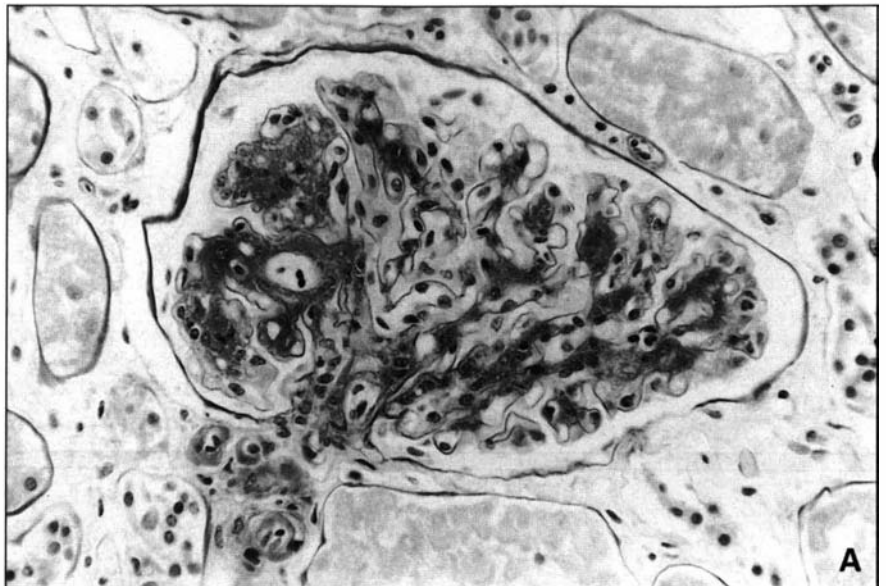


Figure 1. **Sclérose mésangiale diffuse (A) chez un sujet diabétique (A).** Glomérule en pain à cacheter chez un diabétique (A). On notera que toutes les anses capillaires sont envahies et que l'architecture normale a disparu. (Coloration PAS x 400.)

cours du mal de Bright. Il pratique des injections dans les vaisseaux intrarénaux de sujets morts de cette affection et constate que les glomérules sont devenus imperméables. La lésion terminale, dite « pain à cacher », constitue l'aboutissement de la plupart des glomérulopathies chroniques. Morphologiquement, une coloration par le PAS ou une imprégnation argentique montrent que la destruction du glomérule revêt des aspects divers au cours des différentes variétés d'atteinte rénale, ce qui permet de supposer que leur pathogénie est différente. L'apparition de nouveaux réactifs, tels que les anticorps dirigés contre les constituants de la membrane basale, a permis de disséquer l'archéologie du glomérule et d'intégrer des éléments de biologie moléculaire à l'analyse de la progression des lésions. La composition de la glomérulosclérose humaine, analysée par immunohistochimie, varie au cours des différentes affections rénales mais on y observe des collagènes, des glycoprotéines, notamment de la laminine et de la ténascine, des protéoglycanes, de la fibronectine [2-4] (figure 2). Les quantités respectives de ces compo-

sants et leur mode d'accumulation sont encore largement inconnus. La réponse à ces questions permettra peut-être des progrès importants dans le traitement des affections glomérulaires progressives.

Composition, synthèse et régulation de la matrice extracellulaire normale

La matrice extracellulaire du glomérule normal (figure 3) comporte deux compartiments qui diffèrent par leur composition. La membrane basale périphérique est composée de collagènes de la membrane basale, notamment de type IV, V et VI, de glycoprotéines, et de protéoglycanes [5, 6]. Deux sous-chaines du collagène IV, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont exprimées de façon préférentielle dans la membrane basale périphérique ainsi que le montre l'examen immunochimique du glomérule [5, 7]. En revanche, la matrice mésangiale contient de la fibronectine, de la laminine, des protéoglycanes et les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène IV y sont représentées en abondance [6, 7].

La synthèse de ces divers composants est assurée par les cellules glomérulaires [5, 6, 8-10]. Le glomérule

contient plusieurs types cellulaires : cellules épithéliales ou podocytes, cellules mésangiales, cellules endothéliales. La présence d'un petit nombre de macrophages/monocytes résidents est établie chez la souris et le rat, rendant probable leur existence chez l'homme, mais la démonstration de leur existence n'est pas formelle [6]. *In vitro*, les cellules mésangiales et épithéliales peuvent synthétiser les éléments de la matrice extracellulaire ; les cellules endothéliales, moins explorées, participent sans doute à la synthèse de la membrane basale périphérique.

Régulation de la matrice à l'état pathologique

Il est probable que les cellules mésangiales jouent un rôle prépondérant dans la glomérulosclérose en ce qui concerne la production de matrice extracellulaire, mais les autres cellules du glomérule sont capables de participer aux réponses mésangiales, notamment par le biais de phénomènes paracrines [8-12].

Facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissance induisent une réponse proliférative des cellules mésangiales *in vitro* ; en revanche, un effet direct sur la synthèse de la matrice extracellulaire n'a été démontré que pour un petit nombre de peptides : le TGF $\beta 1$, l'angiotensine II et l'II.1 [8, 9, 11, 12]. Le TGF $\beta 1$ a pour propriété d'augmenter la synthèse du collagène de type I. Son effet sur les composants de la membrane basale s'exerce essentiellement sur les protéoglycanes [13]. La régulation des autres composants de la membrane basale est encore mal connue. La plupart des autres cytokines sont des mitogènes. Il est probable, comme l'ont suggéré de nombreux travaux, que la prolifération mésangiale précède la production de matrice dans de nombreux cas [8-12]. Des arguments indirects suggèrent que le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le FGF basique (*fibroblast growth factor*) peuvent promouvoir une augmentation du collagène *in vitro*, mais les données sont encore fragmentaires et demandent confirmation. Certains auteurs ont incriminé l'IGF-1 (*insulin-like*

