

RECHERCHE et GREFFE (1995)

THÈME 1 : ASPECTS SOCIO-CULTURELS DU PRÉLÈVEMENT ET DE LA GREFFE

1 - Marie-Madeleine LAFARGUE - EHESS- Paris

« Recherches et propositions de l'anthropologie pour remédier à certains malentendus socio-culturels à propos des greffes »

Résumé :

La valeur déclarative des Associations de Donneurs d'Organes et de Tissus rend compte de la valeur positive des intentions socio-culturelles du public dans le registre du don. Ces valeurs acquises de longue date par le don du sang, du lait, puis par France-Transplant, sont transmises à l'Etablissement français des Greffes. Ce cheminement historique tient compte du passage du "don naturel" à une culture du don. Le discours (médical) contemporain semble être à la recherche d'un public déjà mûr et constitué. En tant que tel, et pour schématiser un tant soit peu, le propos du demandeur, l'Etablissement français des Greffes serait déficitaire par rapport à son public. L'objet de la relation communicationnelle engagée a changé : c'est un objet socio-culturellement habillé qui est habité par un produit biologique d'origine humaine. Les accommodations restent à faire en complément de deux événements remarquables : la création de l'Etablissement français des Greffes et le corpus juridique complet (y inclus le fichier national des oppositions), qui le greffe au social.

2 - Claire BOILEAU - Université de Bordeaux II

« Du deuil au don : aspects anthropologiques de la transplantation d'organes et/ou de tissus en France - Etude par observation ethnographique »

Résumé :

Les transplantations d'organes et/ou de tissus réquisitionnent un faisceau de représentations socio-culturelles liées notamment à la *mort*, au *corps* et au *don*. La méthode ethnographique a été appliquée à l'ensemble de la procédure thérapeutique, soit le recueil, le transfert et la réimplantation d'éléments du corps humain. Les refus de prélèvement et les modalités d'acceptation ont été analysées en mettant en perspective, d'une part, l'approche générale de la thérapeutique, et d'autre part, les conduites et /ou discours qui l'accompagnent tout au long de son déroulement. L'analyse anthropologique issue de ces observations a mis en évidence la prégnance et la récurrence de ces représentations ainsi que leur incidence sur la perception "populaire" mais aussi biomédicale de l'activité.

« *Ethnographie d'un prélèvement d'organes* » in *Sciences Sociales et Santé*, vol.15, n^o1, mars 1997, pp 21-34

3 - Pierre COCHAT - Université de Lyon I

« Etude de la qualité de vie des enfants transplantés rénaux et de leur parents »

Résumé :

A multicentric study was performed in France and Spain: 490 children were evaluated with a previously validated questionnaire including open-ended questions and structured response format questions. Children are either in good health or suffering from somatic diseases, psychological problems or social difficulties; 38% of the children are Spanish, 62% are French; the questionnaire validation was checked again, and confirmed. Children are happy about their leisure, and unhappy when separated from their families. Among the factors affecting the answers to the structured format questions the most important are the social difficulties and to a lesser extent the psychological problems. Somatic diseases impair the child's quality of life in Spain. Children differ according to the country where they live. Among children in good health, Spanish children report a better quality of life than French children. Open-ended answers were only studied in France. They were very different when children with social difficulties or psychological problems filled out the questionnaire and were compared to children in good health or with somatic diseases. Both children with psychological and social difficulties mention more often the relationship domain. Children with social problems never mention their activities as a source of happiness.

Magnificat S, Cochat P, Planguet F, Morin D, Debray D, Dazord A. **Quality of life of children after organ transplantation.** Arch pediatr 2000 May; 7 Suppl 2:238s-241s.

Dazord A, Magnificat S, Escoffier C, Kadour JL, Bobes J, Gonzales MP, Nicolas J. **Quality of life of children : importance of its evaluation. Comparison of children in good health with those at risk (psychological, social, somatic).** Encephale. 2000 Sep-Oct;26(5):46-55.

4 - Jean-Paul MOATTI - INSERM- Unité 379 - MARSEILLE

« *La dimension psychologique dans les greffes allogéniques de cellules souches du sang périphérique. Cas des donneurs et des receveurs* »

Résumé :

Les donneurs sains qui acceptent la greffe par cellules du sang ne connaissent pas les conséquences physiologiques liées à l'utilisation de facteurs de croissances hématopoïétiques. L'objectif principal de notre étude a été d'évaluer les conséquences psychologiques du risque pris par ces donneurs. Onze donneurs familiaux HLA identiques à des patients sélectionnés en vue d'une allogreffe pour hémopathies malignes ont participé à un entretien psychologique. Les résultats font apparaître un besoin très important de soutien psychologique avant le prélèvement, satisfait en partie par la procédure juridique française. Par la suite, le prélèvement n'est pas considéré comme douloureux. Après le don, les donneurs attendent un suivi médical. Et après le prélèvement, les donneurs souhaitent que l'équipe médicale leur assure un suivi médical et psychologique.

Munzenberger, N., Fortanier, C., Macquart-Moulin, G., Novakovitch, G., Maraninchi, D., Moatti, J.P., Blaise D. (1997). **Psychosocial aspects of hematopoietic stem cell donation for allogeneic transplantation: how family donors cope with this experience.** *Psycho-Oncology*

5 - Frédérique TOPALL-RABANES - Hôpital Saint Louis PARIS

« *Etude sur le don de moelle allogénique chez l'adulte* »

Résumé :

Alors que dans le monde, plus de 20.000 donneurs de moelle ont été prélevés, il existe peu d'études psychologiques sur cette question. Cette recherche s'inscrit dans le cadre d'une étude épidémiologique réalisée par l'équipe du service de Greffe de Moelle de l'Hôpital Saint-Louis dont l'objectif est d'étudier les problèmes médicaux et le vécu psychologique des donneurs de la fratrie prélevés de 1973 à 1994. L'échantillon de l'étude psychologique comprend les 210 donneurs adultes de la fratrie ayant répondu à un auto-questionnaire envoyé par courrier. Une analyse transversale du discours des donneurs effectuée sur un premier échantillon de 32 questionnaires a recherché quelques variables définies empiriquement : le style de discours et les représentations du lien avec le receveur, de la greffe, du don, de la moelle, ... Une analyse statistique a ensuite été effectuée sur l'échantillon des 210 questionnaires en croisant l'étude psychologique avec les réponses aux questions fermées dépouillées par l'étude médicale. L'analyse du discours a permis de retrouver 5 positions subjectives de donneurs de moelle : « le donneur silencieux », « le donneur solidaire », « le donneur en position parentale », « le donneur réticent » et « le donneur en miroir ». Elle permet de mettre en évidence comment selon la position du donneur, les représentations de la moelle, du corps et de l'institution varient considérablement. L'analyse statistique a permis de mettre en perspective la majorité des variables étudiées par l'équipe médicale. Cette étude met en relief les difficultés des donneurs réticents et leur poids non négligeable. Elle propose une méthode qui permet de croiser plusieurs niveaux d'analyse : le discours du sujet, les problèmes somatiques et les réponses quantifiables qui mesurent des attitudes.

F. Topall-Rabanes, Y. Moulet, G. Socié, A. Devergie, C. Guivarch, V. Meresse, M. Henry-Amar, E. Gluckman. « **Cinq positions subjectives chez les donneurs de moelle adultes de la fratrie** ». « *La greffe humaine* », R. Carvais et M. Sasportes.

6 - Renée WAISSMAN - CNRS - Centre de Recherche Médecine et Sciences Sociales - PARIS

« *Les représentations et les conceptions du don d'organes chez les profanes. Analyse comparative entre 2 groupes : les familles effectivement sollicitées, des personnes qui n'ont jamais été confrontées à la demande du don* »

Résumé :

L'étude s'appuie sur des entretiens semi-structurés menés, de janvier 1994 à juillet 1996, auprès de deux groupes de personnes interrogées selon deux critères : l'inscription dans une *situation événementielle* lors de la mort *inattendue* d'un parent proche, que nous définissons comme une *situation limite*; l'inscription dans une *situation hypothétique* met en évidence les *opinions* des personnes interrogées sur le don post-mortem. Deux modes de rationalité émergent de l'analyse des entretiens explicitant les positions des soignants vis-à-vis du don d'organes et les motivations des familles de consentir ou non à ce don. Les soignants manifestent une action rationnelle par rapport aux buts tandis que les familles manifestent une action rationnelle par rapport aux valeurs, qui les incitent à une décision de don au travers de leurs représentations sociales et de leurs conceptions du don post-mortem. L'hypothèse de départ était que la logique qui sous-tend le comportement des familles s'inscrit dans la situation événementielle de la mort inattendue d'un proche et s'oppose à celle des soignants. Selon ces familles, le corps mort fait encore partie de la sphère privée, alors que pour les soignants, celui-ci est entré dans la sphère publique. Le passage du privé au public constitue une agression pour les familles dont le chagrin comme le corps et la personne du défunt s'inscrivent dans leur intimité.

« **Donneur, Non-Donneur : les affres d'une décision** ». « *La greffe humaine* », R. Carvais et M. Sasportes.

THÈME 2 : OPTIMISATION DE LA SÉCURISATION ET DE LA QUALITÉ DES GREFFONS

1 - Josy Reiffers - Université de Bordeaux II

« *Expansion in vitro des progéniteurs hématopoïétiques du sang* »

Résumé :

Le programme de travail (regroupant 5 laboratoires participants, p.Chabord, I. Douay, J. Hatzfeld, S.Hermouet, J.Reiffers) visait à mettre au point un protocole standardisé d'expansion des cellules hématopoïétiques. Les cellules testées ont été des cellules CD34+ isolées à partir de cellules de sang de cordon ombilical (exception faite du groupe S. Hermouet qui a utilisé des cellules du sang périphérique de malades (myélome et lymphome)) par une technique immunomagnétique (Variomacs, Tebu, Le Perray-en-Yvelines). La pureté de la préparation a été estimée par cytométrie de flux après marquage par l'anticorps monoclonal HPCA2 (Becton Dickinson, Pont de Claix). Les cellules ont été congelées puis décongelées, 35000 cellules ont été amplifiées dans 7 ml de milieu de culture StemBio AG pendant une période de 10 jours. Avant et après amplification, ont été analysés (i) le nombre et la viabilité des cellules (ii) le contenu en cellules clonogéniques par culture en milieu semi-solide (StemBio 1d et StemBio HPP-Q). Dans notre étude, quatre expériences indépendantes ont été effectuées. La pureté moyenne des CD34+ isolées a été de 82 %. Nous avons obtenu une expansion moyenne des cellules nucléées de $43,75 \pm 2,81$ (SEM) fois. L'expansion moyenne des cellules clonogéniques dans le test StemBio 1d a été de $5,27 \pm 0,69$ fois. Dans le test StemBio HPP-Q, nous avons observé une perte moyenne des cellules clonogéniques de $15,50 \pm 4,63$ fois. Les résultats combinés des 5 laboratoires donnent les valeurs suivantes :

Pureté moyenne des CD34+ : $73,37 \pm 4,78$

Expansion moyenne des cellules nucléées : $47,93 \pm 14,49$ fois

Expansion moyenne des cellules clonogéniques (test StemBio 1 d) : $17,95 \pm 8,67$ fois

Expansion moyenne des cellules clonogéniques (test StemBio HPP-Q) : perte de $2,91 \pm 6,31$ fois.

Jian Li, Luc Sensebe, Patrick Hervé, Pierre Charbord « **Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. III. The maintenance of hematopoiesis from CD34+ cell populations** » (1997) *Experimental Hematology* 25:582-591

H Firat, M-C Giarratana, L Kobari, A Poloni, S Bouchet, M Labotin, N-C Gorin « **Comparison of CD34+ bone marrow cells purified by immunomagnetic and immunoadsorption cell separation techniques** » *Bone Marrow Transplantation*, (1998) 21, 933-938.

