

RECHERCHE ET GREFFES 2005

THEME 1 : Sciences humaines et sociales, prélèvement et greffe

DONDERO Fédérica – hôpital Beaujon

« *Transplantation hépatique à donneur vivant : le vécu des donneurs* »

Résumé :

L'augmentation croissante du nombre d'inscrits en liste d'attente de greffe de foie associée aux progrès techniques réalisés dans le domaine de la chirurgie hépatique ont conduit au développement de nouvelles pratiques telles que celles du don vivant. C'est à la fin des années 1980 que cette technique s'est développée en Asie, pour s'exporter ensuite à travers le monde. Concernant d'abord les receveurs pédiatriques, elle s'applique depuis 1994 aux receveurs adultes. Les avantages d'une telle pratique (particulièrement chez le receveur) et ses inconvénients (particulièrement chez le donneur) ont été assez bien décrits, principalement dans les périodes post-opératoires à court et moyen terme. Concernant les donneurs, nous disposons de peu d'informations à long terme. Le service de chirurgie hépato-pancréato-biliaire de l'hôpital Beaujon réalise la technique du don vivant depuis 10 ans. Aujourd'hui, elle s'interroge sur l'impact d'une telle pratique chez les donneurs et tout particulièrement à long terme. Elle souhaite mieux connaître leur vécu et comprendre ce qui se passe après le don. Ce projet de recherche s'inscrit dans cette démarche. L'hypothèse de cette étude est qu'une connaissance plus documentée du vécu des donneurs contribue à une meilleure prise en charge et information des candidats au don. L'objectif principal de ce travail est donc d'améliorer notre approche du don vivant. Les objectifs principaux sont : a) de recueillir un certain nombre de données auprès des donneurs ; b) de les analyser afin de mieux comprendre quelles sont les conséquences d'une telle pratique chez les donneurs. La méthode choisie pour collecter les données est un questionnaire anonyme, adressé à tous les donneurs opérés dans ce service, dont l'intervention sera ultérieure à une année. Le profil du donneur, le processus de don, l'application générale du don, l'intervention, les complications, la récupération, la vie après le don, le devenir du receveur et le vécu du donneur sont les thèmes abordés par ce questionnaire. Les résultats escomptés de cette étude sont l'enrichissement de nos connaissances concernant « le devenir des donneurs » et par conséquent la modification de notre approche des candidats au don. Ce travail apportera quelques réponses au débat concernant la transplantation hépatique à partir de donneur vivant – pratique encore très discutée.

JOULE Robert-Vincent - Université de Provence

« *La communication engageante au service du don d'organes : apport de la psychologie sociale expérimentale* »

Résumé :

Il s'agit d'un projet mené en commun par le laboratoire de Psychologie sociale du Professeur Joule (Université de Provence), le département d'anesthésie/réanimation du Pr. Martin (hôpital Nord, CHU Marseille) et la coordination hospitalière des prélèvements : Dr. Geissler (CHHU Marseille).

But : Ce travail a pour but de diminuer le taux de refus des dons par une meilleure communication entre les proches des personnes décédées et les demandeurs. 2 types de demandes de don auprès des proches seront prises en compte, celles relatives aux prélèvements multi-organes (PMO) et celles relatives aux prélèvements de cornée, les premières s'effectuant dans le cadre d'un entretien « face à face », les seconds dans le cadre d'un entretien téléphonique.

Option théorique : Nous nous situons dans le paradigme de la « communication engageante ». Le recours à ce paradigme de recherche, issu de la psychologie sociale expérimentale, a permis d'augmenter la probabilité qu'une personne accepte de signer une carte de donneur d'organes, mais aussi réaliser d'autres comportements socialement utiles allant du port du préservatif, aux comportements d'entraide et jusqu'aux comportements écocitoyens. Le recours au paradigme de la communication engageante devrait donc nous aider à concevoir des démarches de communication plus efficaces et donc susceptibles de déboucher sur une réduction du taux de refus d'un prélèvement d'organe sur un être proche.

Méthode : Pour les deux types de demande (prélèvement d'organes et prélèvement de cornée), le projet comprend 3 phases :

1/ L'état des lieux : par une mise en commun des pratiques des différents demandeurs, il conviendra de dégager une *démarche de communication* correspondant à une pratique d'entretien « type ».

2/ Le processus d'amélioration des entretiens : il s'agira de concevoir des modifications de la démarche de communication mise en lumière lors de la phase précédente.

3/ L'évaluation : l'évaluation du processus d'amélioration sur les taux de refus des dons s'effectuera systématiquement par la comparaison de deux conditions : une correspondant à la pratique de base (pratique « type »), l'autre correspondant à des modifications de cette pratique (« communication engageante »). Lorsque la pratique de base aura été optimisée, la comparaison pourra se faire en année pleine par rapport à une série historique.

Perspectives : Si cette recherche nous permet d'atteindre nos objectifs, nous devrions être en mesure d'identifier quelques principes d'optimisation des entretiens « face à face », d'une part, et des entretiens téléphoniques, d'autre part, principes transférables dans d'autres centres et susceptibles d'être utilisés avec une efficacité comparable.

RODRIGUEZ-ARIAS David - Université René Descartes Paris V

« Investigation sur le concept de mort employé par les professionnels en France, USA et Espagne. Enquête internationale sur la connaissance et les attitudes des professionnels susceptibles de décider et de réaliser des prélèvements d'organes à propos du concept de mort »

Résumé :