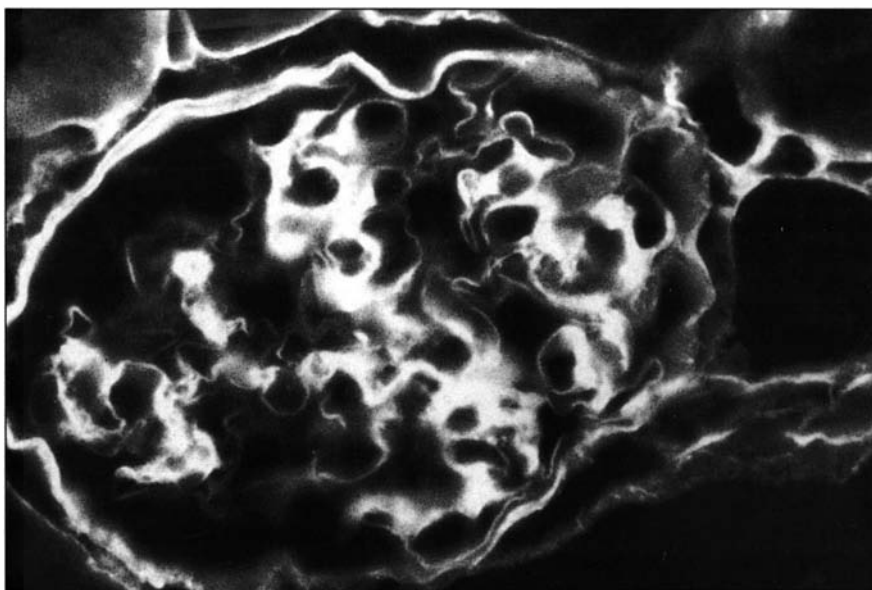


Figure 2. Accumulation de collagène IV dans un glomérule présentant une image de sclérose mésangiale. (Immunofluorescence x 250.)

RÉFÉRENCES

11. Kopp JB, Bruggeman LA, Klotman PE. Extracellular matrix gene expression in experimental glomerulonephritis. *Curr Op Nephrol Hypert* 1993 ; 2 : 609-17.
12. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Marx M. Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int* 1993 ; 39 : S26-S31.
13. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in disease : the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992 ; 90 : 1-7.
14. Doi T, Striker LJ, Gibson CC, Agodoa LYC, Brinster RL, Striker GE. Glomerular lesions in mice transgenic for growth hormone and insulin-like growth factor. *Am J Pathol* 1990 ; 137 : 541-52.
15. Ayo SH, Radnik RA, Glass WF, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, *et al*. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol* 1991 ; 29 : F185-91.
16. Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2873-7.
17. Merlet-Bénichou C, Leroy B, Gilbert T, Lelievre-Pégorier M. Retard de croissance intra-utérin et déficit en néphrons. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 777-80.
18. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kid Dis* 1994 ; 23 : 171-5.
19. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, and Trygvasson K. Identification of a distinct type IV collagen-chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 1606-10.
20. Pelletier J, Bruenig W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, *et al*. Germline mutations in the Wilm's tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991 ; 67 : 437-47.

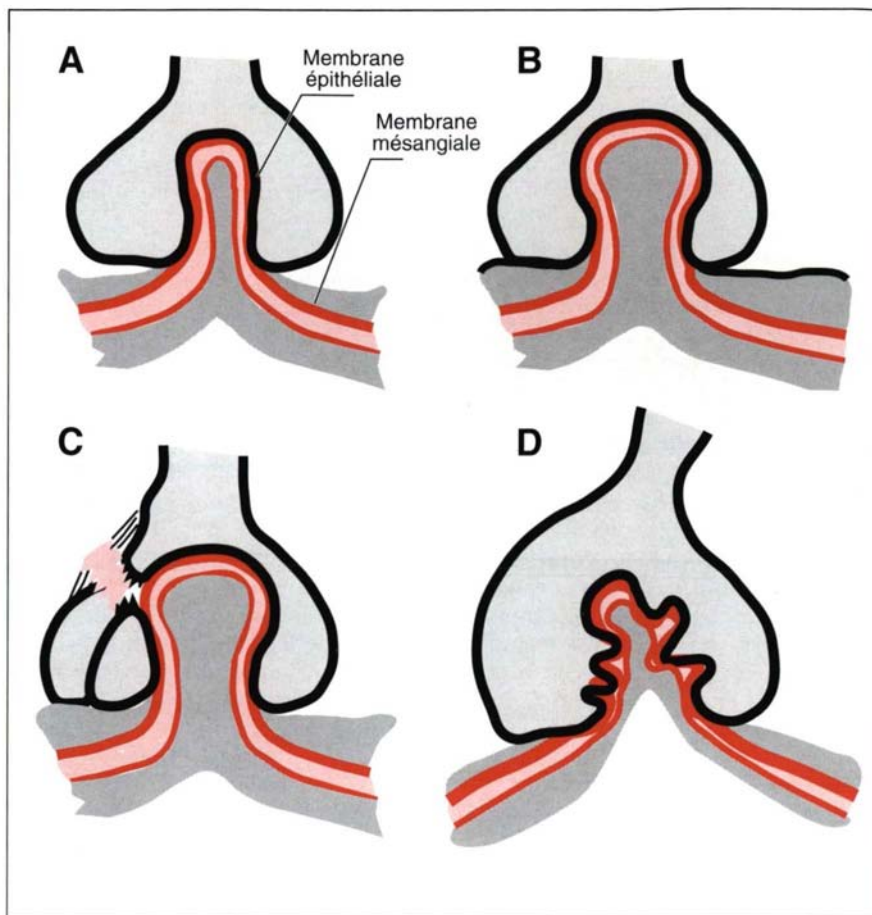


Figure 3. **Représentation schématique de la matrice extracellulaire normale et des divers types de sclérose glomérulaire.** A. La structure de la membrane basale mésangiale et de la membrane épithéliale est différente dans le glomérule normal. B. Sclérose d'origine mésangiale. C. Sclérose d'origine épithéliale : la production de matrice par les podocytes entraîne le développement d'une synéchie (pont de tissu collagène) entre le glomérule et la capsule, contenant du collagène interstitiel. D. Sclérose ischémique : atrophie mésangiale et épaississement de la membrane épithéliale.

growth factor) mais nos propres travaux *in vitro* et *in vivo*, utilisant des souris transgéniques pour IGF-I semblent indiquer que ce peptide qui est un facteur de progression de la maladie, agit comme un mitogène, mais n'a pas d'effet direct sur la production de collagène [14]. En revanche, ce peptide augmente la synthèse des protéoglycanes par les cellules mésangiales de rat.