L Kobari, MC Giarratana, A Poloni, H Firat, M Labopin, NC Gorin and L Douay, « **Flt 3 ligand, MGDF, Epo and G-CSF enhance ex vivo expansion of hematopoietic cell compartments in the presence of SCF, IL-3 and IL-6** - *Bone Marrow Transplantation* (1998) 21, 759-767

2 - Yves LAZORTHES - Université de Toulouse III

« *Greffe intrathécale de cellules chromaffines humaines allogéniques pour le traitement des douleurs rebelles d'origine cancéreuse : caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules injectées* ».

Résumé :

Les cellules chromaffines issues de la médullosurrénale de sujets donneurs cadavériques produisent diverses substances (opioïdes, dopamine...) qui ont conduit à l'utilisation de ces cellules dans le traitement de douleurs rebelles ou du Parkinson. Dans le cadre de l'analgésie de patients cancéreux en fin de vie, la présente étude a porté sur : 1- la fonction ex vivo des lymphocytes infiltrant le liquide céphalo-rachidien: la fréquence augmentée des cellules Th1 potentiellement capables de provoquer un rejet, conduit malgré le privilège immunologique, à recommander l'immuno-isolement du greffon, d'autant que celui-ci exprime des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité; 2 - L'implication du phénomène d'adhérence dans les capacités de sécrétion du greffon : diverses molécules d'adhésion ont été observées à la membrane des cellules chromaffines et une production significativement augmentée des opioïdes semble corrélée à l'interaction cellules chromaffines / molécules de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, collagène).

Tkaczuk J., Bès J.C., Du Bouet du Portal H., Tafani M., Duplan H., Abbal M., Lazorthes Y., Ohayon E. (1997) « **Intrathecal allograft of chromaffin cells for intractable pain treatment: a model for understanding CNS tolerance mechanisms in humans** » *Transplantation proceedings* 29, pp 2356-2357.

3 - Anne BARON VAN EVERCOOREN - Université de Paris VI

« *Remyélinisation du système nerveux central (SNC) par transplantation de cellules de Schwann chez le singe* »

Résumé :

La greffe de cellules myélinisantes semble actuellement être l'un des moyens envisagés pour favoriser la remyélinisation des axones dénudés du SNC survenant lors des maladies démyélinisantes de l'adulte comme la sclérose en plaques. Les cellules de Schwann, saines dans le cas de cette maladie, semblent être le candidat idéal : elles sont facilement amplifiables in vitro, à partir de biopsies de nerfs périphériques, leur potentiel rémyélinisant a été démontré dans le SNC

et elles permettraient de procéder à des autogreffes. Dans cette optique, nous avons établi un modèle de démyélinisation chez le singe par injection d'un agent myélinotoxique, la lysolécithine, dans le nerf optique de singe. Nous avons amplifié des cellules de schwann de singe en culture et vérifié leur potentiel myélinisant après transplantation chez la souris. Nous avons ensuite transplanté ces cellules dans le nerf optique du singe démyélinisé et avons contrairement à toute attente, constaté l'échec de la remyélinisation par ces cellules. Ce résultat nous a conduit à reproduire un modèle d'autogreffe chez le rat adulte afin de déterminer s'il s'agit là d'un problème d'espèce, de type de cellules myélinisantes (cellules de Schwann ou oligodendrocyte), et/ ou de site.

Baron-Van Evercooren A., Avellana-Adalid V., Lachapelle F., Liblau R. (1997) « Schwann cell transplantation and myelin repair of the CNS ». Multiple Sclerosis 3, 157-161

Avellana-dalid V., Bachelin C., Lachapelle F., Escriou C., Ratzkin B; and Baron-Van Evercooren (1998) « In vitro and in vivo behavior of NDF expanded monkey Schwann cells » Eur. J. NEUROSCI. 10:291-300

4 - René ADAM - Université de Paris-Sud

« Stéatose et qualité du greffon hépatique »

Résumé :

Ce projet a permis la mise au point d'un modèle expérimental de stéatose nutritionnelle par l'administration d'un régime semi-synthétique chez le rat. L'étude a porté essentiellement sur des stéatoses massives intéressant plus de 60 % des hépatocytes et de nature mixte micro et macrovésiculaire. Ce modèle a servi de base à l'évaluation des lésions d'ischémie-reperfusion du foie stéatosique dans un modèle de foie isolé/perfusé. Les résultats montrent que les différences de récupération fonctionnelle entre foies stéatosiques et foies normaux ne deviennent significatives que pour des durées d'ischémie froide de 18 et 24 heures. L'augmentation des résistances vasculaires observées à la reperfusion et les lésions de péliose observées histologiquement sur les foies stéatosiques reperfusés suggèrent que les troubles de la microcirculation hépatique constituent le mécanisme prépondérant dans l'altération de la récupération fonctionnelle. Il n'a pas été retrouvé de lésion caractérisée des cellules endothéliales en microscopie électronique. Au plan thérapeutique, l'administration d'un vasodilatateur de type pentoxifyline donne des résultats préliminaires intéressants. En revanche, le blocage des cellules de Kupffer censées intervenir dans la genèse des troubles microcirculatoires ne prévient pas les altérations observées à la reperfusion des foies stéatosiques.

5 - Cyrille FERAY - Université de Paris-Sud

« Mise au point d'un test de neutralisation humorale du virus de l'hépatite C (VHC) utilisant des cellules lymphohématopoïétiques normales : intérêt en transplantation hépatique »

Résumé :

Le projet de recherche proposait de tester le pouvoir neutralisant de préparations polyclonales d'anticorps anti-VHC. Le système cellulaire servant à cette étude devait être le tissu hématopoïétique humain normal. L'origine de ces cellules devait être des cellules récupérées de filtres ayant servi à la perfusion de moelle dans le cadre de greffe de moelle. Ces filtres sont normalement jetés et étaient considérés comme des déchets. Le pouvoir neutralisant de différentes préparations d'anticorps provenant de plusieurs donneurs anti-VHC positifs devait être testé lors d'expériences d'infection à partir de sérum virémique afin de reconstituer in vitro les conditions d'une neutralisation humorale du VHC. Le but initial du projet a été compromis pour différentes raisons, dont la principale est l'impossibilité éthique d'utiliser des moelles osseuses. Cela est regrettable car notre pari initial était que le tissu hématopoïétique normal était un candidat sérieux comme système permissif pour l'infection par le VHC et donc pour l'étude de la neutralisation humorale. Néanmoins, la neutralisation polyclonale du VHC reste d'actualité et ce thème de recherche est quasiment vierge puisqu'une seule étude a décrit l'approche polyclonale de neutralisation du virus de l'hépatite C et ce, chez le primate.

6 - Françoise BERNAUDIN - CHI Créteil

« Optimisation et étude de la faisabilité d'une banque de sang de cordon placentaire dans les familles d'hémoglobinopathie en vue d'utilisation thérapeutique »

Résumé :

L'enveloppe budgétaire accordée par l'Etablissement français des Greffes a permis grâce à une collaboration entre le service de pédiatrie du CHIC (F.Bernaudin), le Service d'obstétrique du CHIC (Pr Paniel), l'ETS du Sud-Est Francilien (F.Beaujon), l'ETS de St Louis (JP. Marolleau) de progresser en vue d'une meilleure cryopréservation des sangs de cordon à visée thérapeutique dans les hémoglobinopathies : le but était de désérythrocyter, déplaquettiser pour éviter les problèmes d'incompatibilité tout en préservant au maximum les capacités hématopoïétiques du greffon et de cryopréserver un produit cellulaire que l'on pourrait par la suite expandre ou manipuler génétiquement. L'utilisation du Ficoll puis la sélection positive CD34+ (le système Miltényl s'est montré le plus efficace) ont permis l'obtention d'un produit très pur (70 à 93 % de CD34+) qu'il faudra par la suite expandre pour assurer la "prise de greffe".

7 - Philippe HERNIGOU - Hôpital Henri Mondor- CRETEIL

« Etude de l'efficacité de la stérilisation osseuse par irradiation sur le virus VIH et le virus de l'hépatite C lors des allogreffes osseuses »

Résumé :

Cette étude précise à partir de la détermination de la radiosensibilité du virus, de son pouvoir contaminant et du nombre potentiel de virus pouvant être présent dans une tête fémorale, l'influence de l'irradiation sur le risque de transmission du virus HIV par allogreffe osseuse. La radiosensibilité du virus a été déterminée par des irradiations effectuées avec un accélérateur délivrant des électrons d'énergie de 6,2 MeV. La dose de réduction décimale à - 80° a été calculée comme étant égale à 8,3 kilograys. Pour une dose de 25000 Grays, on observe une réduction du titre infectieux de 1000 fois (réduction = 3 logs). A partir de ces données a été calculée la probabilité de retrouver une tête fémorale contaminante après irradiation parmi une population de donneurs où a été effectué un dépistage sérologique. La probabilité est très faible, très vraisemblablement inférieure à 10^{-6} ... La même étude a été effectuée sur l'efficacité de l'irradiation sur le virus de l'hépatite C. Cette étude démontre l'efficacité de l'irradiation sur le virus de l'hépatite C mais ne permet pas de préciser actuellement le degré d'efficacité obtenu lors de l'irradiation du virus de l'hépatite C.

Hernigou P, Marinello G, Dormont D. « **Influence de l'irradiation sur le risque de transmission du virus HIV par allogreffe osseuse** ». Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot 1998 Oct; 84(6):493-500.

Hernigou P, Gras G, Marinello G, Dormont D. « **Inactivation of HIV by application of heat and radiation: implication in bone banking with irradiated allograft bone** ». Acta Orthop Scand. 2000 Oct; 71(5):508-12.

Hernigou P, Gras G, Marinello G, Dormont D. « **Influence of irradiation on the risk of transmission of HIV in bone grafts obtained from appropriately screened donors and followed by radiation sterilization** ». Cell and Tissue Banking 2000, 6:1-11

8 - Michel MAZMANIAN - Centre Hospitalier Marie Lannelongue - Le Plessis Robinson

SOUTIEN : 80 000 F

« Prélèvement de greffons pulmonaires sur animal à cœur non battant »

Résumé :

En 1995-1996, nous avons développé un modèle de poumon isolé de rat et un modèle de transplantation monopulmonaire chez le rat. En 1996-1997 nous avons prolongé les deux études précédentes par une étude portant sur le gros animal. Nos résultats portent sur des données biochimiques, des données de biologie cellulaire in vitro, sur des données obtenues sur des organes isolés et enfin sur l'animal entier dans des conditions chirurgicales. Ils indiquent que la ventilation par le NO de poumons prélevés sur des animaux à cœur non battant permet de maintenir la viabilité de greffons pulmonaires en vue d'une transplantation chez un animal receveur. Nos résultats apportent des arguments expérimentaux suggérant qu'il n'est pas déraisonnable d'envisager des prélèvements de poumons sur des individus en arrêt cardio-respiratoire prolongé.