Face au taux élevé de refus de don et face à la demande croissante de greffons, ce projet vise, tout d'abord, à examiner dans trois pays – France, USA et Espagne – les connaissances sur les critères cliniques de mort cérébrale et les attitudes envers le don des professionnels impliqués dans la prise en charge des potentiels donneurs. Il s'agit d'identifier chez les professionnels d'éventuels manques de clarté conceptuelle sur la notion de mort cérébrale et de dessiner consécutivement des stratégies de formation aux professionnels sur la façon la plus claire d'informer les proches lorsque le don est envisagé. Deuxièmement, nous voulons examiner l'attitude des professionnels vis-à-vis du prélèvement des sujets à cœur arrêté. Pour atteindre ces buts, nous nous servirons de l'outil méthodologique que l'un de nos co-investigateurs, Pr. Stuart Yougner, a utilisé aux USA en 1989. Afin d'adapter son instrument de mesure (questionnaire) par entretien direct avec les professionnels au contexte international actuel, nous avons réalisé plusieurs modifications, incluant notamment une série de questions sur le prélèvement des sujets à cœur arrêté. L'étendue internationale de cette recherche a pour but d'examiner les similitudes et les différences des attitudes et des pratiques des professionnels dans les trois pays sélectionnés. Cette approche internationale permettra de savoir si la formation des professionnels et leurs attitudes sont ou non des facteurs associés aux différences significatives sur le nombre et les modalités de prélèvements réalisées dans chaque pays. Nous voulons aller au-delà des débats théoriques sur le concept de mort pour prendre assise dans les pratiques professionnelles. Notre équipe est composée de professionnels et chercheurs en science cliniques (anesthésie, réanimation, psychiatrie), en éthique, en droit et en philosophie. Une approche mixte quantitative-qualitative sera utilisée. Nos résultats permettront de dessiner des stratégies de formation des professionnels dans le domaine du prélèvement et de la transplantation d'organes. Notre objectif est de promouvoir chez les professionnels, une communication de qualité avec les proches pouvant réduire le taux de refus de don. Les données recueillies par cette étude donneront lieu à trois travaux universitaires de recherche (deux thèses doctorales en Sciences Médicales et Bioéthique et un mémoire de Master en Ethique Médicale) ainsi qu'à la publication de plusieurs articles dans des revues scientifiques internationales.

THEME 2 : Amélioration des prélèvements

ADRIE Christophe - Association, Recherche, Enseignement, Réanimation

« Mort encéphalique : syndrome inflammatoire, apoptose et tolérance endotoxinique »

Résumé :

Préserver les capacités fonctionnelles des organes à prélever reste une priorité pour le succès des greffes d'organes et pour améliorer la survie à long terme des greffons. La mort encéphalique, indépendamment de la cause, semble s'accompagner d'une intense réaction inflammatoire qui, en association avec une activation du programme de mort cellulaire, pourrait jouer un rôle délétère sur la fonction de ces organes. Nous souhaitons étudier cette phase en identifiant trois causes susceptibles d'être à l'origine d'un état de mort encéphalique : l'hémorragie cérébrale, l'arrêt cardiaque et le traumatisme crânien. Nous envisageons d'inclure 60 patients en état de mort encéphalique sur deux centres qu'il y ait eu ou non prélèvements d'organes : des prélèvements plasmatiques et tissulaires (muscle et peau) seront effectués. Ces données seront comparées à celles obtenues d'un groupe témoin constitué de patients devant subir une intervention chirurgicale (n=10) pour la mise en place d'une prothèse de hanche pour des pathologies dégénératives non inflammatoires (prélèvements sanguins et tissulaires). Nous doserons les cytokines plasmatiques par des techniques ELISA, l'endotoxine grâce à un lysat de l'Amébocyte Limulus, et la réactivité leucocytaire ex vivo sur sang

total par l'utilisation de différents agents stimulants certains sous-groupes de leucocytes (LPS, Staphylococcus aureus (SAC), Concanavaleine A, et la phytohemmagglutinine). Nous étudierons également l'activation de gènes sur les biopsies musculaires par la technique des « Gene Micro Array » des voies impliquées dans l'inflammation (iNOS, Cox-2, IL6-IL8-IL10) et l'induction de l'apoptose (bad, bax, bcl-2, caspases, fas, fasL, DR5 ou Trail). Nous déterminerons si la réponse inflammatoire induite est différente selon la cause de la mort encéphalique et les conséquences de cette réaction inflammatoire sur le succès de la greffe. Nous vérifierons également que l'activation de ces gènes se traduit bien par une augmentation de la production protéique par immuno-marquage sur des coupes tissulaires ou pas Western Blot sur des extraits protéiques totaux obtenues à partir de ces tissus. Nous étudierons les conséquences de la mort encéphalique en termes de réaction inflammatoire et leurs conséquences éventuelles sur la qualité fonctionnelle des organes greffés en utilisant les critères classiques (décès, rejet, durée après greffe rénale nécessitant encore des séances de dialyse). Nous souhaitons dégager un nouveau concept et concevoir la mort encéphalique non plus comme la simple perte de toutes fonctions cérébrales mais intégrer toutes les conséquences de celles-ci sur l'homéostasie et la réaction inflammatoire concernant dès lors l'ensemble de l'organisme et tous les organes à prélever. La mise en jeu de tels mécanismes suggérerait que la mort encéphalique se traduit par un état inflammatoire similaire à celui observé dans le sepsis sévère. Ce concept devrait nous conduire à tester, dans ce contexte ; des traitements qui se sont avérés efficaces ou en cours d'évaluation dans le sepsis sévère pour améliorer la qualité des organes à prélever.

THEME 3 : Evaluation et amélioration de la sécurité et de la qualité des greffons, en particulier pour ce qui concerne les modalités de conservation

BARROU Benoît - Association Centre de Recherche Immunologie Cellulaire et Tissulaire de la Pitié Salpêtrière

« Définition des conditions optimales d'emploi d'une nouvelle solution de conservation immunomasquante dans l'isolement et la greffe d'îlots pancréatiques »

Résumé :

La greffe d'îlots de Langherans est encore d'un emploi limité en clinique humaine en raison de difficultés d'isolement à l'origine de greffons souvent insuffisants fonctionnellement et de l'absence de marqueur de rejet.