Quelques expériences récentes suggèrent un rôle dans la progression de certaines glomérulonephrites *in vivo*, pour le TGF β 1, l'angiotensine II et, de façon moins certaine, pour le PDGF et le FGF basique [10, 11, 13].

Facteurs métaboliques

Certains facteurs métaboliques paraissent promouvoir la production de

matrice. C'est ainsi que l'exposition prolongée de cellules mésangiales de rat à des taux élevés de glucose (plusieurs semaines) s'accompagne d'une augmentation de la synthèse du collagène de type IV [15]. Nous avons montré que l'exposition de cellules mésangiales de souris aux produits avancés de la glycosylation des protéines (*advanced glycosylation end products*, AGE) s'accompagne de l'augmentation d'ARN messagers codant pour plusieurs éléments de la matrice extracellulaire, notamment la chaîne α 1 du collagène IV, la laminine (chaînes B1 et B2), l'héparan sulfate, mais non le collagène interstitiel de type I [16]. Cette augmentation s'accompagne d'une sécrétion accrue de collagène IV ; l'occupation de récepteurs des AGE présents à la surface des cellules mésangiales sti-

Tableau I	
FACTEURS DÉTERMINANT LA GENÈSE/ PROGRESSION DES GLOMÉRULOSCLÉROSES	
Facteurs génétiques	<p>Nombre insuffisant de glomérules et/ou hypertrophie glomérulaire (oligoméganéphronie)</p> <p>Mutations :</p> <p>Gènes codant pour la matrice extracellulaire (syndrome d'Alport)</p> <p>Gènes répresseurs (Denys-Drash/WT-1)</p>
Facteurs de croissance	<p>Production exagérée de facteurs de croissance/cytokines</p> <p>Réponse anormale à des facteurs de croissance</p>
Facteurs métaboliques	<p>Hyperglycémie (diabète/produits avancés de la glycosylation)</p> <p>Anomalies lipidiques (Défaut enzymatique ou au cours du syndrome néphrotique)</p>
Régulation de la synthèse du collagène	<p>Niveau élevé d'activation génique à l'état de base</p> <p>Réponse exagérée</p> <p>Diminution de la dégradation du collagène et/ou des autres éléments de la matrice extracellulaire</p>
Dysrégulation de la prolifération cellulaire	<p>Augmentation de la mitogenèse mésangiale</p> <p>Diminution de l'apoptose</p>

mule l'expression des gènes du collagène IV. Nous avons également montré que cette augmentation était inhibée par un anticorps dirigé contre le PDGF, suggérant un rôle pour ce peptide dans l'effet des AGE sur le glomérule. Il est cependant bon de noter que les expériences utilisant les cultures cellulaires ne peuvent pas facilement être extrapolées à la situation *in vivo*.

Facteurs de risque pour le glomérule

La plupart des affections glomérulaires peuvent évoluer vers la sclérose terminale. Cependant, le risque pour un malade donné d'évoluer de la sorte paraît sous la dépendance de nombreux facteurs (Tableau I). La pathogénie de la détérioration progressive

des glomérules est encore mal connue dans les affections humaines, malgré les nombreux travaux récemment consacrés à ce sujet. On connaît depuis peu l'existence de facteurs de risque congénitaux ou acquis pour le glomérule. Parmi les facteurs congénitaux, on retiendra la présence d'un nombre insuffisant de néphrons dont un exemple extrême est l'oligoméganéphronie, affection congénitale caractérisée par la réduction du nombre de néphrons et par l'hypertrophie des néphrons résiduels, mais dont l'origine exacte est inconnue [17, 18]. La plupart des mutations connues concernent la membrane basale et on a identifié l'existence de mutations responsables de plusieurs variétés de néphropathies familiales dont l'exem-

ple le plus connu est le syndrome d'Alport dans lequel des mutations du gène codant pour la chaîne $\alpha 5$, et plus rarement pour les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ du collagène IV s'accompagnent d'anomalies de la membrane basale glomérulaire et de sclérose progressive du mésangium (*m/s n° 5, vol. 7, p. 510*) [7, 19, 20]. Il est néanmoins intéressant de noter qu'on ne connaît pas le mécanisme exact qui détermine la sclérose mésangiale dans cette affection, dans la mesure où la chaîne $\alpha 5$ ne semble pas exprimée dans cette région. Une autre série de mutations qui concernent le gène de la tumeur de Wilms (*WT-1*) s'accompagne de lésions connues sous le nom de sclérose mésangiale diffuse qui entraînent rapidement la destruction totale des glomérules [21]. Dans ce dernier cas, la physiopathologie des lésions paraît différente. En effet, le gène *WT-1* est un gène répresseur et on peut envisager que sa perte entraîne une activation et une prolifération incontrôlée des cellules mésangiales, encore qu'il ne s'agisse là que d'une hypothèse.

Parmi les autres facteurs qui semblent prédisposer à la progression de la sclérose, l'hypertrophie des glomérules semble, à elle seule, un élément de mauvais pronostic au cours de nombreuses néphropathies chroniques. En effet, les glomérules des sujets atteints de diabète sucré insulino-dépendant sont hypertrophiques, à l'instar de ceux de la hyalinose focale [22, 23]. En outre, certains travaux suggèrent que l'hypertrophie glomérulaire prédit la progression vers la sclérose dans les syndromes néphrotiques à lésions glomérulaires minimales [23].

Enfin, parmi les déterminants de l'aggravation progressive des lésions on retiendra l'existence d'un risque familial ainsi que le montrent les études épidémiologiques. On connaît ainsi des familles de diabétiques dans lesquelles la progression vers l'insuffisance rénale est rapide, tandis que dans d'autres celle-ci est lente, à contrôle glycémique égal [24].