Murakami S, Bacha Ea, Herve Ph, Detruit H, Chapelier A, Dartevelle Ph, Mazmanian GM. **Prevention of reperfusion injury by inhaled nitric oxide (NO) in lungs harvested from non-heart-beating donors**. Ann Thorac Surg, 1996; 62:1632-8

Murakami S, Bacha Ea, Herve Ph, Detruit H, Chapelier A, Dartevelle Ph, Mazmanian GM. **Inhaled nitric oxide and pentoxifylline in rat lung transplantation from non-heart-beating-donors**. J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113(5):821-9

Bacha E, Sellak H, Murakami GM, Detruit H, De Montpreville V, Chapelier A, Libert JM, Dartevelle Ph, Herve PhD. **Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion injury in non-heart-beating-donor lung transplantation**. Transplantation, 1997, 63:1380-6

9 - Jean-Luc DIMICOLI - INSERM- Unité 350 - ORSAY

SOUTIEN : 100 000 F

« Intérêt diagnostique et pronostique de la résonance magnétique nucléaire dans l'évaluation de la viabilité du greffon hépatique »

Résumé :

L'essentiel du travail réalisé pour cette deuxième tranche a été la mise au point expérimentale de l'étude par imagerie de RMN de la perfusion du foie de rat excisé et perfusé et de l'effet de l'ischémie froide-reperfusion sur cette perfusion. Cette étude réalisée sur un système Bruker Biospec Avance, implique l'utilisation de l'imagerie rapide GEFI et l'administration d'un bolus d'agent de contraste intravasculaire, le Dotarem® (Guerbet, France). Le résultat est qu'il est possible d'étudier par imagerie ^1H la perfusion du foie de rat excisé perfusé et de contrôler en même temps sa viabilité par spectroscopie de RMN du ^{31}P . Une étude sur quelques foies reperfusés après ischémie froide, montre l'effet négatif de la conservation sur cette perfusion. Ce travail ouvre la voie à une étude de la corrélation entre le statut énergétique de

l'organe et sa perfusion après ischémie froide, en particulier dans le cas de foies pathologiques comme les foies stéatosiques.

Dimicoli J-L, Patry J, Tiffon B, Mispelter J, Volk A. « **Combined 31 P-MRS and unique-pass dynamic bolus tracking perfusion MRI of the excised and perfused rat liver** ». *MAGMA*, 1998; 6S: 139.

Dimicoli J-L, Patry J, Volk A. « **Quantitative perfusion MRI of the isolated perfused rat liver** ». *Mag Res Mat Phys Biol Med (MAGMA)* 1999, 8S1: 173.

Dimicoli J-L, Patry J, Poupon J, Volk A. « **Quantitative measurement of blood volume on perfused rat liver** ». *Mag Res Mat Phys Biol Med (MAGMA)* 2000, 11S1: 130.

10 - **Robert GARRONE** - CNRS- Institut de Biologie et de Chimie des protéines de Lyon

SOUTIEN : 100 000 F

« *Optimisation d'une peau reconstruite in vitro pour le traitement des grands brûlés et des plaies chroniques* »

Résumé :

Nous avons pu démontrer l'importance du contact direct entre les fibroblastes et les kératinocytes dans la reconstruction et l'organisation ultrastructurale de la jonction dermo-épidermique. Ces résultats sont d'un grand intérêt en thérapeutique puisqu'ils permettent d'envisager une meilleure prise de l'épiderme du fait de la présence de la jonction dermo-épidermique. Cependant, il restait à démontrer que l'épiderme de l'ensemble dermo-épidermique pouvait survivre entre le moment de la greffe et la vascularisation du derme. Ceci a été prouvé par deux protocoles expérimentaux sur la souris nude. De plus, ces résultats ayant mis en évidence l'importance de la qualité du derme reconstruit sur la qualité de la peau reconstruite après épidermisation, nos efforts se sont donc portés sur les conditions opératoires de sa préparation. La mise au point d'un nouveau milieu de culture, de nouvelles conditions d'ensemencement des fibroblastes et plus tard des kératinocytes nous a permis un gain de temps de 10 jours par rapport à la méthode classique dont le temps de culture est de 21 jours. Bien que le temps de culture soit relativement court, nous avons obtenu après ensemencement des kératinocytes, un épiderme pluristratifié, différencié, continu sans pénétration des kératinocytes dans le derme. Ainsi, nous sommes capables aujourd'hui grâce au support de l'Etablissement français des Greffes de cultiver plus facilement, plus rapidement, de façon plus reproductible une peau reconstruite dont la greffe sur la souris a permis une cicatrisation en une seule étape de l'ensemble dermo-épidermique. Devant les bons résultats obtenus sur la souris nude, nous avons programmé, en mars 1998, la greffe de grande surface de peaux reconstruites sur le porc immunodéprimé en association avec l'université de Pise. Nous envisageons ensuite une étude clinique. En effet, aujourd'hui nous avons reçu un avis favorable du comité de sécurité microbiologique pour l'utilisation du substrat dermique en thérapeutique et un dossier est soumis au CPPRB. Nous sommes en train de constituer les mêmes dossiers pour les peaux reconstruites en vue de commencer une expérimentation clinique.

H.LI, F. BERTHOD, W. XU, O.DAMOUR, L. GERMAIN, F.A. AUGER « **Use of in vitro reconstructed skin to cover skin flap donor site** ». *Journal of Surgical Research*, 1997, 73 n2, 143-148.

H.LI, F. BERTHOD, W. XU, O.DAMOUR, L. GERMAIN, F.A. AUGER « **Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice**. 1998.

THÈME 3 : RELATION HÔTE-GREFFON

1 - **Martine BRULEY-ROSSET** - INSERM- Unité 267

« *Etude comparative du répertoire T des lymphocytes impliqués dans la réaction greffon contre hôte (GVH) et dans la réaction greffon contre leucémie (GVL) chez la souris* »

Résumé :

Pour analyser le répertoire T impliqué dans le GVH, nous avons comparé le phénotype CD4 et CD8 ainsi que l'identité de la chaîne β du récepteur des lymphocytes T infiltrant les organes cibles après greffe de moelle osseuse effectuée entre souris donneuses et receveuses compatibles pour le complexe majeur d'histocompatibilité. Les résultats montrent que la forte expansion précoce des cellules CD4 spécifiques pour les superantigènes codés par Mtv-6 et Mtv-7 est abolie chez les souris protégées de la GVH. Par contre, les cellules CD8 infiltrèrent les organes des souris, qu'elles développent ou non la maladie. La surexpression de certaines sous populations V β est fréquente et résulte de l'expansion d'un nombre limité de clones. Cependant, l'association d'un V β donné avec différents J β pour chaque souris suggère que la réponse est dirigée contre plusieurs antigènes différents. Les souris protégées de la GVH sont capables d'éliminer les cellules tumorales P815 *in vivo*, démontrant la séparation effective de la GVH et d'un effet GVL. Chez ces souris, une partie du répertoire CD8 dirigé contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgmH) du receveur est tolérée fonctionnellement. De plus, l'étude des chaînes β du récepteur T met en évidence l'implication, dans la réponse antitumorale, de lymphocytes T spécifiques d'AgmHs présents sur les cellules spléniques du receveur mais surtout d'Aggs exprimés spécifiquement par les cellules P815. L'ensemble des résultats montrent que dans ce modèle, le répertoire des

lymphocytes T CD8 responsable de la GVL *in vivo* est séparable de celui de la GVH et est constitué principalement de cellules T reconnaissant des AgmHs exprimés spécifiquement sur la cellule tumorale.

I Miconnet, V de La Selle and M. Bruley-Rosset. Relative importance of CD4+ and CD8+ T cell repertoires in the development of acute graft-versus-host disease in a murine model of bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation (1998) 21, 583-590

2 - Jean-Charles GUERY- INSERM- Unité 28- TOULOUSE

« Régulation de l'induction des lymphocytes Th1 et Th2 dans les manifestations immunopathologiques induites par des interactions allogéniques »

Résumé :

Nous avons étudié le rôle des cellules dépendantes de la β 2-microglobuline (cellules CD8+ et cellules T NK1.1+) dans l'induction de cellules Th2 alloréactives et dans la production d'IgE après induction néonatale de tolérance aux alloantigènes. L'administration chez des souris BALB/c H-2^d nouveaux nés de splénocytes de souris F1 (BALB/c X B6) H-2^{dxb} aboutit à l'émergence de cellules T CD4+ de phénotype Th2 productrice d'IL-4. Ces lymphocytes Th2 sont responsables de l'activation polyclonale des lymphocytes B du F1 aboutissant à la production d'IgE. Nous avons étudié le rôle des cellules T α β NK1.1+ dans le développement des cellules alloréactives de type Th2 dans ce modèle. Comme les cellules T NK1.1 et CD8 sont sélectionnées positivement par des molécules de classe I, les cellules de souris F1 ont été injectées chez des receveurs BALB/c nouveaux nés déficients pour le gène de la β 2- microglobuline. Nous avons ainsi pu montrer que la production d'IgE de même que l'induction de cellules Th2 alloréactives ne nécessitent pas chez le receveur la présence de cellules dépendantes de la β 2.

Foucras, G., Coureau, C., Beijlvelde, L., Druet, P., Saoudi, A., and J-C Guéry « β 2- microglobulin-dependent T cells are not necessary for alloantigen-induced T helper (Th)2 responses after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice » Journal of Immunology 1998 ; 161(4):1751-7.

3 - Jean-Baptiste Michel - INSERM- Unité 367- PARIS

« Effecteurs et cibles du rejet artériel chronique »

Résumé :

Le rejet artériel chronique donne lieu à un remodelage vasculaire sténosant par prolifération des cellules musculaires lisses intimes en allogreffe, et dilatant (anévrisme) par destruction de la matrice extracellulaire médiale en xéno greffe. Ces phénomènes sont modélisés par des greffes artérielles entre deux souches histo-incompatibles de rat en allogreffe, et par des greffes décellularisées entre espèces concordantes ou discordantes en xéno greffe. Dans les deux modèles la réponse humorale semble jouer un rôle prédominant dans l'agression immunologique de la paroi artérielle. La présensibilisation, cellulaire en allogreffe, matricielle en xéno greffe, accélère le rejet chronique artériel en induisant des anticorps préformés à la greffe artérielle. Les cultures primaires des cellules endothéliales, musculaires lisses et des fibroblastes provenant du donneur sont utilisées à caractériser la réponse humorale en FACscan et en ELISA cellulaire. Les cultures primaires des cellules vasculaires provenant du receveur sont utilisées à ensemercer la face endoluminale des greffons avant greffe et à limiter ainsi la prolifération intinale en allogreffe et à prévenir la dilatation anévrysmale en xéno greffe.

Eric Allaire, MD, Patrick Bruneval, MD, PhD, Chantal Mandet, Jean-Pierre Becquemin, MD, and Jean-Baptiste Michel MD, PhD, « The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts » Surgery 1997; 122 : 73-81

4 - Antoine TOUBERT- INSERM- Unité 396 - PARIS

« Etude du répertoire lymphocytaire T du sang de cordon ombilical. Implications en transplantation »

Résumé :

L'utilisation des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon suscite de grands espoirs en transplantation notamment chez l'enfant, en raison d'une réduction du risque de développement de réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Le projet a concerné l'étude du répertoire lymphocytaire T des cellules du sang de cordon. L'approche technique a été celle de l'analyse de la variabilité de taille de la région CDR3 après amplification du cDNA V β -C β pour les 24 familles V β et gel de séquence. L'aspect observé dans le sang de cordon a été celui d'un répertoire "naïf" polyclonal. Ceci contraste avec les expansions clonales décrites chez l'adulte sain dans les populations lymphocytaires T mémoires CD8CD45RO+. Après avoir précisé ses caractéristiques phénotypiques (taille de la région CDR3, fréquence d'utilisation des familles V β et J β , la maturation de ce répertoire T "naïf" a été évaluée *in vitro* après activation par superantigène (TSST1, SEA).

Laurent Garderet, Nicolas Dulphy, Corinne Douay, Nathalie Chalumeau, Véronique Schaeffer, Marie-Thérèse Zilder, Annick Lim, Jos Even, Nuala Mooney, Catherine Gelin, Eliane Gluckman, Dominique Charron, Antoine Toubert

«The Umbilical Cord Blood $\alpha\beta$ T-Cell Repertoire: characteristics of a Polyclonal and Naive but completely formed Repertoire » *Blood*, vol 91, N°1 (January 1) 1998 pp 340-346.