Notre équipe travaille sur une nouvelle solution de conservation qui présente 2 intérêts majeurs : meilleure préservation cellulaire et effet d'immunomasquage. Cette solution intitulée « Solution « Maco Biotech transplant » (MBT) a clairement démontré sa supériorité sur un modèle de greffe d'îlots chez la souris. Le taux de Non Fonction Primaire (NFP) en isogreffe est de 33% lorsqu'on utilise le produit de référence HBSS et de 0% lorsqu'on utilise MBT ($p < 0.01$). Par ailleurs, la survie d'une allogreffe augmente de $7,3 \pm 3$, 6 jours (en HBSS) à $17,3 \pm 4,3$ jours avec la solution MBT ($p < 0.01$). Cette prolongation est due à un phénomène d'immunomasquage, comme nous l'avons montré en cytofluorométrie et immunofluorescence, ainsi qu'in vivo sur un modèle de rejet cellulaire suraigu. Le principal composant responsable de ces effets est le Polyéthylène glycol (PEG). L'immunomasquage obtenu est transitoire (10 jours). La demande de financement est destinée à poursuivre l'étude de cette nouvelle solution de préservation pour définir les meilleures conditions d'un essai clinique prochain. Les questions posées dans l'étude sont les suivantes :

1^o La longueur de la chaîne de PEG est-elle déterminante pour l'effet d'immunoprotection observé lors de la première partie de l'étude ? Des îlots seront préparés et greffés avec des solutions contenant des PEG de différentes longueurs de chaînes, 8kDa, 20kDa et 35kDa. Les critères de jugement seront, in vivo : la durée de survie de l'allogreffe et in vitro : des tests de reconnaissance antigénique et d'immunofluorescence.

2^o Quel est le nombre minimal d'îlots nécessaires pour corriger le diabète, lorsqu'ils sont préparés avec la solution MBT ? Des greffes de 400, 300, et 200 îlots seront réalisées avec comme critères de jugement le taux de Non Fonction Primaire (NFP) et de reprise retardée de fonction.

3^o La durée d'immunomasquage peut-elle être prolongée par l'emploi de PEG réactifs ? Plusieurs PEG réactifs sont disponibles, le BTC-mPEG nous paraît comme celui à tester en premier du fait de ses capacités immunomasquantes sur un modèle de globules rouges et son coût relativement faible. Des îlots seront préparés et greffés avec du BTC-mPEG. Les critères de jugement seront, in vivo : la durée de survie de l'allogreffe et in vitro : des tests ELISPOT, MLIC et d'immunofluorescence.

4^o La préservation du greffon avec du PEG a-t-elle non seulement des effets à court terme mais aussi à long terme ? Le but de cette partie sera donc de tenter de démontrer qu'un effet immunoprotecteur transitoire au moment de la greffe peut entraîner une modification de la qualité du greffon à 3 mois en

histologie et immunohistochimie. Sur un modèle d'allogreffe à faible disparité antigénique entre donneur et receveur (rejet très tardif du greffon), des coupes immuno/histologiques seront réalisées à 3 et 6 mois après transplantation afin d'évaluer les stigmates de dysfonction chronique du greffon.

Ce projet vise à mettre au point une solution de conservation permettant d'améliorer la fonctionnalité cellulaire, de réduire le nombre d'îlots à greffer pour atteindre l'insulino-indépendance, de limiter la destruction précoce des îlots par des phénomènes inflammatoires non spécifiques et enfin de prolonger la durée de survie du greffon par un phénomène d'immunomasquage.

CRENESSE Dominique & HUET Pierre-Michel – Université Nice Sophia Antipolis

« Prévention des lésions d'ischémie-reperfusion des foies stéatosiques par le maintien de l'ATP hépatique »

Résumé :

Le projet de recherche proposé a pour but d'améliorer la réponse des foies stéatosiques à l'ischémie-reperfusion (I-R) au cours de la transplantation hépatique. Ces foies étant susceptibles à l'IR, leur utilisation comme greffon reste limitée. Notre hypothèse est que le maintien de l'ATP mitochondrial, par l'utilisation de tacrolimus, un immunosuppresseur couramment employé en transplantation, empêche la nécrose des hépatocytes. Nos précédentes études ont montré : 1) que le tacrolimus protège significativement les hépatocytes normaux de la nécrose et de l'apoptose induites par I/R, 2) qu'il modifie le type de mort cellulaire après I/R chez le rat obèse, en augmentant la concentration d'ATP intracellulaire et privilégiant la voie apoptotique, mieux supportée. Sur un modèle de foie isolé perfusé *ex vivo*, mis au point par l'équipe, nous évaluerons l'effet d'une simple dose de tacrolimus au cours de l'ischémie froide suivie de la reperfusion chaude du foie stéatosique de rat Zucker obèse. Le choix de cet animal repose sur la similitude de son obésité avec celle de l'homme et le protocole retenu stimule les conditions de la transplantation hépatique. Ce travail cherchera à montrer que le tacrolimus, soit injecté 24 h avant le prélèvement, soit ajouté à la solution de préservation du greffon, maintient le taux d'ATP durant 24 h d'ischémie froide et 2 h de reperfusion, réduisant ainsi significativement la nécrose. Il comportera, outre l'histologie et la biochimie classiques, des mesures en immunohistochimie et en fluorescence afin de différencier et de quantifier les territoires nécrotiques et apoptotiques. Cette étude pourrait être facilement transposée à l'homme, en chirurgie hépatique du sujet obèse et pour l'utilisation de greffons stéatosiques car le traitement par le tacrolimus, actuellement bien maîtrisé, y est limité.

MORELON Emmanuel & BADET Lionel - Université Claude Bernard Lyon 1

« Ischémie reperfusion et rejet d'allogreffe. Effet d'un nouveau liquide de conservation contenant du PEG dans l'activation lymphocytaire allo-immune »

Résumé :