Modèles expérimentaux

Des innombrables travaux expérimentaux consacrés à ce sujet, nous ne décrivons brièvement que deux des modèles murins étudiés dans

RÉFÉRENCES

21. Aumailley M, Verrando P. Structure et pathologie des membranes basales. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 926-33.
22. Osterby R. Glomerular structural changes in type I insulin-dependent diabetes mellitus : causes, consequences, and prevention. *Diabetologia* 1992 ; 35 : 803-12.
23. Fogo A, Hawkins EP, Berry PI, Glick AD, Chiang ML, Mac Donell RC, *et al.* Glomerular hypertrophy in minimal change predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney int* 1990 ; 38 : 115-23.
24. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease : evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 1161-5.
25. Zalups RK. The Os/+ mouse : a genetic animal model of reduced renal mass. *Am J Physiol* 1993 ; 264 : F53-60.
26. Doi T, Striker LJ, Kimata K, Peten EP, Yamada Y, Striker GE. Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney MRNA levels. *J Exp Med* 1991 ; 173 : 1287-90.
27. Pesce CM, Striker LJ, Peten EP, Elliot S, Striker GE. Glomerulosclerosis at both early and late stages is associated with increased cell turnover in mice transgenic for growth hormone. *Lab Invest* 1990 ; 65 : 601-5.
28. Peten EP, Garcia-Perez A, Terada Y, Woodrow DF, Martin BM, Striker GE *et al.* Age-related changes in alpha 1- and alpha 2-chain type IV collagen mRNAs in adult mouse glomeruli: competitive PCR. *Am J Physiol* 1992 ; 263 : F951-57.
29. Peten EP, Striker LJ, Garcia-Perez A, Striker GE. Studies by competitive PCR of glomerulosclerosis in growth hormone transgenic mice. *Kidney Int* 1993 ; 39 : S55-8.
30. Yang CW, Striker LJ, Pesce C, Chen WY, Peten EP, Elliot S, *et al.* Glomerulosclerosis and body growth are mediated by different portions of bovine growth hormone. Studies in transgenic mice. *Lab Invest* 1993 ; 68 : 62-70.
- notre laboratoire qui nous paraissent contribuer à la dissection de la glomérulosclérose : les souris transgéniques pour l'hormone de croissance (GH) et les souris OS [14, 25].
- *Souris transgéniques pour l'hormone de croissance*
- Rôle des facteurs de croissance.** De nombreux arguments suggèrent le rôle de facteurs de croissance dans le développement des gloméruloscléroses humaines. Afin d'analyser les relations entre hypertrophie et sclérose glomérulaire, nous avons rapporté un modèle de glomérulosclérose progressive chez des souris transgéniques pour l'hormone de croissance (GH). Ces souris, obtenues par l'introduction d'un transgène chez des SJJL/CB57B, ont une croissance somatique exagérée et atteignent un poids et une taille environ deux fois supérieurs à la normale. Il est à remarquer que les glomérules augmentent de volume, plus que le reste du rein, et plus que ne le voudrait l'augmentation de la croissance somatique, ce qui montre que les divers éléments du parenchyme rénal obéissent à des systèmes de régulation différents. Une accumulation progressive de multiples composants de la matrice extracellulaire, comprenant notamment du collagène de type IV, de la laminine, des protéoglycanes, envahit le mésangium. En outre, il apparaît du collagène de type I, un collagène interstitiel, non présent à l'état normal, illustrant les modifications phénotypiques induites dans cette affection [26]. A cet égard, il est intéressant de constater que des collagènes interstitiels s'accumulent dans les lésions terminales de nombreuses néphropathies humaines [4]. L'accumulation progressive de ces divers éléments chez les souris GH provoque la destruction totale des glomérules entre huit et dix mois, entraînant la mort dans un tableau d'insuffisance rénale terminale. Ce modèle de sclérose glomérulaire diffuse et progressive est caractérisé par l'absence d'hypertension et d'hyperfiltration glomérulaire. Fait intéressant, il existe une augmentation du turnover des cellules glomérulaires mesurable par autoradiographie, présente non seulement dans les lésions précoces, mais égale-
- ment à la phase tardive de l'affection, alors que les glomérules sont très scléreux [27]. Bien que les cellules marquées par la thymidine n'aient pas été identifiées formellement, leur situation dans les touffes glomérulaires suggère qu'elles sont de nature mésangiale ou endothéliale. Fait important, elles sont situées dans les zones de fibrose glomérulaire. Cette constatation suggère que la sclérose est l'objet de remaniements continus, tardifs, et remet en question le dogme ancien de la cicatrice inerte.
- Biologie moléculaire de la sclérose.** Nous avons utilisé ce modèle pour tenter de disséquer certains des événements moléculaires à l'origine de la glomérulosclérose. Nous avons initialement mesuré la quantité d'ARNm codant pour certains composants de la matrice extracellulaire dans des extraits de rein total et observé une augmentation modeste mais significative par comparaison à des reins témoins (de une à deux fois supérieure à la normale), mesurée par la méthode dite de *nuclease protection assay* nettement plus sensible que le *Northern blot* [26]. Il convient cependant de noter que ces chiffres ne rendent pas compte de la biosynthèse locale ayant lieu dans les glomérules, car ceux-ci ne représentent qu'une fraction minime du cortex rénal et leur réponse diffère de celle du reste du parenchyme. Ce type de méthode n'est pas utilisable pour les glomérules de souris en raison de la faible quantité de matériel contenu dans un glomérule murin. D'autre part, les méthodes d'hybridation *in situ* ne sont pas assez sensibles pour analyser la matrice extracellulaire intraglomérulaire chez l'adulte, faute d'un signal suffisant, ce qui nous a conduits à développer une méthode décrite plus loin, utilisant la *polymerase chain reaction* (PCR). Afin d'évaluer la synthèse de la matrice extracellulaire dans les glomérules, nous avons mis au point une méthode combinant isolement des glomérules par microdissection, transcription inverse *in situ* et PCR (RT-PCR) avec un dosage par compétition (*figure 4*) [28]. Dans ces conditions, il est possible de mesurer avec précision, et de façon reproductible, des quantités très minimes d'ARNm. Cette méthode a été rapportée en détail dans des publica-