5 - **Josselyne SALAUN & Antonio BANDEIRA** -CNRS - Institut d'embryologie cellulaire & moléculaire - Nogent sur Marne

« Etude des mécanismes de tolérance dominante induite par l'épithélium thymique »

Résumé :

Nous étudions les mécanismes par lesquels s'instaure la tolérance au soi. Notre modèle expérimental est basé sur la restauration de la fonction immunitaire T de souris nude par la greffe d'épithélium thymique allogénique et sur le transfert des lymphocytes périphériques de ces souris chimères. Nos précédentes études ont montré que la tolérance induite par l'épithélium thymique est le résultat de la sélection positive de cellules T régulatrices contrôlant l'activité de cellules T effectrices. Nous nous proposons de caractériser ces différentes populations lymphocytaires. Nous avons pu ainsi montrer que les cellules CD45RB^{low} sont capables d'expansion *in vivo*. L'étude du rôle de cette population cellulaire dans la tolérance aux greffes *in vivo* se poursuit. Par ailleurs nous nous intéressons à la population lymphocytaire T présente à la périphérie pendant la période périnatale. La greffe à des souris nude Thy-1.2 de thymus fœtaux Thy-1.1, suivie à différentes périodes de temps de l'ablation des thymus greffés, nous a permis de mettre en évidence les capacités d'expansion des cellules de type fœtal. Nos résultats montrent également que cette expansion ne peut se faire qu'en absence des cellules de type adulte.

6 - **Mogens THOMSEN** - Université de TOULOUSE III

« Athérosclérose accélérée après allogreffe cardiaque »

Résumé :

Nos travaux ont mis en évidence le rôle de la glycosylation de certaines molécules de surface dans la régulation des lymphocytes NK et T. La glycosylation des molécules HLA est probablement un élément important pour l'interaction avec les récepteurs qui donnent des signaux négatifs. Des molécules de surface fortement glycosylées comme glycophorine protègent les cellules cibles contre la lyse NK. Les LDL oxydées ont un effet modulateur sur les lymphocytes T activés. Lors de l'alloréaction, des cytokines produites par des lymphocytes T ont un effet direct sur des cellules musculaires lisses. Le surnageant de culture mixte lymphocytaire contient les cytokines IL-6 et TNF α qui accélèrent la prolifération des cellules musculaires lisses. Nous avons démontré que la signalisation induite par l'IL-6 pourrait impliquer l'hydrolyse de la sphingomyéline.

Caspar-Bauguil S, Benoist H, Alcouffe J, Aïche S, Augé N, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Thomsen M. « **Oxidized LDL, T lymphocytes and Graft Atherosclerosis** » *Transplant Proc.* 1997, 29:2328-9

Caspar-Bauguil S, Saadawi M, Nègre-Salvayre A, Thomsen M, Salvayre R, Benoist H.

« **Mildly oxidized low-density lipoproteins suppress the proliferation of activated CD4+T- lymphocytes and their interleukin 2 receptor expression in vitro** ». *Biochem J.* 1998 Mar 1;330 (Pt2):659-66.

7 - **Marie-Marthe TONGIO**- Etablissement de transfusion sanguine de Strasbourg

« Incidence de la non expression des molécules HLA de classe I classiques chez les donneurs volontaires de moelle osseuse »

Résumé :

Les typages des antigènes HLA réalisés par sérologie sont en voie d'être remplacés par le typage des allèles HLA par techniques de biologie moléculaire. Ceci est déjà effectué en routine pour les allèles HLA de classe II. Le typage des allèles HLA de classe I par biologie moléculaire est plus complexe et a été mis en place plus récemment. La comparaison des résultats obtenus par sérologie et biologie moléculaire s'imposait de ce fait. Notre étude a porté sur les donneurs volontaires de moelle osseuse du fichier strasbourgeois, considérés comme homozygotes pour les allèles HLA-A ou HLA-B. Il apparaît que :

- 6,1 % des cas (4.4% pour HLA-A et 1.7 % pour HLA-B) sont discordants en raison de la déficience des allosérums utilisés par sérologie; dans ces cas, la biologie moléculaire est plus performante que la sérologie.

- 2.9% (5 cas) sont discordants puisque les allèles mis en évidence par biologie moléculaire sont non exprimés à la surface cellulaire. La transmission génétique intrafamiliale de ces allèles non exprimés a été prouvée et des lignées cellulaires de référence ont été établies. Les mutations responsables de la non-expression ont été déterminées.

Ces cas posent le problème de la (ou des) méthodologie(s) et de la stratégie du typage qu'il convient d'utiliser pour les donneurs volontaires de moelle osseuse puisque seuls les allèles exprimés à la surface cellulaire sont fonctionnels. Un protocole de travail international dans le cadre de la 13^{ème} Workshop Internationale d'histocompatibilité abordera cette question.

M. Laforêt, N. Froelich, A. Parissiadis, H. Bausinger, B. Pfeiffer, M.M Tongio - « **An intronic mutation responsible for a low level of expression of an HLA-A*24 allele.**

Tissue Antigens, 1997, 50: 340-346

M. Laforêt, N. Froelich, A. Parissiadis, B. Pfeiffer, A. Schell, B. Faller, M.L Wochl-Jaegle, JP Cazenave, M.M Tongio - « **A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A*01 allele** ». *Tissue Antigens*, 1997, 50: 347-350

M. Laforêt, N. Froelich, A. Parissiadis, M.M Tongio –« **Lack of HLA-A1 and A24 antigenic expression in normal individuals carrying HLA-A*68 alleles** » *Human Immunology*, 1996, 47(1-2), 16

M. Laforêt, N. Froelich, A. Parissiadis, B. Pfeiffer, A. Schell, JP Cazenave, M.M Tongio - « **Nucleotide mutations in exon I are responsible for the absence of expression of a new HLA-A*68 allele.** » *European Journal of Immunogenetics*, 1998, 25 (suppl.1), 7

M. Laforêt, N. Froelich, A. Parissiadis, B. Pfeiffer, A. Schell, N. Boetsch, M.M Tongio - « **Comparison of HLA-A and HLA-B typing by serological and DNA techniques in homozygous volunteer bone marrow donors** ». *European Journal of Immunogenetics*, 1998, 24 (suppl.1), 106.

8 - **Jean-François MOREAU** - Université de Bordeaux II

« *Etude de la production d'antagonistes naturels du CD 28 chez des patients tolérant leur allogreffe rénale* »

Résumé :

Nous avons voulu déterminer si l'établissement d'un état de tolérance à une allogreffe rénale était lié à la production d'antagonistes naturels du CD28. Nous avons testé 100 sérums de patients receveurs d'une transplantation rénale pour leur inhibition de la fixation de CTLA4-Ig sur les cellules Jurkat transfectées avec B7-1 et B7-2. Quatre sérums ont montré une activité inhibitrice sur la fixation de la CTLA4-Ig. Cependant, ceci était dû à un effet cytotoxique sur les cellules Jurkat. La mise au point du test en ELISA est actuellement en cours. D'autre part nous avons regardé si le ligand du CD40 était également capable de stimuler la synthèse des cytokines par les cellules endothéliales allogéniques. Les résultats indiquent que l'activation des CE par le ligand du CD40 pourrait jouer un rôle important non seulement sur le recrutement des leucocytes mais également sur l'entretien de l'inflammation.

Dechanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoché J, Moreau JF. « **CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells** » *J. Immunol.* 1997 Dec 1;159(11):5640-7.

9 - **Patricia LEMARCHAND** - Université Paris V

« *Prévention du rejet de greffe par transfert et expression in vivo d'un gène codant pour une immunoadhésine* »

Résumé :

Ce projet avait pour but d'étudier la prévention du rejet de greffe, par le transfert et l'expression d'un gène codant pour une immunoadhésine IgG1-ICAM1 soluble, dans des modèles de greffe d'organes chez la souris. Nous avons pu montrer que la surexpression d'ICAM soluble permettait effectivement de retarder les réactions du rejet de greffe avec :

(1) absence d'efficacité dans les greffes de peau (résultat attendu, car les greffes de peau sont les plus « difficiles » sur le plan immunologique), (2) retard d'apparition du rejet de greffe de cœur, (3) retard d'apparition du rejet de greffes d'ilôts. Cette étude ouvre la voie à l'utilisation du transfert de gènes codant pour des protéines immunorégulatrices pour la prévention du rejet de greffes.

Bertry-Coussot L, Chatenoud L, Lucas B, Danel C, Halbwachs-Mecarelli L, Bach J-F, Lemarchand P. « **sICAM-Ig based gene therapy induces durable remission of established autoimmune diabetes through active tolerance** ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001.

Barrou B, Bertry-Coussot L, Morin S, Lucas B, Bitker MO, Debré P, Lemarchand P. « **Prolonged islet allograft survival by adenovirus-mediated transfer of sICAM-1/Ig immunoadhesin gene** ». *Hum Gene Ther.* 2002 Aug;13(12):1441-50

10 - **Jean-François ELIAOU** - Université Montpellier

« *Rôle du microchimérisme dans l'induction de tolérance après allogreffe d'organe : analyse quantitative, étude cinétique, identification des cellules en cause et corrélation avec la survie du greffon* »

11 - **Bernard KREITMAN** - Hôpital de la Timone - Marseille

« *Croissance et viabilité des homogreffes valvulaires cardiaques* »

12 - **Sélim ARACTINGI** - CEA - PARIS

« *Etude immunologique de la maladie chronique du greffon contre l'hôte* »

Résumé :

L'intérêt d'explorer la réaction chronique du greffon contre l'hôte (GvHD chronique) provient du fait que celle-ci constitue l'une des principales limitations de la greffe de moelle osseuse allogénique et que sa physiopathologie reste encore assez mal comprise. La peau étant la principale cible de cette réaction, elle a constitué notre modèle. Après avoir pu montrer que les mêmes cytokines et les mêmes molécules d'adhésion étaient exprimées dans les formes cliniques de GvHD, suggérant que l'une de ces formes était la conséquence de cicatrisation de l'autre, nous avons effectué l'étude des cellules de Langerhans (CL) dont le statut était controversé. Nous avons observé une déplétion intense de ces cellules restreinte à la peau lésée, démontrant donc un lien entre GvHD chronique et réduction en CL. Ces cellules étant très majoritairement issues du donneur, cette déplétion suggère la présence d'un mécanisme d'autoréactivité. En raison de la démonstration du rôle autoantigénique de PML dans la cirrhose biliaire primitive (CBP), maladie proche de la GvHD,

nous avons exploré cette protéine et montré qu'elle était exprimée sans anticorps circulant, probablement secondairement à la sécrétion d'IFN γ . Enfin, l'absence de perforine et de granzyme et la présence par RT-PCR de mRNA de Fas L dans les spécimens de peau lésée montre que c'est cette voie de cytotoxicité qui aboutit à l'apoptose des kératinocytes précédemment montrée dans la GvHD chronique.

Aractingi S, Glukman E, Dauge-Geffroy MC, LeGoué C, Carosella ED - «Langerhans cells are depleted in chronic graft versus host disease - J. Clin Pathol 1997, 50 : 305-309

Aractingi S, deThé H, Gluckman E, LeGoué C, Carosella ED -PML is expressed in chronic graft versus host disease - Bone Marrow Transplant 1997, 19 : 1125-1128

RECHERCHE et GREFFE (1996)

THÈME 1 : RECHERCHE SUR LES FACTEURS RESPONSABLES DU MANQUE DE GREFFONS

1- **Michel PENNEAU** -CHU d'Angers

« La présomption de consentement du don d'organes post-mortem est-elle en harmonie avec les mentalités dans la société française en 1996? »

Résumé :

La loi pose le principe de la présomption de consentement en matière de prélèvement d'organe sur le cadavre. Dans la pratique, ce principe est mis en échec. Le plus souvent le consentement des familles est sollicité, et les refus fréquents expliquent, en partie la pénurie de greffons. On en tire souvent la conclusion que la loi est en avance sur les mentalités. Ce projet a pour but de vérifier ou d'infirmer, une hypothèse contraire, selon laquelle il y aurait à distinguer une mentalité de « futur défunt » (en accord avec le principe de présomption de consentement), et mentalité de « proche d'un défunt » (opposé aux prélèvements. La méthode utilisée serait celle d'un sondage d'opinion. De manière corollaire, on souhaiterait également vérifier les hypothèses annexes suivantes :

- Résistance à l'idée d'être porteur d'une carte de donneur.
- Confusions sémantiques autour des concepts de « coma dépassé » et de « mort cérébrale ».
- Identité de mentalité entre population médicale et population générale.