Les lésions d'ischémie reperfusion après transplantation d'organe sont responsables de dysfonctionnements précoces et tardifs qui réduisent la durée de vie des greffons. Ces phénomènes prennent d'autant plus d'importance qu'il existe actuellement une pénurie d'organe poussant à la transplantation d'organes de plus en plus marginaux. Par ailleurs, on sait depuis quelques années que les mécanismes inflammatoires non spécifiques après ischémie reperfusion entraînent une activation du système immunitaire associée au développement de rejets aigus et de rejets chroniques qui contribuent à la perte du greffon. Les liquides de conservation d'organe contenant du Polyéthylène glycol (PEG) pourraient améliorer considérablement les résultats de la transplantation d'organe. En effet, non seulement le PEG est un colloïde utile pour diminuer l'œdème tissulaire induit par l'ischémie reperfusion de l'organe greffé, mais il a aussi un effet d'immunomasquage par encombrement stérique et son utilisation semble associée à une diminution de l'incidence du rejet aigu dans différents types de transplantation. Le projet que nous proposons ici est l'étude des relations entre ischémie reperfusion et réponse allo-immune, et plus spécifiquement l'étude du rôle et des mécanismes immunomodulateurs d'un milieu de conservation d'organe, l'IGL1, développé à l'hôpital Edouard Herriot, et contenant du PEG 35Kd. L'effet d'immunomasquage sera étudié chez l'homme, *in vitro*, et chez l'animal dans un modèle de rat, *in vivo*. Nous étudierons la réponse allo-immune de lymphocytes humains stimulés par différentes cellules allogéniques, des monocytes-macrophages, des cellules endothéliales sous la forme d'HUVECs, des cellules dendritiques sous la forme de cellules de Langerhans. Ces expériences de stimulation se feront en présence ou non d'IGL1. La réponse lymphocytaire sera étudiée par l'étude de la prolifération des lymphocytes et leur production de cytokine. L'effet d'immunomasquage, spécifique ou non, sera étudié par cytométrie en flux en déterminant la modification de l'expression des molécules impliquées dans l'activation et la coactivation lymphocytaire et de différentes molécules impliquées dans l'activation et la coactivation lymphocytaire, et de différentes molécules d'adhésion. Nous étudierons aussi les effets

immunomodulateurs de l'IGL1 sur les différentes étapes de la réponse lymphocytaire de l'activation du récepteur T avec l'étude de sa modulation négative et la prolifération cellulaire après activation par un anticorps anti-CD3. Enfin, nous observerons l'effet de l'IGL1 et du PEG sur la maturation et la différenciation des cellules dendritiques. Dans un modèle d'ischémie reperfusion rénale chez le rat, nous vérifierons si l'immunomasquage par le PEG contenu dans l'IGL1 existe dans des conditions proches de celles de la transplantation d'organe, et quelles sont les cellules rénales impliquées dans ces phénomènes. Ces expériences permettront de mieux mettre en évidence les relations entre ischémie reperfusion et réponse allo-immune. Elles permettront surtout de déterminer si l'utilisation d'un milieu de conservation original, produit aux HCL, et contenant du PEG, peut réduire, par immunomodulation lié à un immunomasquage, la réaction allo-immune. Ces résultats seront évidemment déterminants avant l'utilisation de ce produit chez l'homme, en transplantation d'organe.

THEME 4 : Immunologie des greffes

BIREBENT Brigitte - Etablissement Français du Sang Bretagne

« Lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD152+ et contrôle de la GVH aigüe chez l'Homme : analyse prospective chez le patient au cours de la reconstitution hématopoïétique après greffe de cellules souches et caractérisation de LTR induits in vitro à partir de lymphocytes T CD4+CD25 »

Résumé :

Une des complications majeures de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Il a été montré dans des modèles murins que des lymphocytes T régulateurs (LTR) interviennent dans le contrôle de la GVH. Le premier objectif de l'étude que nous proposons est de démontrer que la population de LTR définis par la coexpression des molécules CD4, CD 25 et CTLA-4 est impliquée dans la protection du patient contre le développement de la GVH. Pour cela, nous allons conduire une analyse prospective du compartiment des LTR dans le greffon et au cours de la reconstitution hématopoïétique pendant les cent premiers jours suivant l'allogreffe chez 90 patients (financement partiel, PHRC régional 2003). L'utilisation de LTR du donneur comme outil thérapeutique pourrait être envisagée à l'avenir pour traiter la GVH. Cependant, ces cellules ne représentent qu'une fraction très minoritaire des lymphocytes T CD4+ du sang périphérique. Le deuxième objectif de notre projet est donc de déterminer quelle serait la meilleure stratégie d'obtention et d'expansion de LTR utilisables pour traiter une GVH chez un patient allogreffé. Nous nous proposons donc de mettre au point, en utilisant le modèle de la réaction lymphocytaire mixte (MLR), une méthode d'induction *in vitro* de LTR spécifiques d'alloantigènes à partir de lymphocytes T CD4+CD25- qui présente l'avantage d'être une population majoritaire pouvant être facilement purifiée parmi les lymphocytes T CD4+. Nous pensons que la réinjection chez le patient de LTR obtenus à partir de lymphocytes T CD4+ du donneur et sensibilisés *in vitro* aux antigènes du receveur, permettrait de fournir au malade un traitement permettant de cibler directement les lymphocytes T allospécifiques responsables du développement de la GVH.

BLANCHO Gilles - Association ITERT

« Etude d'un modèle de rejet vasculaire aigu chez le babouin »

Résumé :

La transplantation d'organes vascularisés a connu un essor considérable depuis les années 80, essentiellement grâce à l'avènement de nouvelles molécules immunosuppressives. Ainsi l'incidence des rejets aigus à médiation cellulaire a-t-elle considérablement diminué au point d'être inférieure à 10% pour l'ensemble des groupes aujourd'hui ? Ces progrès remarquables n'ont cependant pas concerné les rejets vasculaires aigus (RVA) à médiation humorale dont l'incidence demeure constante et surtout dont l'occurrence grève particulièrement le pronostic à long terme de la greffe et dont la réversibilité est inconstante (30 à 50 % seulement selon les séries). Nous nous proposons de développer un modèle de rejet vasculaire humoral chez des babouins alloimmunisés dans le but d'une part d'explorer de façon plus fondamentale la physiopathologie de ces rejets et d'autre part de tester de nouvelles stratégies préventives de l'immunisation ou curatives. De part nos travaux antérieurs en particulier en matière de xénotransplantation dans des modèles de porc sur babouin, nous avons déjà une longue expérience de l'exploration et la prévention du RVA dans une situation particulièrement défavorable : la pré-immunisation à la greffe. De façon surprenante, la physiopathologie du rejet xénogénique est bien mieux connue que celle de son homologue allogénique et met en jeu des mécanismes centrés sur la réponse humorale avec toutes ces conséquences sur le complément, l'activation endothéliale et plaquettaire, des inductions d'apoptose et de mécanismes de coagulation. Dans le but de montrer la faisabilité d'un tel modèle expérimental préclinique, nous avons recueilli des résultats préliminaires chez le porc en générant une alloimmunisation préalable à la greffe puis de