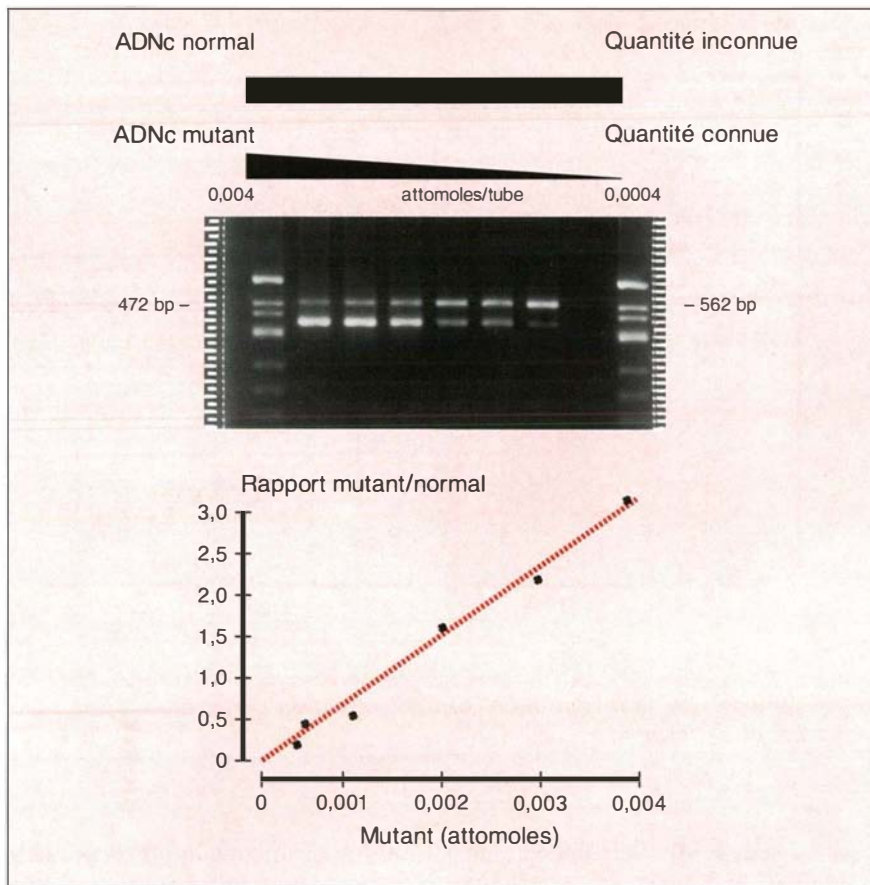


Figure 4. **Mesure de la chaîne $\alpha 2$ du collagène IV dans 1/10 de glomérule de souris par PCR compétitive.** La partie supérieure de la figure contient un schéma de la réaction. Au centre se trouve le gel obtenu par PCR (36 cycles) coloré par le bromure d'éthidium. Chaque tube de PCR contient une quantité identique de l'ADNc à mesurer représentant 1/10^e de glomérule et une quantité décroissante d'ADNc mutant qui ne diffère du premier que par une délétion et partage donc les mêmes amorces. La courbe est obtenue par densitométrie au laser et la concentration de l'ADNc inconnue est calculée au point d'équivalence ($y = 1$).

tions antérieures. Son principe repose sur l'introduction – dans les tubes contenant l'ADN complémentaire (ADNc) – à mesurer des quantités connues et croissantes d'un ADNc mutant qui utilise les mêmes amorces pour l'amplification par PCR (figure 3). La sensibilité de la méthode permet de mesurer des quantités de l'ordre du 1/1 000 attomole (1 attomole = 10^{-18} mol), dans une quantité d'ARN équivalente à un dixième de glomérule murin.

Chez les souris GH, nous avons observé une quantité d'ARNm codant pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène IV 10 à 20 fois supérieure aux valeurs normales [29]. Il est intéressant

de comparer ce chiffre à celui mentionné plus haut : l'augmentation obtenue, en comparant des extraits de rein de souris témoins avec les souris GH, est de 1,5 à 2. Ces observations permettent de penser que la régulation moléculaire de la fibrose est totalement différente entre l'ensemble du rein et le glomérule.

L'expression accrue des gènes impliqués dans les lésions sclérosantes du glomérule commence dès les premières semaines de la vie des souris, et le niveau d'activation semble parallèle à l'évolution de l'aggravation. L'activation génique précède largement les signes histologiques de sclérose, ce qui lui confère une va-

leur pronostique. En outre, l'activation persiste aux mêmes niveaux en présence de lésions très avancées, ce qui semble confirmer l'hypothèse que la fibrose, phénomène cicatriciel, demeure active dans des lésions avancées, observation susceptible de conséquences thérapeutiques.

Nous avons également examiné des souris transgéniques pour une molécule de GH contenant une mutation dans l'hélice αIII , introduite par mutagenèse dirigée. Ces dernières présentent un phénotype différent, dont l'observation est instructive à plusieurs égards [30]. Ces souris (M11), de taille normale, développent une hypertrophie et une sclérose glomérulaire dont la progression est environ deux fois plus lente que celle des souris GH. L'effet de GH sur l'hypertrophie glomérulaire et sur la sclérose est donc indépendant de celui exercé sur le volume corporel. Ces souris représentent un modèle dans lequel les lésions sont lentement progressives puisque les glomérules ne sont totalement détruits que vers le quinzième mois, le double du temps requis pour que les souris GH atteignent le stade d'insuffisance rénale terminale. La mesure des ARNm codant pour les différents gènes de la matrice extracellulaire montre une augmentation deux fois moins importante que celle constatée chez les souris GH. Cette augmentation reste constante et semble correspondre à la pente de l'évolution de la glomérulosclérose (figure 5).