M. Penneau. **Prélèvements et transplantations d'organes, aspects juridiques et éthiques.** La revue du Praticien, 1999, June 1 ; 49(11) :1203-6.

THÈME 2 : RECHERCHE SUR LA QUALITE DES GREFFONS

1 - **Paul CANIONI** - Université de Bordeaux II

« Etude de la fonction mitochondriale au cours de l'ischémie et la reperfusion. Optimisation de la qualité du greffon hépatique ».

Résumé :

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet soulignent l'importance capitale de la protection des fonctions mitochondriales lors du processus de transplantation d'organes. Le rôle du pore de transition de perméabilité mitochondrial dans les dommages liés à la reperfusion du foie a été démontré, aussi bien au niveau mitochondrial qu'au niveau du contenu de l'organe en ATP, suivi par RMN du ³¹P de l'organe perfusé. On observe en effet une protection totale en présence de cyclosporine A, inhibiteur spécifique de l'ouverture de ce pore. Les méthodes fines d'analyse de la fonction mitochondriale qui ont permis le diagnostic au cours de la reperfusion devraient aussi permettre de vérifier l'hypothèse d'une perte mitochondriale de cations divalents (Mg²⁺, Ca²⁺) consécutive à l'ouverture du pore. Des expériences similaires réalisées sur le rein de porc perfusé ont abouti à un résultat opposé : la cyclosporine A provoque un effondrement du contenu en ATP du rein ainsi que des dysfonctions mitochondriales sévères, ce qui suggère l'implication des mitochondries dans la néphrotoxicité de cette molécule. En complément à ces études sur des modèles animaux, l'analyse par RMN de greffons humains avant transplantation est en cours de réalisation; ce qui devrait permettre d'établir s'il existe une corrélation entre l'état énergétique du greffon et ses capacités de reprise de fonction après transplantation.

Leducq N., Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, Dioloz P. **Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporin and role of the mitochondrial permeability transition pore.** Transplant Proc. 2000 Mar; 32(2):479-80.

Leducq N., Delmas-Beauvieux M.-C., Bourdel-Marchasson I., Dufour S., Gallis J.-L., Canioni P. and Dioloz P (1998) **Mitochondrial permeability transition during hypothermic to normothermic reperfusion in rat liver demonstrated by the protective effect of cyclosporin A.** Biochem. J. 336, 501-506.

2 - **Philippe CHIRON** - Université de Toulouse III

« Protocole de stérilisation des têtes fémorales humaines par la chaleur humide »

Résumé :

Une allogreffe de tête fémorale prélevée stérilement sur un donneur sélectionné, pour laquelle ont été réalisés des tests micro biologiques, avant, pendant et quatre mois après l'intervention, puis décontaminée par la chaleur avant implantation, transportée dans un bocal de sécurité sous vide et réactivée par une protéine ostéo inductrice nous semble être un véritable progrès par rapport aux conditions actuelles tant sur le plan de la sécurité que de l'efficacité ; la faisabilité est réelle. L'utilisation de cette méthode et de ce matériel devrait permettre d'abaisser les coûts des fonctionnements d'une banque surtout s'il est possible d'utiliser cette méthode comme une méthode de conservation.

3 - Daniel CHAPPARD & Michel Félix BALSE - Université d'Angers

« Optimisation des procédures de purification des allogreffes osseuses »

Résumé :

En raison des risques potentiels de transmission de protéine prion, les xénogreffes d'origine bovine ont perdu beaucoup de leur intérêt comme matériaux de comblement osseux. L'utilisation d'allogreffes préparées à partir de têtes fémorales prélevées pour arthrose peut apparaître comme une alternative intéressante. Plusieurs techniques de conservation ont été proposées : lyophilisation, congélation et irradiation par rayons gamma. Cependant, dans tous les cas, la mise en place d'une telle allogreffe laisse persister des reliquats lipidiques importants (environ 70 % du poids d'une tête fémorale est constituée de lipides médullaires). Les lipides sont connus pour être peu biocompatibles, de plus, les modifications exactes des lipides lors des processus de stérilisation et de stockages sont mal connues.

Nos objectifs ont été d'identifier les effets de l'irradiation gamma sur les lipides médullaires et de rechercher la cytotoxicité des composés peroxydés générés à l'aide de cultures d'ostéoblastes puis de proposer une méthode de délipidation simple et efficace. Des carottes osseuses ont été réalisées avec un trépan sur 8 têtes fémorales obtenues au cours de la mise en place de prothèse de hanche pour arthrose. Des cylindres ont été stérilisés par rayons gamma (25.000 gray) ou maintenus congelés. Un dosage des lipides totaux et des lipofuscines a été réalisé par la méthode de Folch. Les lipides peroxydés sont apparus en quantité 2,3 fois plus forte dans les cylindres irradiés que dans les cylindres congelés. Des tranches ont été préparées à partir de ces cylindres et ont été transférées sur des tapis confluent de cellules ostéoblastiques (Saos-2). Les tranches (contenant des lipides irradiés) induisent la nécrose des cellules sur leur périphérie, ce paramètre a été mesuré en analyse d'images. Les tranches dégraissées qui avaient été stérilisées par les rayonnements gamma ou UV n'ont pas induit de nécrose cellulaire. Des procédures de dégraissage devraient être ajoutées aux procédés usuels lors de la préparation des allogreffes osseuses dans les banques d'os.

Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D. **Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells.** *Biomaterials* 2000 Feb;21(4):369-76.

4 - Jean-Luc DESCOTES - Université de Grenoble

« Evaluation de la cryopréservation par vitrification de vaisseaux sanguins ».

Résumé :

Le but de ce travail est d'étudier la cryoconservation par congélation d'aortes de lapin. Les tests pharmacologiques et mécaniques ont permis, par comparaison avec des échantillons frais, d'évaluer la toxicité de deux cryoprotecteurs (diméthyl-sulfoxyde (DMSO) et 1,2 propanediol (1,2-PD)), ainsi que les conséquences de la congélation. La toxicité des cryoprotecteurs n'est mise en évidence que par altération de la fonction endothéliale. La congélation diminue très fortement la réponse des cellules musculaires lisses. L'utilisation du DMSO permet la meilleure conservation de cette réponse. L'évaluation des qualités mécaniques statiques de segments aortiques n'a pas mis en évidence de différence entre artères fraîches et congelées. L'étude se poursuit et va permettre de comparer congélation et vitrification de tissus artériels.

Baudot A, Agostini B, Bret J.L., Mazuer J., Odin J. **Rewarming of a vitrified cryoprotective solution using electromagnetic waves.** *Cryobiology* 39,281 (1999)

Descotes J.L., Skowron O., Stanke F., Baudot A., Riebel D., Sappey O., Egelhoffer G. **Rabbit aorta cryopreservation : toxicity of cryoprotectants and freezing injury evaluated by pharmacologic tests.** *Cryobiology* 39, 362-363 (1999)

Baudot A., Mazuer J., Odin J., Skowron O., Descotes J.L. **Confinement effect on thermal properties of cryoprotective solution.** *Refrigeration Science and Technologie Proceedings, IIF-IIR (Commissions B1, C1 et C2) "Pergélisol et actions du froid naturel ou artificiel"* Orsay, 261-268 (1998).

Baudot A., Alger L., Boutron P. **Glass-forming tendency in the system water-dimethylsulfoxide.** *Cryobiologie* 40, 151-158 (2000).

Baudot A., Guttin C., Skowron O., Sappey O., Descotes J.L. **Cryopreservation par vitrification de petits éléments biologiques.** *Revue générale du froid*, n°1007, 33-39 (octobre 20 00).

5 - Pascal ESCHWEGE - Université de Paris sud

« Evaluation de la qualité des reins prélevés après ischémie chaude en vue de transplantation »

Résumé :

L'objectif du projet financé par l'Etablissement Français des Greffes en 1996 consistait à étudier la qualité des reins prélevés après ischémie chaude en vue de leur transplantation. Nous avons effectué :

1- L'évaluation de la peroxydation lipidique sur des reins de rats après clampage bilatéral des pédicules vasculaires pendant une durée de 0 à 60 minutes. Nous avons montré l'existence d'une peroxydation lipidique lors de l'ischémie rénale. Cette peroxydation se propage du cortex vers la médullaire du rein. La détection immunohistochimique des marqueurs de la peroxydation lipidique (malonedialdéhyde (MDA) et 4-hydroxynonéanal (HNE)) semble particulièrement pertinente pour mieux apprécier l'état lésionnel peroxydatif des organes ayant souffert d'ischémie chaude lors du

prélèvement effectué sur les donneurs cadavériques ayant souffert de collapsus, d'arrêt cardiaque ou prélevés à cœur arrêté. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le Journal Of Urology qui paraîtra au mois d'Août 1999.

2- L'évaluation de l'activité enzymatique antioxydante après différentes phases d'ischémie rénale. Nous avons étudié les activités de la SOD Cu / Zn, de la SOD Mn, de la glutathion peroxydase (GPX) et de la catalase. Nous avons montré qu'à partir de la 45ème minute d'ischémie chaude l'ensemble des activités enzymatique antioxydante (AEA) était significativement effondré, que la baisse des AEA les enzymes survenait dès la 15ème minute d'ischémie pour la SOD Mn et la catalase, à partir de la 30ème minute pour la GPX. Cette baisse successive des AEA est à rapprocher à la diffusion des lésions de peroxydation lipidique et la mortalité croissante des animaux (33% après 45 minutes et 66% après 60 minutes d'ischémie).

3- L'évaluation de l'expression rénale des protéines BAX et BCL-2 (pro et antiapoptique) après ischémie du rein. Nous avons montré l'absence d'expression de ces protéines en immunohistochimie y compris lors de la phase d'induction de l'ischémie. Selon notre modèle l'ischémie chaude induit donc plus un phénomène de nécrose cellulaire qu'un phénomène apoptique. Ce travail a été publié dans Transplantation Proceeding (Transplant Proc 30, 1998, 2861-2862). **Conclusion** : Nous avons dans ce travail mis en évidence de la peroxydation lipidique par étude immunohistochimique à l'aide d'anticorps anti HNE et anti MDA. Cet outil peut être proposé dans un contexte de greffe et pouvait donner de bonnes informations sur l'état peroxydatif des reins. Son association avec l'étude biochimique des activités enzymatiques anti oxydantes sont tout à fait pertinentes. L'association d'une baisse simultanée des principales enzymes anti oxydantes s'accompagne de l'absence de reprise de la fonction rénale. Enfin le clampage bilatéral est responsable de nécrose plus que d'apoptose dans le modèle que nous avons étudié.

P. Eschwège, V. Paradis, M. Conti, A. Holstege, F. Richet, J. Detève, P. Ménager, A. Legrand, A. Jardin, P. Bedosa, G. Benoit. **In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys.** The journal of Urology, Vol.162, 553-557, August 1999

P. Eschwège, V. Paradis, M. Conti, S. Loric, F. Dumas, P. Berteau, M. Ahmed, S. Droupy, B. Charpentier, A. Legrand, P. Bedossa, G. Benoit. **Bcl-2 and Bax Expression on Rat Ischemic Kidney.** Transplantation Proceedings, 30,2861-2862 (1998).