véritables rejets vasculaires rapides et à médiation humorale du greffon rénal de l'animal « immuniseur ». Il nous faut désormais adapter ce modèle au babouin car les outils immunologiques manquent encore chez le porc alors que la plupart des réactifs humains présentent une activité croisée avec le babouin, et vis-à-vis des immunosuppressions que nous envisageons, nous souhaitons nous mettre dans une situation préclinique plus proche de l'homme avec le recours au primate. Nous allons donc procéder de façon identique en pré immunisant des babouins vis-à-vis de leur futur donneur de rein, étudier la cinétique d'apparition des alloanticorps (alloAc), leurs caractéristiques (titre, isotype, activation du complément), puis les rejets observés (réponses humorales et cellulaires contre le donneur, activation et/ou apoptose endothéliale, diverses expressions transcriptionnelles dans les greffons). Dans un deuxième temps, nous tenterons des préventions d'immunisation et des rejets par la Mitoxantrone dont nous avons montré la capacité à retarder une immunisation xénogénique de part son caractère dépletant du lymphocyte B. Nous associerons ensuite dans le but de prévenir la coopération T-B, la molécule générée dans notre laboratoire par Bernard Vanhove : le ScCD28-AT capable de bloquer la costimulation passant par l'interaction B7-CD28 tout en respectant la voie inhibitrice B7-CTLA4. Toujours dans une démarche innovante que nous offre un tel modèle, nous testerons dans un futur à moyen terme les anti-TNF.

Nicolas Poirier, Frédéric Maillet, Marie-Line Barussaud, Karine Renaudin, Joanna Ashton-Chess, David Minault, Jeremy Hervouet, Jean-Paul Soullillou, Gilles Blancho

Acute Humoral Rejection of Renal Transplants in Alloimmunized Pigs
Journal of Surgical Research 139, 261–268 (2007)

N. Poirier and G. Blancho

Recombinant Human C1-Inhibitor Inhibits Cytotoxicity Induced by Allo- and Xenoantibodies
Transplantation Proceedings, 40, 581–583 (2008)

MOHTY Mohamad - Institut Paoli Calmettes

« Analyse génomique du transcriptome des compartiments lymphoïdes issus de greffon de moelle osseuse et de cellules souches périphériques hématopoïétiques »

Résumé :

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-SCH) est une thérapeutique reconnue pour les hémopathies malignes. Le pouvoir curatif de l'allo-SCH repose essentiellement sur le contrôle de la maladie par certains effecteurs issus du greffon (effet GVT). Initialement, la moelle osseuse (MO) représentait la source principale de greffon. Plus récemment, les cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSP) recueillies après mobilisation par G-CSF sont apparues comme une modalité attractive pour l'allo-SCH. Ainsi, l'utilisation des CS au lieu de la MO est associée à un bénéfice net en termes de récupération hématopoïétique, avec toutefois une différence significative en termes de réaction chronique de greffon contre l'hôte (GVH). Ceci soulève la question de l'impact de la source du greffon sur le développement des phénomènes d'allo-réactivité observés post-allo-SCH. Plusieurs observations suggèrent que les différences des phénomènes cliniques observés in vivo sont en rapport avec les différences en contenu des greffons (MO ou CSP) en termes d'effecteurs lymphocytaires. En effet, le G-CSF joue un rôle majeur dans la modulation des capacités fonctionnelles des sous-populations lymphocytaires. Des différences fonctionnelles significatives telles que les profils et la polarisation des réponses Th induites, ont été rapportées. Ainsi, en raison (i) du rôle prédominant de l'effet GVT dans le pouvoir curatif de l'allo-SCH, et donc sur le devenir des patients, (ii) de la grande variabilité clinico-biologique en rapport avec la source du greffon, (iii) et du rôle clef des effecteurs lymphocytaires dans le contrôle des réactions immunes, nous proposons une étude comparative génomique du transcriptome des compartiments lymphocytaires issus de la MO et des CSP. Notre objectif consiste à décrire les différences biologiques pouvant expliquer la variabilité clinique observée post allo-SCH. Les effecteurs lymphocytaires participant à la régulation des réponses immunes, leur rôle en immunologie anti-tumorale apparaît critique. La caractérisation de certaines de leurs caractéristiques génomiques pourrait rendre compte de certains aspects de leur physiologie, notamment des mécanismes impliqués dans l'allo-réactivité observés post-allo-SCH, mais aussi dans l'inhibition des réponses immunitaires anti-tumorales.

CHARREAU Béatrice - Association ITERT

« *Rôle des molécules du CMH de classe I non classique exprimées par l'endothélium dans le rejet de greffes* »

Résumé :

L'endothélium du greffon constitue une interface cellulaire entre l'organe transplanté et le receveur. Les cellules endothéliales (CE) participent, par l'expression à leur surface des molécules du CMH de classe I et de classe II du donneur, à la réponse immune allogénique. La mise en évidence récente de l'expression par l'endothélium d'autres molécules du CMH, dites de classe I non classiques, dont MICA, HLA-E et EPCR suggère de nouvelles fonctions pour les CE du greffon dans les réponses immunes innée et acquise. Ce projet vise à caractériser les fonctions des molécules du MHC de classe I non classique MICA et HLA-E exprimées par l'endothélium du greffon et régulées au cours de l'inflammation. L'invalidation de ces molécules au moyen de siRNA permettra de définir in vitro leurs rôles respectifs vis-à-vis de l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules T CD8+ et d'évaluer le rôle de HLA-E dans l'activation lymphocytaire allospécifique. MICA, HLA-E et EPCR peuvent être produites sous forme soluble par les cellules endothéliales activées. S'il est établi que les formes solubles de MICA et EPCR ont un effet antagoniste des molécules membranaires, les fonctions de HLA-E soluble sont inconnues. Nous chercherons à déterminer l'activité biologique de HLA-E soluble. La recherche des formes solubles de ces trois molécules sera faite dans le sérum de patients transplantés rénaux afin d'évaluer l'incidence de ces protéines solubles au cours du rejet vasculaire, aigu et chronique.