• Souris OS

Ces observations nous ont conduits à étudier de façon identique plusieurs autres souches de souris. Les souris OS sont le produit d'une mutation qui entraîne une syndactylie et une réduction importante du nombre de néphrons à la naissance [24]. Leurs glomérules sont hypertrophiés et deviennent scléreux vers l'âge de 3 mois. Ceux-ci présentent une activation des gènes codant pour la matrice extracellulaire comparable à celle des souris GH et une évolution rapide vers la glomérulosclérose terminale. Il est important de noter que les animaux non mutants (souche ROP) ont également une élévation de plusieurs gènes de la matrice extracellulaire glomérulaire par comparaison

RÉFÉRENCES

31. Doi T, Hattori M, Agodoa LYC, Sato T, Yoshida H, Striker LJ, *et al.* Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after onset of hyperglycemia. *Lab Invest* 1990 ; 63 : 204-12.
32. Pardo V, Meneses R, Ossa C, Jaffee D, Strauss J, Roth D, *et al.* AIDS-related glomerulopathy : occurrence in specific risk groups. *Kidney int* 1987 ; 31 : 1167-73.
33. *US Renal Data Report System: USRDS 1993 Annual Data Report* National Institutes of Diabetes Digestive and kidney Diseases. Bethesda, MD, National Institutes of Health, 1993.
34. Fine LG, Ong ACM, Norman JT. Mechanisms of tubulointerstitial injury in progressive renal diseases. *Eur J Clin Invest* 1993 ; 23 : 259-65.
35. Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E, Eddy AA. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 1992 ; 141 : 1381-96.
36. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991 ; 39 : 550-6.
37. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 916-27.
38. Reyes AA, Porras BH, Chasalow FI, Klahr S. L-arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 1346-54.
39. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, de Plaen JF, Ferluga D, Van Ypersele de Strihou C. Chinese herb nephropathy : clue to Balkan endemic nephropathy ? *Kidney Int* 1994 (sous presse).
40. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor β -1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 1172-8.

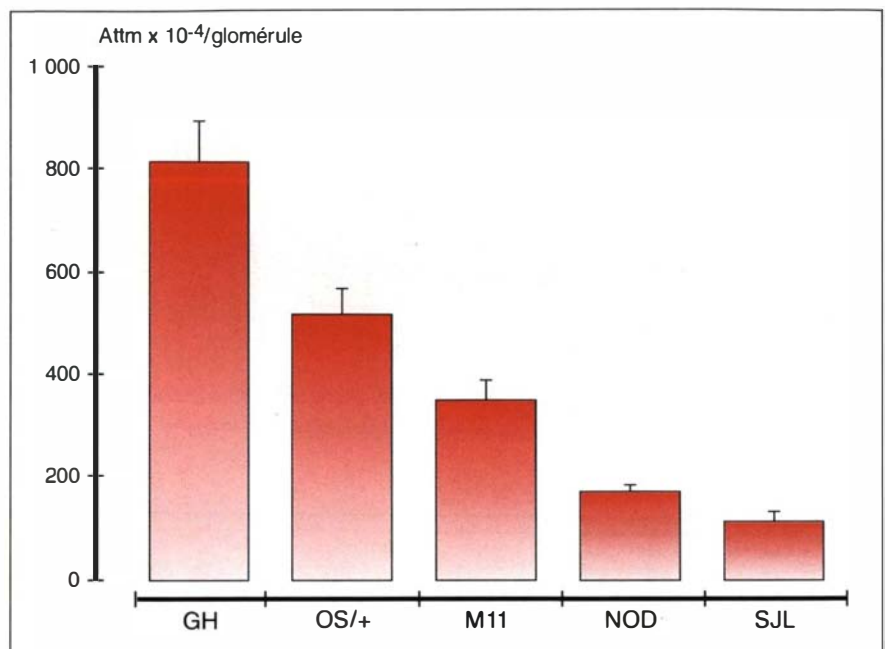


Figure 5. La mesure de l'ARNm dans les glomérules de plusieurs souches de souris suggère que le niveau de base de l'activation de la matrice extracellulaire est prédéterminé.

avec les souris SJL, qui constituent nos témoins habituels. En outre leurs glomérules contiennent un excès de matrice mésangiale (figure 5).

Nous avons retrouvé une augmentation comparable chez des souris NOD (*non obese diabetic*) avant l'apparition du désordre métabolique [31]. En conclusion, une étude comparative de plusieurs souches de souris (figure 6) montre l'existence d'un parallélisme entre l'abondance de l'ARNm codant pour la matrice extracellulaire dans les glomérules, mesuré avant l'apparition de lésions, et le développement ultérieur de la glomérulosclérose. Ces observations suggèrent l'existence, chez certains individus, d'une prédisposition génétique pour la glomérulosclérose, se traduisant par une élévation du niveau basal de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire glomérulaire.

Progression chez l'homme

On peut en conclure que l'élévation de l'ARNm codant pour le collagène permet de prédire l'évolution de la sclérose et donc de définir des populations à haut risque chez l'animal. En est-il de même chez l'homme ?

Certains arguments indirects permettent de penser que ces observations sont applicables à l'homme. Des études épidémiologiques récentes suggèrent l'existence de populations à risque : c'est ainsi, par exemple, que les sujets noirs atteints de SIDA ont une susceptibilité à développer une sclérose glomérulaire beaucoup plus marquée que celle des sujets d'origine européenne [32]. A cet égard, on peut aussi noter que la fréquence générale de l'insuffisance rénale terminale d'origine glomérulaire, toutes causes confondues, est très augmentée chez les sujets noirs [33]. Nous avons entrepris une analyse quantitative de l'ARNm présent dans des glomérules isolés à partir de biopsies afin de vérifier si les données expérimentales sont applicables aux affections humaines.