6 - **Xavier MARTIN**-Université Claude Bernard Lyon 1

« Evaluation chez le primate de l'effet protecteur d'un anticorps monoclonal anti-LFA-1 vis à vis des dommages rénaux provoqués par la reperfusion post-ischémique associée à la transplantation ».

Travail terminé - Rapport disponible

X. Martin, M. Da Silva, R.S. Virieux, I. Daher, A. Hadj-Aïssa, R. Buffet, J. Tiollier, S. Zheng, R. Guttman, and J.M. Dubernard « **Autotransplantation of the Kidney in Primates : A model of renal damage to study the ischemia-reperfusion injury** - Transplantation Proceedings, 29, 3428-3429 (1997)

X. Martin, M. Da Silva, SR Virieux, A. Hadj Aïssa, R. Buffet, J. Tiollier, JM Dubernard. « **Protective effect of an Anti-LFA 1 monoclonal antibody (odulimomab) on renal damage due to ischemia and kidney autotransplantation.** Transplantation Proceedings, 32,481 (2000).

7 - **Jean-Pierre VILLEMOT** - Laboratoire de chirurgie expérimentale - Université de Nancy I

« Mort cérébrale et dysfonction du greffon cardiaque; impact sur la neurotransmission sympathique, sur l'activité de la No synthase et sur le métabolisme myocardique ».

Résumé :

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du dysfonctionnement myocardique consécutif à l'état de mort cérébrale ne sont que partiellement connus. Nous avons montré dans plusieurs travaux que l'activation incontrôlée du système nerveux sympathique cardiaque pouvait entraîner un déséquilibre entre les apports et la demande myocardiques en oxygène dont témoigne l'augmentation des concentrations interstitielles de lactate et d'adénosine. Ce déséquilibre est responsable, au moins en partie, du dysfonctionnement myocardique dans l'état de mort cérébrale. Nous avons montré dans un modèle expérimental chez le porc que l'administration avant la mort cérébrale, d'un α et β antagoniste (le labétalol) atténuait la stimulation sympathique incontrôlée, le déséquilibre entre les apports et la demande myocardiques en oxygène ainsi que le dysfonctionnement myocardique. Ces résultats sont des arguments supplémentaires en faveur du schéma physiopathologique que nous étudions. Nous avons entrepris des travaux destinés à améliorer notre compréhension des mécanismes anti-adrénergiques naturels dans le myocarde et la possibilité de leur manipulation pharmacologiques afin d'atténuer les effets néfastes de la stimulation sympathique contemporaine de l'état de mort cérébrale. Les deux systèmes anti-adrénergiques naturels que nous avons explorés sont la voie de l'adénosine et celle du monoxyde d'azote (NO)/L-arginine. Nous avons développé l'outil expérimental qui nous permettra d'étudier les effets de la manipulation pharmacologique de ces deux systèmes sur l'activation incontrôlée du système sympathique cardiaque dans l'état de mort cérébrale.

Dopff C., de Talancé N., Hottier E., Mattei M.F, Carteaux J.P., Burlet C., Villemot J.P., Mertes P.M. **Consequences of heart transplantation on calcium metabolism.** Transplantation Proceedings, 1998; 30:2833-2834

Siaghy E. M., Halejcio-Delophont P., Devaux Y., Richoux J.P., Villemot J.P., Burllet C., Ungureanu-Longrois D., Mertes P.M. **Protective effects of Labetalol on myocardial contractile function in brain-dead pigs.** Transplantation Proceedings, 1998; 30: 2842-2843.

Halejcio-Delophont P., Siaghy E.M., Devaux Y., Richoux J.P., Bischoff N., Carteaux J.P., Ungureanu-Longrois D., Burllet C., Villemot J.P., Mertes P.M. **Consequences of Brain death on coronary blood flow and myocardial metabolism.** Transplantation Proceedings, 1998; 30: 2840-2841.

Siaghy E.M., Oesterlé B., Kheiri A., Halejcio-Delophont P., Ungureanu-Longrois D., Villemot J.P., Mertes P.M. **Consequences of static and pulsatile pressure on transmembrane exchanges during in vitro microdialysis. Implication for studies in cardiac physiology** Medical & Biological Engineering & Computing, 1999, vol. 37

Halejcio-Delophont P., Siaghy E.M., Devaux Y., Ungureanu-Longrois D., Richoux J.P., Beck B., Burllet C., Villemot J.P., Mertes P.M. **Increase in myocardial interstitial adenosine and net lactate production in brain dead pigs. An in vivo microdialysis study.** Transplantation, vol. 66; 1278-1284; N°10, nov.27, 1998

Siaghy E.M., Devaux Y., Sfaksi N., Mairose P., Servet N., Ungureanu-Longrois D., Zannad F., Villemot J.P., Nabet P., Burllet C., Mertes P.M., Schroeder H., **High performance liquid chromatographic analysis of muscular interstitial arginine and norepinephrine kinetics. A microdialysis study in rats.** Journal of chromatography A and B, Biomed Sci Appl 2000, Aug. 18; 745(2):279-86.

8 - **José SAHEL** - Faculté de Médecine Strasbourg

« Transplantation de photorécepteurs, optimisation de la qualité des greffons »

Résumé :

Dans les rétinopathies pigmentaires (RP), la dégénérescence des bâtonnets, affectés par les mutations, suivies par celles des cônes, indemnes d'anomalie génétique, suggère que la survie des cônes dépend des bâtonnets. L'amélioration de la survie des cônes de rétines de souris *rd* (modèle de RP) par la greffe de photorécepteurs (PR) (Mohand Said et coll., 1997), effet médié exclusivement par les PR (Mohand Said et coll. soumis), confirme cette hypothèse. La nature diffusible des facteurs impliqués a été démontrée *in vitro* (Mohand Said et coll., 1998). La transplantation de PR constitue une perspective thérapeutique des RP, ainsi, un essai clinique est en préparation. Cette recherche conduit à deux approches pour identifier ces facteurs en vue d'une thérapie pharmacologique : 1) Stratégie systématique d'identification : le clonage par expression. 2) Facteurs candidats tel le GDNF qui améliore la survie des bâtonnets et l'électrorétinogramme de la souris *rd*. (Frasson et coll., soumis).

Mohand-Said S, Weber M, Hicks D, Dreyfus H, Sahel J. **Intravitreal injection of ganglioside GM1 after ischemia reduces retinal damage in rats.** Stroke. 1997 Mar; 28(3):617-21; discussion 622.

Heidinger V, Hicks D, Sahel J, Dreyfus H. **Ability of retinal Muller glial cells to protect neurons against excitotoxicity in vitro depends upon maturation and neuroglial interactions.** Glia. 1999 Feb 1; 25(3):229-39.

Hicks D, Heidinger V, Mohand-Said S, Sahel J, Dreyfus H. **Growth factors and gangliosides as neuroprotective agents in excitotoxicity and ischemia.** Gen. Pharmacol. 1998 Mar;30(3):265-73.

Mohand-Said S, Deudon-Combe A, Hicks D, Simonutti M, Forster V, Fintz AC, Leveillard T, Dreyfus H, Sahel J. **Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse.** Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Jul 7; 95(14):8357-62.

Picaud S, Hicks D, Forster V, Sahel J, Dreyfus H. **Adult human retinal neurons in culture: Physiology of horizontal cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 Dec ; 39(13) :2637-48.

9 - **Michel EUGENE** - Hôpital Saint-Louis - APHP

« Evaluation du rôle de la composition des solutions de transport de tissus dans la qualité de la cryopréservation »

Résumé :

Nous avons étudié les conséquences sur la viabilité cellulaire, des solutions de transport utilisées avant cryopréservation de la peau, des valves cardiaques et des artères préparées à la Banque de Tissus de l'AP-HP : Les méthodes mises en jeu pour évaluer les effets de ces solutions sur la structure de l'eau tissulaire au cours de la congélation et leurs conséquences sur la viabilité cellulaires étaient (i) la mesure de la consommation d'oxygène (ii) la mesure de la fraction d'eau non gelable à -20°C en RMN proton (iii) la mesure pic exothermique produit par la cristallisation en calorimétrie différentielle.

- Les solutions cristalloïdes ne contenant pas de grosses molécules (Eurocollins, Ringer/Lactate) donnent les plus mauvais résultats et doivent être rejetées.

- Les solutions contenant des grosses molécules (Plasmagel, Eurocollins, University of Wisconsin, SCOTT-FII) diminuent la quantité de glace formée pendant le processus de congélation, permettant d'obtenir une augmentation de la consommation d'oxygène tissulaire après décongélation.

- Parmi ces solutions une solution normopotassique (SCOTT-FII) permet d'obtenir une meilleure viabilité cellulaire qu'une solution hyperpotassique (University of Wisconsin) avant cryopréservation, mais des résultats identiques après décongélation.

Ces résultats permettent de valider l'utilisation d'une solution de conservation de type SCOTT-FII, qui en plus de ses effets sur la viabilité cellulaire et de la lutte contre l'œdème tissulaire, a été choisie pour les effets spécifiques du PEG qu'elle contient, concernant la diminution des phénomènes d'inflammation, de la production de radicaux libres et des épisodes de rejet après transplantation.

C. Knossalla, O. Goëau-Brissonnière, V. Leflon, P. Bruneval, M. Eugène, JC Pechère, F. Koskas, MH Nicolas, JP Leschi, J. Gerota, E. Kieffer. **Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study.** Journal of vascular surgery, April 1998; 27; 689-698

M. Eugène, F. Koskas, E. Kieffer, L. Eugène. **Résultats cliniques de l'implantation des allogreffes aortiques cryopréservées.** Site Internet : <http://www.invivo.net/rmn>.

10 - **Fabien KOSKAS** - Hôpital Pitié Salpêtrière - APHP

« Optimisation des techniques de cryopréservation des allogreffes artérielles afin d'améliorer leur résistance à l'infection »

Résumé :

Après avoir démontré l'intérêt clinique du traitement des infections aortiques et prothéto-aortique par allogreffe fraîche in situ, notre groupe de recherche a adapté les techniques de cryopréservation à la problématique spécifique des allogreffes aortiques. La cryopréservation des allogreffes aortiques était réputée dangereuse et inefficace, avant nos travaux. Nous avons pu démontrer que c'était le caractère inadéquat des techniques qui était en cause. Avec les procédés que nous avons mis au point, les résultats biomécaniques, bactériologiques et cliniques des allogreffes aortiques cryopréservés se sont révélés au moins équivalents à ceux de leurs homologues fraîches. Nous avons pu enfin étudier les mécanismes de la résistance à la contamination bactérienne des allogreffes artériels frais et cryopréservés par comparaison avec les matériaux synthétiques.

En résumé, l'aptitude des allogreffes à maintenir une charge antibiotique considérable et peut-être un rôle du composant cellulaire musculaire lisse ont été mis en lumière.

C. Knosalla, OL Goëau-Brissonnière, V. Leflon, P. Bruneval, M. Eugène, JC Pechère, F. Koskas, MH Nicolas, JP Leschi, J. Gerota, E. Kieffer. **Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study.** Journal of Vascular Surgery 1998; 27(4):689-98.