THEME 5 : Pharmacologie et greffe

MARQUET Pierre – CHU Limoges

« *STIMMUGREP : Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs chez les patients greffés pulmonaires (souffrant ou non de mucoviscidose)* »

Résumé :

Objectifs : Mettre au point chez les patients greffés pulmonaires, atteints de mucoviscidose (CF) ou non (non-CF), des méthodes pharmacocinétiques d'adaptation posologique individualisée du traitement immunosuppresseur global (ciclosporine ou tacrolimus, et/ou mycophénolate, sirolimus et évérolimus) pour optimiser l'efficacité et réduire les effets indésirables potentiellement graves de ces médicaments. **Inclusion** de 120 patients greffés pulmonaires (dont 60 CF) traités par au moins un des médicaments de l'étude et suivis pendant au moins deux des quatre périodes post-greffe suivantes : 1 semaine, 1 mois, 3 mois, 1 an et plus. **Méthodologie :** 10 à 12 prélèvements sanguins sur un intervalle de 8 à 24 h, plus un pour l'analyse pharmacogénétique. Modélisation pharmacocinétique et mise au point d'estimateurs Bayésiens permettant le calcul de l'AUC et des paramètres pharmacocinétiques. **Résultats attendus :** Extension aux greffés pulmonaires du site internet ABIS (Adaptation Bayésienne des ImmunoSuppresseurs) sur <http://www.chu-limoges.fr>, pour permettre l'ajustement de posologie simultané de l'ensemble du traitement immunosuppresseur aux différentes périodes post-greffe à l'aide de 3 prélèvements sanguins. Des caractéristiques pharmacogénétiques seront prises en compte comme covariables dans ces modèles. **Perspectives :** utilisation des estimateurs bayésiens (et du site internet) dans le cadre d'essais multicentriques de comparaison de stratégies thérapeutiques. Validation de l'optimisation globale par comparaison de cette nouvelle approche avec la démarche actuelle (adaptation posologique non coordonnée des immunosuppresseurs, sur la base d'indicateurs imprécis).

THEME 6 : Recherche clinique, santé publique, épidémiologie, insuffisances terminales d'organes, besoins et offres de soins

FOUILLARD Eric - Etablissement Français du Sang Centre Atlantique

« *Traitement de la GVH post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques par immunomodulation induite par l'injection de cellules souches mésenchymateuse* »

Résumé :

Le risque de décès lié à la réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVH) après l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est de l'ordre de 25 à 30 % malgré la prophylaxie systématique et le traitement curatif par les immunosuppresseurs majeurs. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent des propriétés immunomodulatrices ; elles favorisent la prise de greffe des CSH, inhibent la prolifération des lymphocytes T allogéniques et favorisent la tolérance hôte/greffon. Ces propriétés persistent alors que les CSM proviennent d'une tierce partie. Les CSM ne sont pas

immunogènes et n'induisent pas de prolifération de cellules mononucléées allogéniques ; le respect de l'identité HLA entre donneur de CSM et receveur n'est pas nécessaire. Il a été rapporté que les CSM sont capables de guérir une GVH aigue grave résistante aux immunosuppresseurs majeurs. Dans cette étude pilote nous proposons de traiter des patients adultes présentant une GVH aigue de grade supérieur ou égal à 2 corticorésistance survenant après allogreffe de CSH génoidentiques ou non apparentées, par des CSM allogéniques administrées à une dose de 5×10^6 /kg. La corticorésistance est définie par l'absence d'efficacité des corticoïdes à une dose de 2mg/kg/jour administrés pendant 5 à 7 jours, ou une aggravation de la GVH après 48 heures de corticoïdes. L'administration d'un autre immunosuppresseur n'est pas prévue d'emblée pour permettre une meilleure évaluation de l'efficacité des CSM sur la GVH. Cependant, celui-ci peut être administré à l'appréciation du clinicien s'il existe des signes de gravité.

Il est prévu d'inclure 30 patients. Pour chaque patient un greffon de CSM allogéniques sera préparé et congelé. 15 à 20 ml de moelle osseuse seront prélevées chez le donneur de CSM deux semaines avant la date présumée de la greffe. L'origine des CSM est soit identique au donneur de CSH pour les allogreffes génoidentiques, soit d'origine intrafamilial non HLA identique pour les allogreffes non apparentées. En théorie 10 à 15 patients développeront une GVH aigue corticorésistance et recevront des CSM allogéniques. Les CSM congelées non utilisées pourront servir pour traiter une GVH chronique ultérieure. Cet essai pilote précédera un essai comparatif randomisé de phase III en double aveugle évaluant les CSM pour le traitement préventif de la GVH aigue.

SANQUER Sylvia - Hôpital Européen Georges Pompidou

« *Evaluation de l'activité calcineurine en tant que marqueur d'efficacité de la prophylaxie du rejet aigue en transplantation cardiaque* »

Résumé :

Le rejet aigue du greffon complique près de 30 à 50 % des transplantations cardiaques et reste, malgré l'instauration d'une prévention à base de tacrolimus ou de ciclosporine, une source de mortalité très importante après greffe. L'adaptation des posologies de ces immunosuppresseurs majeurs se fait actuellement en fonction de leur concentration sanguine. Ces concentrations sont plus corrélées à la toxicité qu'à l'efficacité des médicaments, et ne permettent pas de prédire leur rôle biologique apprécié par l'inhibition de l'activité calcineurine. Nous venons de montrer au cours d'une étude pilote portant sur 31 patients suivis pendant les 2 mois suivant une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) que l'activité de la calcineurine est basse chez les patients ne développant pas de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) aigue alors qu'elle est élevée chez les patients qui développent une GVH, cette élévation précédant la GVH chez plus de la moitié des patients. Ces résultats suggèrent que la surveillance de l'activité calcineurine devrait permettre de définir, à l'échelon individuel, la posologie d'immunosuppresseur anticalcineurine la mieux adaptée pour prévenir la survenue de GVH aigue. Cette étude en greffe de CSH nous conduit maintenant à évaluer l'activité calcineurine en tant que marqueur d'efficacité de la prophylaxie du rejet aigue dans des transplantations d'organes, comme la transplantation cardiaque, où le rejet aigue reste un problème majeur.