Sclérose interstitielle

La présence d'une sclérose interstitielle est le meilleur indicateur de progression des lésions rénales chez l'homme, ainsi que l'ont établi des travaux morphologiques datant des années 1960. Il a cependant fallu at-

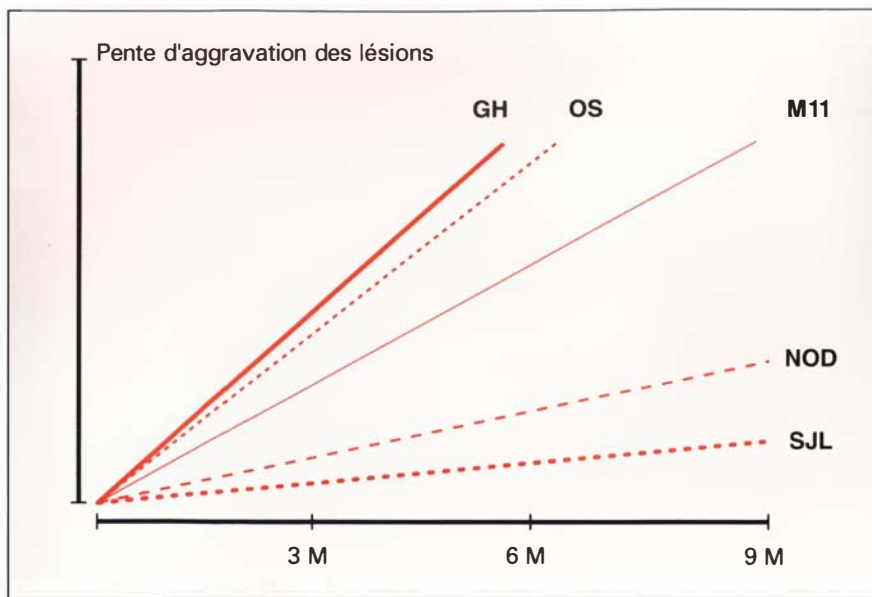


Figure 6. La pente de progression des lésions glomérulaires scléreuses est parallèle à l'activation du gène codant pour la chaîne α_2 du collagène IV dans les diverses souches de souris examinées. Cette mesure a donc une valeur prédictive. M : mois

tendre trente ans pour que ce paradoxe apparent suscite l'attention des néphrologues et que les mécanismes régissant l'atteinte interstitielle commencent à être explorés [34].

La composition de la fibrose interstitielle a été analysée dans des affections expérimentales, soit immunologiques, soit toxiques telles que celles dues à l'administration d'aminonucleoside [35]. Celle-ci contient de la fibronectine en abondance, qui constituerait une armature sur laquelle vont se déposer les molécules de collagène [36]. Le premier en date est le collagène de type III suivi par le collagène de type I. Du collagène de type IV est également observé, essentiellement au contact des membranes tubulaires.

Origine de la fibrose interstitielle

La fibrose interstitielle a été moins étudiée que celle du glomérule, pour des raisons qui paraissent essentiellement techniques. L'accumulation de collagène interstitiel dans l'interstitium provient essentiellement de fibroblastes. Le rôle des cellules endothéliales qui bordent les capillaires interstitiels est moins bien établi. De nombreux travaux permettent de penser que, à l'instar des cellules du glomérule, les cellules tubulaires sont également dotées de propriétés biosynthétiques et produisent des composants appartenant à la famille des membranes basales (collagène IV, V, laminine et protéoglycanes). Au cours de certains états pathologiques entraînant des modifications de leur phénotype, ces cellules produisent en outre des collagènes interstitiels (I et III).

L'augmentation de la matrice interstitielle peut être secondaire à la production en excès de cytokines par les tubules activés, stimulant à leur tour fibroblastes et cellules capillaires par un effet paracrine (parmi les molécules candidates figurent le PDGF, le TGF- β et l'IL1) [37]. Il est également probable que de nombreux peptides sont produits par des lymphocytes ou des macrophages activés, en particulier dans des affections à composante immunologique telles que les rejets de greffe ou les maladies auto-immunes [36]. Les macrophages interstitiels jouent également un rôle critique dans les lésions obstructives et

Tableau II	
PATHOGÉNIE DE LA SCLÉROSE INTERSTITIELLE	
Affections interstitielles primitives	
Réaction allergiques : médicaments	
Infections bactériennes	
Rejet de greffe	
Affections chroniques	
Toxiques	
Phénacétine ou antalgiques	
Herbes chinoises	
Néphrite endémique des Balkans ?	
Affections immunologiques	
Tubulopathies	
Myélome à chaînes légères	
Néphropathies obstructives	
Affections vasculaires	
Augmentation de la pression capillaire	
Ischémie chronique	
Conséquences tubulaires des lésions glomérulaires	
Hypertrophie tubulaire	
Augmentation de la consommation d'oxygène	
Augmentation des métabolites réactifs de l'oxygène	
Production exagérée de cytokines	
Présence de substances toxiques filtrées par le glomérule	

leur rôle est important dans certaines affections expérimentales, telles que celles dues à l'aminonucléoside. Plusieurs travaux récents ont montré qu'il est possible d'inhiber la progression de la fibrose interstitielle en prévenant la migration des macrophages, à l'instar de ce qui est connu dans les phénomènes de cicatrisation cutanée. La présence de macrophages dans l'interstitium constitue probablement une source de facteurs de croissance susceptibles d'activer localement les fibroblastes interstitiels. A cet égard, des travaux récents suggèrent que la L-arginine peut diminuer l'action des macrophages *in vivo*. Un régime enrichi en L-arginine pourrait ainsi protéger le tissu interstitiel en prévenant la migration et/ou l'effet des macrophages sur les cellules interstitielles [38].

D'autres mécanismes ont également été proposés. Par exemple, dans de multiples formes d'atteinte rénale chronique, on constate une hypertrophie des néphrons qui s'accompagne d'une consommation accrue d'oxygène associée à une augmentation de l'ammoniogenèse locale et à la présence de métabolites réactifs de l'oxygène. Ces anomalies peuvent entraîner une hyperproduction de matrice extracellulaire et une réponse tubulaire caractérisée par l'hyperplasie et l'hypertrophie [36]. De même, l'hyperglycémie reproduit *in vitro* des phénomènes comparables, probablement par l'intermédiaire du TGF β . Enfin, des travaux expérimentaux suggèrent que les interactions fonctionnelles entre les diverses cellules du compartiment tubulo-interstitiel, notamment les cellules tubulaires et les fibroblastes, jouent un rôle critique dans la genèse des lésions.

Classification des lésions interstitielles

• Lésions d'origine glomérulaire

Pratiquement toutes les glomérulopathies progressives s'accompagnent d'anomalies tubulo-interstitielles (*Tableau II*). La fibrose interstitielle joue donc un rôle majeur dans l'aggravation progressive des lésions.