11 - **Jacques WATELET** - CHU Rouen

« Comparaison des effets d'une infection à staphylocoque doré sur allogreffes aortiques de chien, conservées soit par cryocongélation, soit en milieu nutritif à 4°C »

Résumé :

Le but de ce travail était d'étudier les mécanismes de résistance à l'infection du tissu artériel. Il reposait sur une étude de l'activité antistaphylococcique du tissu in vitro. L'activité antistaphylococcique était mesurée sur l'aorte abdominale de six chiens. Chaque aorte était découpée en cinq segments. Un segment était non conservé; 4 segments étaient conservés dans une solution avec ou sans antibiotique, puis conservé à +4°C ou congelés à -150°C en azote liquide. Après une semaine de conservation, chaque segment était découpé en 6 disques de 6 mm de diamètre. Les disques étaient déposés sur une gélose ensemencée par un inoculum standardisé de Staphylococcus aureus (0,5 U Mc Farland) le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque était mesuré à la 24ème heure. Ainsi cinq groupes de segments artériels étaient étudiés : non conservés = A ; conservés à +4°C avec antibiotique = B ; conservés à +4°C sans antibiotique = C ; cryoconservés avec antibiotiques = D, cryoconservés sans antibiotique = E. In vitro l'activité artérielle n'avait pas d'activité antistaphylococcique spontanée; celle-ci était induite par les antibiotiques présents dans les solutions de conditionnement du tissu. Le tissu artériel conservé à +4°C avait une activité antistaphylococcique plus importante que le tissu cryoconservé. La résistance du tissu artériel à la colonisation bactérienne est due en partie à l'imprégnation du tissu par les antibiotiques.

P.Y. Litzler, P. Thomas, E. Danielou, J. Lucq, B. Jacques, N. Frebourg, D. Plissonnier, D. Bastit, J. Metayer, C. Peillon, J. Testard, J. Watelet. **Bacterial resistance of refrigerated and cryopreserved aortic allografts in an experimental virulent infection model.** Journal of Vascular Surgery, June 1999; 29(6):1090-6.

12 - Thierry HAUET - INRA- SURGERES

« *Evaluation de nouvelles solutions de conservation en transplantation rénale chez le porc. Apport de la résonance magnétique nucléaire proton* »

Résumé :

A partir de modèles d'ischémie reperfusion sur le rein de porc et le rat isolé perfusé, nous avons confirmé l'efficacité de l'association de la trimétazidine (TMZ) et de l'Euro-Collins (Ec) d'une part et d'autre part, l'addition d'une grosse molécule (polyéthylène glycol PM 20000 - PEG) à une solution extracellulaire (Krebs) en les comparant à 2 solutions de référence, l'EC et l'UW (University of Wisconsin). Le but de ce travail a été de tester à 48 heures d'ischémie froide sur un modèle d'autotransplantation chez le porc l'efficacité de l'association de la TMZ aux solutions EC et UW, l'efficacité de la solution Krebs PEG seule ou associée à la TMZ. Sur une période de 14 jours seront évalués les fonctions tubulaires, la filtration glomérulaire et l'aspect histologique. Nous utiliserons également la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) proton pour cette évaluation. Ces études permettent de dégager trois résultats principaux :

1- la TMZ est d'un apport intéressant pour la conservation des reins.

2- Les solutions ayant une composition extra-cellulaire entraînent une diminution significative des lésions de reperfusion par rapport aux solutions intracellulaires.

3- L'efficacité du PEG est extrêmement importante dans la conservation et la protection contre la reperfusion.

4- La RMN est une technique très prometteuse, elle permet l'évaluation précoce de la reprise de fonction. La conception et la fabrication d'appareils plus récents devraient permettre une évaluation directement au niveau des organes car un grand nombre des marqueurs utilisés sont intracellulaires et donc détectables au sein directement des tissus préservés.

J.P. Richer, H. Gibelin, M. Planet, A. Bardou, I. Ben Amor, T. Germonville, JC Caritez, M. Carretier, M. Eugene, T. Hauet « **Ischemia reperfusion injury is associated with inflammatory cells infiltration: evaluation in a pig kidney autotransplant model** ». Transplant Proc. 2000 Mar; 32(2): 482-3.

J.P. Richer, H., J.P. Faure, I. Ben Amor, M. Carretier, M. Eugene, J.P. Tillement, T. Hauet, H. Baumert, H. Gibelin, W. Hebrard. « **Limitation of ischemic damage to the renal medulla by trimetazidine added to Euro-Collins solution: evaluation in an autotransplant model** ». Transplant Proc. 2000 Mar; 32(2):477-8.

T. Hauet, H. Baumert, JM. Goujon, J.P. Richer, L. Lacoste, J.P. Tillement, M. Eugene, M. Carretier « **Renoprotective effects of trimetazidine, against ischemia-reperfusion injury and cold storage preservation: a preliminary study** ». Transplantation 1999 Jul 27, 68(2):300-3.

T. Hauet, JM Goujon, A. Vandewalle, H. Baumert, L. Lacoste, JP Tillement, M. Eugène, M. Carretier. « **Trimetazidine reduces organ dysfunction and T Lymphocyte infiltration by limiting cold ischemia-reperfusion injury** ». Journal of American Society of Nephrology, 2000, 138-148.

13 - Evelyne RACADOT - ETS Besançon

« *Analyse fonctionnelle et phénotypique des cellules lymphoïdes du sang placentaire* »

Résumé :

Après avoir montré que les cellules lymphoïdes placentaires présentaient des caractéristiques d'immaturation, par exemple expression de CD45 RA, absence d'activité NK spontanée et faible capacité de stimulation en culture mixte lymphocytaire (CML), mais également certaines fonctions normales, par exemple capacité proliférative normale en CML, il nous a paru intéressant d'étudier d'autres fonctions. La présente étude nous a permis de montrer sur 15 sangs placentaires et 13 sujets témoins que la fréquence des pré-CTL était en moyenne identique dans les deux cas, avec de grandes disparités d'un échantillon à l'autre. Nous avons également étudié la capacité de sécrétion de cytokines sur 18 sangs placentaires et 13 sujets témoins par analyse en cytométrie de flux et double marquage : cytokines intracytoplasmiques et marqueurs lymphoïdes de surface. Il existe une différence significative de la sécrétion d'interféron γ (2,9 % dans les cellules placentaires et 20,4% dans les cellules adultes). Nous n'avons pas trouvé de différences pour IL-2, IL-4 et IL-10. Enfin, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le pourcentage de cellules IL-2 positives et la fréquence des précurseurs cytotoxiques.

C. Gay. **Mémoire de DEA – Relation Hôte-Greffon en transplantation d'organes et greffe de tissus, septembre 1997.**

Communications:

2.1. Racadot E, Billot M, Hervé P. **Detection of intracellular cytokine production by cord blood T cells using flow cytometry.** Société française d'Hématologie, février 1998.

2.2. Racadot E, Billot M, Hervé P. **Detection of intracellular cytokine production by cord blood T cells using flow cytometry.** Eurocord transplantation workshop meeting, Annecy, mai 1998

1 - **Seiamak BAHRAM** - Université Louis Pasteur Strasbourg

« Le polymorphisme inattendu d'une nouvelle molécule de classe 1 d'histocompatibilité et la pathogénèse de la réaction du greffon contre l'hôte »

Résumé :

Définition du répertoire et détermination de la fréquence allélique du *MICA* dans la population générale et chez les couples donneurs/receveurs de GMO ayant développé un GVHD malgré la compatibilité des 6 loci HLA classiques (A/B/C/DR/DP/DQ). A cette fin nous établirons a) la séquence de *MICA* dans les 110 lignées HTCL (HLA Homozygous Typing Cell Lines) collectées lors de la 10^{ème} « International HLA Workshop » et ceci afin de connaître au mieux le répertoire complet de l'allélisme de *MICA*. Cette étape comprendra *in fine* la détermination de la fréquence des variants retrouvés chez la population tout venant. b) la séquence de *MICA* chez les couples donneurs/receveurs de GMO ayant développé une GVHD malgré la compatibilité HLA. L'identification d'une discordance dans la séquence de *MICA* dans ces couples impliquera cette molécule dans la pathogénèse de GVHD.

N. Fodil, P. Pellet, L. Laloux, G. Hauptmann, I. Theodorou, S. Bahram « **MICA haplotypic diversity** ». *Immunogenetics*. 1999 Jun ; 49(6) :557-60.

2 - **Lucienne CHATENOUD & Claude CARNAUD** - INSERM- Unité 25 - PARIS

« Une stratégie d'immunointervention pour neutraliser la réponse allogénique et auto-immune chez une souris diabétique »

3 - **Eric RONDEAU** - INSERM- Unité 64 - PARIS

SOUTIEN : 150.000 F

« Rejet chronique de transplantation rénale et polymorphisme du gène PAI-1 »

Résumé :

Le rejet chronique de transplantation rénale est la première cause de perte de greffon à long terme. Il est marqué par une fibrose progressive du greffon rénal. Le rôle du PAI-1 (inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène) peut être suspecté comme facteur favorisant cette fibrose. La synthèse du PAI-1 est contrôlée génétiquement et un polymorphisme 4G/5G du promoteur du PAI-1 a été démontré. Le but de l'étude est de déterminer les fréquences alléliques du gène du PAI-1 chez les donneurs (à partir de biopsies du greffon) et chez les receveurs (à partir du sang circulant) de greffon rénal et de comparer ces fréquences en fonction de la présence ou de l'absence de rejet chronique. Une corrélation sera recherchée entre la concentration de PAI-1 plasmatique et le génotype d'une part, et les triglycérides, l'insulinémie et l'index de poids corporel d'autre part. Cette étude devrait permettre de déterminer si l'allèle 4G du donneur et/ou receveur qui est associée à une augmentation de la synthèse de PAI-1 est un facteur de risque de rejet chronique.

A. Lahlou, M.N. Peraldi, E. Thervet, A. Flahault, F. Delarue, F. Soubrier, J. Rossert, E. Rondeau. **PAI-1 as a causative agent in chronic renal graft dysfunction and progression of renal failure**. Société américaine de nephrology.11 :2000.

A. Lahlou, M.N. Peraldi, E. Thervet, A. Flahault, F. Delarue, F. Soubrier, J. Rossert, A. Hertig, E. Rondeau. « **Chronic graft dysfunction in renal transplant patients: potential role of plasminogen activator inhibitor type 1** ». *Transplantation*. 2002 Apr 27;73(8):1290-5.

4 - **Sabine SARNACKI** - INSERM- Unité 429 - PARIS

« Etude du mécanisme de prévention du rejet de greffe de moelle osseuse et d'organes par un anticorps monoclonal anti LFA-1 »

Résumé :

Notre projet avait pour but d'une part de mettre au point un modèle permettant de suivre *in vivo* et *in vitro* les cellules spécifiquement impliquées dans la réaction immunitaire du receveur vis-à-vis du donneur au décours d'une greffe d'organes et d'autre part d'analyser dans ce système le mécanisme d'action de l'effet immunosuppresseur exercé par l'administration d'anticorps dirigés contre la molécule d'adhésion LFA-1. Le travail réalisé a permis 1) de mettre au point ce modèle original en utilisant des souris transgéniques dont les lymphocytes T expriment un récepteur T pour l'antigène dirigé spécifiquement contre une molécule de classe I Kb et reconnu par un anticorps monoclonal anti-TCR-Tg (Désiré-1) 2) d'impliquer les cellules clonotypiques dans la médiation du rejet 3) de dégager quelques éléments concernant le mécanisme d'action de l'anticorps anti-LFA-1 : durant la phase post-opératoire immédiate, l'anticorps anti-LFA-1 inhibe d'une part la migration des cellules Des+ dans le greffon cardiaque et d'autre part vraisemblablement la transmission du signal à travers le récepteur T pour l'antigène (inhibition du signal 1) à moyen terme, i.e. 3 mois après la greffe, la tolérance observée n'est pas liée à une délétion des lymphocytes T alloréactifs. En revanche, il semble exister une modulation du récepteur T transgénique et surtout du récepteur CD8 sur ces cellules qui peut expliquer l'effet de tolérance observé. Enfin, il existe une hyporéactivité des cellules issues des souris tolérantes partiellement réactivable par l'IL-2, évoquant un mécanisme d'anergie. La part relative de ces deux mécanismes et leur relation (modulation Des/CD8 et anergie) reste à définir.