But de l'étude : Evaluer l'intérêt de l'activité calcineurine en tant que marqueur d'efficacité de la prophylaxie du rejet aigue en transplantation cardiaque. **Objectif principal :** rechercher une relation entre l'activité calcineurine et la survenue du rejet aigue et sa gravité, dans les 6 premiers mois de la greffe.

Objectifs secondaires : 1/ Etablir, pour la période 0 à 6 mois, la valeur seuil de l'activité calcineurine au-delà de laquelle il y a un risque de survenue de rejet aigue. 2/ Etablir une banque de protéines et d'ARN. 3/ Comparer le phosphoprotéome lymphocytaire établi pendant les 6 premiers mois suivant la greffe chez un groupe de patients sélectionnés – 10 patients n'ayant pas développé de rejet aigue et 10 patients ayant développé un rejet aigue. 4/ Rechercher une relation entre l'activité calcineurine et la survenue d'un rejet aigue et sa gravité entre 6 et 24 mois après la greffe.

Patients et méthodes : Il s'agit d'une étude multicentrique ouverte, sans bénéfice individuel direct, chez 100 patients devant bénéficier d'une transplantation cardiaque et recevant une prophylaxie du rejet aigue à base de tacrolimus et de ciclosporine. Les prélèvements sanguins seront effectués avant greffe puis 3 fois/semaine jusqu'à J30, puis 1 fois/semaine jusqu'au 3^{ème} mois et 1 fois/quinzaine jusqu'au 24^{ème} après la greffe pour détermination de l'activité calcineurine et établissement d'une banque de protéines et d'ARN. L'étude du phosphoprotéome lymphocytaire sera effectuée sur 20 patients sélectionnés (10 faisant un rejet et 10 n'en faisant pas) et l'étude de l'expression d'un ensemble de gènes sera réalisée ultérieurement. **Perspectives de l'étude :** Si cette étude montre que l'activité calcineurine est un bon marqueur d'efficacité de la prophylaxie du rejet aigue en

transplantation cardiaque, il conviendra d'envisager l'adaptation de la posologie des immunosuppresseurs en fonction de ce paramètre.

VIE Henri - CHU Nantes

« *Production d'une banque de CTL anti-EBV* »

Résumé :

Il s'agit d'un projet en deux parties : « Production d'une banque de CTL anti-EBV » puis « utilisation de lymphocytes T allogéniques sélectionnés contre le virus d'Epstein Barr (EBV) dans le but de contrôler les conséquences de sa réactivation. L'objet de la présente demande est une participation de l'EFG à la réalisation de la banque à Nantes. Les arguments en faveur de cette approche peuvent se résumer de la façon suivante :

Chez l'individu sain l'infection par l'EBV est contrôlée par un ensemble de lymphocytes T dirigés contre des peptides dérivés de protéines du virus et qui sont présentés dans des molécules HLA de classe I ou de classe II. Cet ensemble de lymphocytes T constitue un répertoire T anti-EBV. Au cours des réactivations virales qui peuvent survenir après l'épisode de primo infection, le répertoire T correspondant est mobilisé et la prolifération du virus et/ou des cellules infectées est contrôlée. Il s'établit ainsi une sorte d'équilibre où les cellules hôtes du virus ne disparaissent jamais totalement mais où la production de virus et/ou la prolifération des cellules infectées restent toujours sous contrôle du système immunitaire. Chez la majorité des patients immunodéprimés, le système continue de fonctionner de façon suffisante pour assurer le contrôle de l'EBV. Chez un certain nombre de ces patients, un déséquilibre, qui peut être momentané, conduit à une production virale et/ou une amplification des cellules infectées mal contrôlée, qui peut conduire à un syndrome lymphoprolifératif. Il est possible de sélectionner « in vitro » un répertoire T anti-EBV. Ces cellules sont appelées communément des CTL anti-EBV. L'efficacité de l'injection de CTL anti-EBV du donneur, dans le cas des greffes de moelle, a été démontrée (diminution de la charge virale, diminution de la survenue des lymphomes, régression de lymphomes établis). Préparer des CTL anti-EBV pour tous les patients qui pourraient en bénéficier n'est pas envisageable, pour de simples raisons de logistique et de coût, la fréquence de survenue des complications étant. Les résultats préliminaires d'une équipe anglaise suggèrent que les CTL anti-EBV allogéniques (c'est-à-dire ne provenant ni du donneur dans le cas des greffes de moelle, ni du receveur dans le cas des greffes d'organes solides) peuvent être injectés sans risque (de réaction du greffon contre l'hôte ou de rejet) chez des patients qui présentent une complication liée à l'EBV résistante aux traitements classiques. Un effet biologique est observé puisque à la suite de ces injections la charge virale diminue. Cependant, l'efficacité de cette approche sur le contrôle de la lymphoprolifération n'est pas démontrée. Les cellules injectées sont restées indétectables in vivo. Les objectifs de cette étude sont donc de tester la faisabilité de la production d'une banque de CTL anti-EBV et l'absence de toxicité de l'injection de ces CTL chez des receveurs allogéniques matchés pour au moins un HLA-A et un HLA-B (en cas de greffe de moelle la compatibilité concerne bien sûr les CTL et les cellules du lymphome). Cette première étape est indispensable avant d'aborder les suivantes qui viseront à explorer les conditions optimales de survie in vivo et d'efficacité anti-lymphome des cellules injectées.

LAUNAY Odile - Groupe hospitalier Cochin -Saint Vincent de Paul - La Roche Guyon

« *Evaluation de l'immunogénicité de la vaccination contre les virus des hépatites A et B chez les patients en attente ou ayant bénéficié d'une transplantation hépatique* »

Résumé :

La vaccination contre les virus des hépatites A et B est recommandée chez les patients en attente ou ayant bénéficié d'une transplantation hépatique. Cependant, si les données concernant la tolérance de ces vaccinations sont admises, les données concernant l'immunogénicité de ces vaccinations dans ces 2 populations sont peu nombreuses et déjà anciennes. Nous proposons une étude monocentrique prospective ouverte dont l'objectif principal est d'évaluer l'immunogénicité de la vaccination contre le VHA et le VHB chez les patients en attente et ceux ayant bénéficié d'une transplantation hépatique. Les objectifs secondaires sont : 1) d'évaluer la durabilité de la séroprotection 12 et 24 mois après la vaccination anti-VHA et/ou anti-VHB, 2) de rechercher les facteurs déterminant la réponse vaccinale anti-VHA et/ou anti-VHB en fonction de la gravité de l'atteinte hépatique et parmi les paramètres thérapeutiques, 3) d'évaluer la prévalence des marqueurs sérologiques contre le VHA et la VHB chez les patients en attente et ceux ayant bénéficié d'une transplantation hépatique. 250 patients (pts) seront inclus dans cette étude : 100 pts en attente de transplantation, 150 pts ayant bénéficié d'une transplantation hépatique depuis plus de 6 mois.