• Lésions d'origine vasculaire

Au cours des affections vasculaires chroniques, l'ischémie tubulaire entraîne rapidement un épaississement des membranes basales tubulaires et

une atrophie avec dilatation épithéliale qui coexistent avec une fibrose interstitielle.

• Lésions obstructives

• Lésions toxiques

• Lésions des affections métaboliques (diabète)

• Lésions interstitielles primitives

Un petit nombre d'affections s'accompagnent d'une fibrose interstitielle dite primitive, notamment la néphrite interstitielle dite des Balkans et la néphrite interstitielle récemment découverte, due aux herbes chinoises [39]. Dans les deux cas, le tissu interstitiel est progressivement envahi par une fibrose pauvre en cellules qui s'accompagne d'atrophie tubulaire et glomérulaire. L'hypothèse avancée dans ces deux affections est une réponse à un agent toxique, l'acide aristolochique, un carcinogène d'origine végétale, sans que la séquence exacte des lésions soit connue.

Conclusions et perspectives

Sclérose glomérulaire et interstitielle paraissent dues à des mécanismes distincts. Dans les affections glomérulaires progressives, de nombreux arguments, notamment morphologiques, donnent à penser que la principale cellule coupable est mésangiale. Certains auteurs en ont tiré argument pour comparer sclérose glomérulaire et maladies vasculaires chroniques telles que l'athérosclérose, puisqu'il s'agit dans les deux cas de cellules musculaires lisses qui prolifèrent et produisent un excès de matrice extracellulaire. Le rôle de certains facteurs de croissance, notamment PDGF et TGF β dans ces événements pathologiques, suggère que des interventions thérapeutiques interrompant la production ou la réponse à ces facteurs pourraient avoir leur place dans ce type d'affection. L'utilisation d'anticorps ou d'antisens contre les isoformes de TGF β en constitue un exemple [40]. Il est cependant bon de noter que toutes ces manipulations ont un effet préventif chez l'animal, mais que leur effet thérapeutique sur des lésions déjà existantes est loin d'être établi.

En outre, parmi les facteurs métaboliques favorisant à la fois la survenue de lésions d'artériosclérose et de glo-

méruosclérose, on retiendra la présence d'AGE et l'hyperlipémie. Dans les deux cas, le contrôle du désordre métabolique par des agents pharmacologiques est susceptible de retarder et/ou de prévenir la progression des lésions. On manque encore actuellement d'essais thérapeutiques permettant d'évaluer leur efficacité chez l'homme.

En conclusion, il est probable que la progression des affections glomérulaires est d'origine multifactorielle. Des facteurs héréditaires encore mal connus jouent probablement un rôle important dans la progression de la fibrose glomérulaire.

En ce qui concerne la fibrose interstitielle, sa composition et son apparence suggèrent une origine essentiellement fibroblastique. A l'instar de celles du glomérule, ces cellules sont activées par TGF β 1. La migration et le profil de biosynthèse des fibroblastes interstitiels peuvent être modifiés par de nombreux facteurs. La nature des interactions entre cellules tubulaires, lymphocytes, macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes est encore mal connue à l'heure actuelle. Les importants progrès dans la compréhension des mécanismes régissant la sclérose devraient permettre la mise en œuvre de traitements nouveaux à visée étiologique ■

Remerciements

Nous tenons à remercier monsieur le Professeur Gabriel Richet qui nous a confié certains articles historiques sur la fibrose, et le Docteur Chi-Wei Yang pour sa participation aux travaux sur les souris transgéniques.

TIRÉS À PART

L.J. Striker.

Summary

Renal fibrosis

Progressive glomerulosclerosis or interstitial fibrosis may occur in most chronic renal disorders and result in decreasing kidney function, eventually in endstage renal failure. The pathogenesis of progressive renal disease is still largely unknown but there is considerable evidence that there is heterogeneity in the glomerular response to a sclerotic stimulus in the general population. For instance, in diabetes mellitus, despite similar levels of glycemia, only a fraction develops renal disease. The same is true for patients with AIDS nephropathy, where the propensity to the development of progressive glomerulosclerosis seems restricted to certain ethnic groups without regard to the severity of the underlying disease. The causes of this wide variation in response has led to the speculation that there may be an underlying genetic basis which determines the glomerular sclerotic response to particular stimuli. The normal glomerular extracellular matrix (ECM) contains multiple components, synthesized by the resident glomerular cells. The role of the mesangial cells, the smooth muscle component of the glomerulus, is critical in the development of glomerulosclerosis. Glomerular cells respond to various stimuli such as cytokines, or to metabolic derangements by an exaggerated synthesis of ECM, a phenomenon well established *in vitro*, and to a certain degree, *in vivo*. These data led us to evaluate the levels of ECM mRNAs in isolated microdissected glomeruli, in normal mice as well as in several models of glomerulosclerosis. We studied ma-

trix synthesis at the level of gene expression and ECM composition in the intact glomerulus using a competitive PCR assay. To determine whether the rate of ECM synthesis and the composition of sclerosis were similar among diseases, we examined a normal mouse strain and compared them with transgenic mice or with strains which spontaneously developed glomerulosclerosis. Mice transgenic for growth hormone provide a good model of progressive glomerulosclerosis leading to terminal renal failure. In these mice, the levels of ECM matrix mRNAs were elevated at all time points studied. The elevation occurred prior to the histologic appearance of glomerulosclerosis, and high mRNA levels persisted until the animals died in renal failure. We also examined these levels in a model of mouse which has a reduction in the number of glomeruli at birth (OS) and severe glomerulosclerosis, as well as in mice with more slowly progressive renal disease. The baseline levels of basement membrane collagen mRNAs varied between different mouse strains, and correlated with their propensity to develop glomerulosclerosis. In addition, the baseline ECM mRNA level predicted the subsequent outcome.

Less is known about the factors that lead to interstitial fibrosis although it represents a critical determinant of renal fibrosis in human diseases. Three candidate cells can contribute to the excess of ECM in the interstitial compartment: fibroblasts, endothelial cells lining the interstitial capillaries and tubular cells.