Le critère d'évaluation principal sera le pourcentage de sujets présentant des anticorps à titre protecteur contre le VHB (Ac anti-HBs \geq 10mUI/ml) et le VHA (IgG anti-VHA \geq 20mUI/ml) 1 mois

après la fin de la vaccination. Les résultats de cette étude permettront : 1) de disposer de données sur l'immunogénicité à 1, 12 et 24 mois des vaccinations anti-VHA et anti-VHB chez les patients en attente ou ayant bénéficié d'une transplantation hépatique, 2) de préciser les facteurs cliniques, biologiques et thérapeutiques prédictifs de la réponse vaccinale chez ces patients, 3) d'évaluer la prévalence des marqueurs sérologiques contre le VHA et le VHB dans ces 2 populations.

STENGEL Bénédicte - Inserm ADR Paris XI Hôpital Paul Brousse

« *Etude des déterminants de l'insuffisance rénale chronique terminale et accès à la greffe dans la cohorte GN-PROGRES* »

Résumé :

Contexte : L'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) a un coût humain et social important qui nécessite de développer la recherche sur les moyens de prévention et l'accès à la greffe. Les néphropathies glomérulaires constituent un bon modèle pour ce type d'étude car elles sont une des causes principales d'IRCT, qu'elles présentent une grande variabilité d'évolution et peu ou pas de contre-indication à la greffe.

Objectifs : I) actualiser l'estimation de l'incidence de l'IRCT dans les néphropathies glomérulaires primitives et analyser ses déterminants ; les hypothèses portent en particulier sur le rôle des facteurs socio-démographiques ou liés au mode de vie une fois pris en compte ceux liés à la néphropathie (histologie, protéinurie et HTA)

II) Quantifier la diffusion des recommandations de bonne pratique clinique en référence aux recommandations européennes et internationales dans la cohorte de patients et décrire l'accès à la greffe (inscription sur la liste d'attente, transplantation)

Méthode : GN-PROGRESS est une large cohorte de 564 patients incluant les trois types histologiques les plus fréquents de néphropathie glomérulaire primitive : néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, hyalinose segmentaire et focale et glomérulonéphrite extra-membraneuse, biopsiés entre 1994 et 2000 dans 11 services de néphrologie de la région parisienne. Les informations sur les facteurs socio-démographiques ou liés au mode de vie (tabac, obésité, activité physique) et sur les facteurs environnementaux ont été recueillies par interrogatoire des sujets. Les facteurs liés à la néphropathie (histologie, protéinurie) et facteurs intermédiaires (HTA, lipides, anémie) et les modalités de prise en charge ont été recueillis à partir des dossiers médicaux. Une banque d'ADN a été constituée. Le critère étudié est la survenue d'une IRCT définie par un débit de filtration glomérulaire < 15ml/mn/1.73 m², l'initiation de la dialyse ou la greffe préemptive. La cohorte a été constituée entre 2002 et 2004 : un questionnaire médical a été rempli avec les données de base à la biopsie rénale pour les 564 patients ; 356 d'entre eux ont été interrogés et ont eu une prise de sang. Il est prévu un suivi jusqu'en 2006. L'accord CNIL a été obtenu pour interroger la base CRISTAL de l'EFG pour obtenir les informations sur la greffe.

O. Moranne, L. Watier, J. Rossert, B. Stengel, and the GN-PROGRESS Study Group

Primary glomerulonephritis: an update on renal survival and determinants of progression
QJ Med 2008; 101:215-224

MALLET Vincent - Association de Prévention et d'Etudes des Maladies Moléculaires

« *Erythropoïétine et préconditionnement hépatique. Etude pilote chez le rongeur* »

Résumé :

L'ischémie-reperfusion (IR) est la principale complication de la chirurgie hépatique moderne. Les hépatectomies avec clampage pédiculaire et la reperfusion du greffon au décours d'une période plus ou moins prolongée d'ischémie froide sont à l'origine de lésions d'IR pouvant compromettre la récupération de la fonction hépatique, augmentant la morbidité et la mortalité post-opératoire. L'essor de la chirurgie hépatique moderne, favorisé par les résultats spectaculaires obtenus en transplantation et en cancérologie, nécessite de nouvelles techniques de protection du parenchyme hépatique pour imiter l'IR et l'incidence de la défaillance hépatique post-opératoire. Le préconditionnement est une adaptation cellulaire au stress, notamment ischémique, en prévision des agressions à venir. Le préconditionnement correspond à l'induction de voies de signalisation impliquées dans la résistance des tissus à l'hypoxie. Il peut être induit par une courte période d'ischémie et on parle alors de préconditionnement ischémique. Il peut également être induit par l'érythropoïétine (EPO). Cette notion récente repose sur plusieurs travaux démontrant l'effet protecteur de l'EPO vis-à-vis de l'IR cérébrale, endothéliale, cardiaque et rénale. Tout porte à croire que l'effet systémique de l'EPO est un phénomène général d'adaptation à l'ischémie. Plusieurs essais cliniques sur l'IR cérébrale et cardiaque sont en cours. Pour l'instant, l'effet protecteur de l'EPO vis-à-vis de l'IR hépatique n'est pas connu ; ce travail vise à évaluer le bénéfice d'un préconditionnement par EPO vis-à-vis d'une IR

hépatique létale chez le rongeur. Cette première étude est un pré-requis indispensable avant de tester le bénéfice potentiel du preconditionnement par l'EPO en transplantation et en chirurgie hépatique.