5 - Bernard DELBOSC - CHU Besançon

« *Appart des techniques de culture cellulaire à l'analyse du rôle immunologique des cellules endothéliales cornéennes humaines en allogreffe de cornée* »

Résumé :

Le but de ce projet était d'établir *in vitro* des cultures continues de cellules endothéliales cornéennes humaines afin de caractériser leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes, à l'aide :

- de marquages immunologiques
- de dosages de cytokines secrétées
- de co-cultures lymphocytaires.

Nous avons choisi comme méthodologie de référence celle de la seule équipe (Engelmann et coll) qui avait annoncé ses succès à obtenir des multiplications *in vitro* (4 à 5 passages) et des cultures à long terme de cellules endothéliales cornéennes humaines adultes. Nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés dans l'application de cette technique princeps : conditions de digestion enzymatiques trop drastiques, problèmes de viabilité cellulaire, matrice de culture inappropriée, etc. En introduisant des modifications successives, étape par étape, nous avons réussi à mettre en place un système de culture permettant d'obtenir de façon reproductible des cultures de cellules endothéliales cornéennes humaines pures, viables à long terme (jusqu'à 32 jours), provenant de donneurs adultes, voire âgés. Ces cellules ont été caractérisées par immunomarquage et microscopie électronique. Leur viabilité a été étudiée par une technique à l'alarmar bleu, mise au point au laboratoire. La multiplication cellulaire n'a jamais pu être observée, malgré l'addition dans le milieu de culture de facteurs de croissance tels que le bFGF, l'ECGS, le HGF, l'EGF utilisés seuls ou sur la base de leur action synergique. Nous n'avons donc jamais pu récolter un nombre de cellules suffisant pour réaliser toutes les études prévues, en particulier les co-cultures lymphocytaires. En conclusion, notre expérience nous amène à penser, comme de nombreux auteurs, que les cellules endothéliales humaines sont des cellules en fin de différenciation, soumises à un mécanisme d'apoptose particulier (en cours d'étude par une autre équipe). L'obtention de lignées continues ne sera probablement possible qu'à l'aide de techniques de génie génétique inabornables dans notre laboratoire.

Travail ayant confirmé les tentatives négatives d'autres équipes, et non publié pour cette raison.

6 - M.C CUTURI & Jean-Paul SOULILLOU - CHU Nantes

« *Analyse du répertoire des lymphocytes T infiltrant les greffons rejetés et tolérés. Etude du rôle des expansions monoclonales dans le rejet et la tolérance d'allogreffes* »

Résumé :

Malgré une augmentation croissante du nombre de transplantations d'organes réalisées chez l'homme, l'utilisation d'immunosuppresseurs reste le seul traitement réduisant l'incidence du rejet. De nombreux modèles expérimentaux ont été mis en place pour comprendre les mécanismes du rejet aigu d'allogreffe et mettre au point des protocoles d'induction de tolérance spécifique. Notre travail est basé sur un modèle d'allogreffe cardiaque histoincompatible chez le rat adulte. Une tolérance spécifique peut être induite par transfusion de sang du donneur avant la greffe, et ce travail a eu pour objectif d'étudier le rôle de la réponse T dans les mécanismes de l'effet transfusionnel. Nous montrons que les cellules T CD8⁺ du receveur sont indispensables à l'induction de la tolérance. A l'aide d'une vaccination ADN nu anti-TCR, nous mettons en évidence qu'un clone T, en particulier, portant au niveau de son TCR le réarrangement V β 18-DB1-J β 2.7 intervient. Cette étude souligne que la vaccination ADN est une méthodologie efficace pour manipuler de façon ciblée une réponse T *in vivo*, et constitue une stratégie nouvelle d'immunointervention spécifique en transplantation.

Vignes C, Chiffolleau E, Brouard S, Douillard P, Coudreuse D, Souillou JP, Cuturi MC. **Anti-TCR V β -specific DNA vaccination prolongs heart allograft survival in adult rats.** Eur J Immunol 2000 sept;30(9):2460-4.

Vignes C, Chiffolleau E, Douillard, Josien R ; Peche H, Heslan JM, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. **Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8⁺ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion.** J Immunol 2000 Jul 1;165(1):96-101.

7 - Anna SENIK - CNRS- Laboratoire d'Immunologie cellulaire et de Transplantation -UPR 420 - VILLEJUIF

« *Etude du mécanisme d'action d'un anticorps CD2 (LO-CD2a) destiné à prévenir le rejet aigu d'allogreffes rénales et à favoriser leur tolérance. Effet sur le cycle cellulaire et sur l'induction d'apoptose dans les lymphocytes T périphériques humains* »

Résumé :

Nous avons déjà montré que le récepteur CD2 pouvait ouvrir une voie d'apoptose directe, indépendante de la voie Fas. Les travaux présentés indiquent qu'un seul anticorps monoclonal anti-CD2, BTI-322 (Lo-CD2a), peut à lui seul, et à très faibles doses, induire la mort apoptotique de lymphocytes T activés à travers le CD3/TCR, épargnant les lymphocytes T au repos et ne les empêchant pas de réagir à des stimuli antigéniques. On peut donc penser qu'un tel anticorps prévient un rejet d'allogreffe *in vivo*. L'apoptose induite *via* CD2 nécessite l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. La mort cellulaire, qui n'est pas inhibée par les inhibiteurs de caspases à spectre large, est un phénomène ordonné, différent de la nécrose. Elle représente vraisemblablement un nouveau type de mort physiologique. Enfin, nous avons analysé le profil de cytokines secrétées par les lymphocytes T CD57⁺ qui circulent en grand nombre chez les receveurs

d'une allogreffe rénale. Il s'agit de cellules T anergiques de type Th1, incapables de sécréter de l'IL-2 lors d'une stimulation via le CD3/TCR, mais conservant la faculté de sécréter de l'INF γ et du TNF α .

Dumont C, Durrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kroemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A. **Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes : reversibility at low apoptotic insult.** Blood. 2000 Aug 1; 96(3): 1030-8

Dumont C, Déas O, Mollereau B, Hebib, C., Bernard, A., Hirsch, F., Charpentier, B., and A. Senik. «**Potent apoptotic signaling and subsequent unresponsiveness induced by a single CD2 MAb (BTI-322) in activated human peripheral T cells** » J.Immunol. 160: 3797-3804, 1998

Mollereau, B., Blanchard, D., Déas, O., Dumont, C., Métivier, D., Bernard, A., McGrew, J.T., Charpentier, B., Vazquez, A., and Senik, A. « **Relationship between proliferation and susceptibility to CD95- and CD2- mediated apoptosis in stimulated primary T lymphocytes. T cells manifesting proliferative unresponsiveness are preferentially susceptible to CD95-mediated apoptosis** ». J. Immunol. 159, 2668-2677, 1997

Hebib C., Leroy E., Rouleau M., Fornairon S., Métivier D., Hirsch F., Kroemer G., Legendre C., Senik A., and Charpentier B. « **Pattern of cytokine expression in circulating CD57+ T cells from long-term renal allograft recipients.** Transplant, Immunol., 6 : 39-47, 1998

8 - Pierre TIBERGHIEU - ETS Besançon

« *Greffe de cellules souches hématopoïétiques médullaires ou périphériques : étude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T présents dans le greffon in vivo après reconstitution hématopoïétique* »

Résumé :

Cette étude, initiée en juillet 1997 et terminée fin décembre 1998, a pour but de préciser l'impact de la mobilisation des cellules souches périphériques par le G-CSF sur les propriétés fonctionnelles des cellules T du donneur, en relation avec la survenue de la réaction du greffon contre l'hôte chez le receveur. Dix-sept centres de greffe, recrutant 60 patients, ont participé à cette étude. Les résultats préliminaires révèlent des différences quantitatives et qualitatives au niveau des sous-populations lymphocytaires des greffons, et montrent une reconstitution améliorée du pool de lymphocytes T après greffe de cellules souches périphériques. Des études complémentaires sont en cours sur les banques de sérums et de cellules réalisées à partir des prélèvements reçus. Ces travaux, présentés à plusieurs congrès, ont reçu le prix Eric ARCHIMBAUD de la Société Française de Greffe de Moelle et font l'objet de plusieurs articles soumis ou en préparation.

H. Tayebi, F. Kuttler, P. Saas, A. Lienard, B. Petracca, V. Lapierre, C. Ferrand, T. Fest, J.Y. Cahn, D. Blaise, M. Kuentz, P. Hervé, P. Tiberghien, E. Robinet. **Effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells.** Exp Hematol. 2001; 29: 458-470

H. Tayebi, P. Tiberghien, C. Ferrand, A. Lienard, A. Duperrier, J.Y. Cahn, V. Lapierre, P. Saas, M. Kuentz, D. Blaise, P. Hervé, E. Robinet. **Allogenic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early T cell compartment homeostasis than bone marrow transplantation.** Bone Marrow Transplantation 2001; 27: 167-175.

V. Lapierre, N. Oubouzar, A. Auperin, D. Tramalloni, H. Tayebi, E. Robinet, M. Kuentz, D. Blaise, O. Hartmann, P. Hervé, P. Tiberghien. **Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogenic transplantation.** Blood 2001; 97 (9):2580-6.

H. Tayebi, V. Lapierre, P. Saas, A. Lienard, L. Sutton, N. Milpied, M. Attal, J.Y. Cahn, M. Kuentz, D. Blaise, P. Hervé, P. Tiberghien, E. Robinet. **Enhanced activation of B-cells in a G-CSF-mobilised peripheral blood stem cell graft.** Br J Haematol. 2001; 114(3):698-700.

V. Lapierre, H. Tayebi, A. Auperin, J. Chabod, O. Hartmann, D. Tramaloni, N. Oubouzar, D. Blaise, M. Kuentz, E. Robinet, P. Tiberghien. **Increased incidence of anti-HLA immunization after G-CSF mobilized peripheral blood stem cell transplantation.** Blood 2002;74(4):537-40.

THÈME 4 : RECHERCHE CLINIQUE

1 - Pierre BORDIGONI - CHU Nancy

« *Etude prospective de prévention de la maladie aigüe du greffon contre l'hôte après greffe de moelle allogénique phéno-identique dans les hémopathies malignes de l'enfant* »

2 - Charles PROYE - CHU Lille

« *Traitement du diabète insulino-dépendant par la greffe d'îlots de Langerhans : évaluation de la greffe intra-portale itérative d'îlots allogéniques* »

3 - Eliane GLUCKMAN - CEA - PARIS

« *Evaluation des greffes de sang placentaire en France* »

Résumé :

Evaluation des résultats des greffes faites à partir de sang placentaire. Etude des facteurs de risque associés à la survie, au rejet et à la réaction du greffon contre l'hôte. Etablissement des critères de choix entre donneurs et receveurs. Mise en place d'un registre d'évaluation des greffes de sang placentaire. Elaboration d'un protocole prospectif des greffes non apparentées à partir de sang placentaire. Etude faite dans le cadre plus global de la Société Française de Greffe de Moelle.

*F. Locatelli, V. Rocha, C. Chastang, W. Arcese, G. Michel, M. Abecasis, C. Messina, J. Ortega, I. Badell-Serra, E. Plouvier, G. Souillet, JP Jouet, R. Pasquini, E. Ferreira, F. Garnier, E. Gluckman on behalf of Eurocord-Cord Blood Transplant Group. **Factors Associated With Outcome After Blood Transplantation in Children With Acute Leukemia.** Blood, Vol 93, N°11(june 1), 1999: pp3662-3671.*

RECHERCHES et GREFFE (1997)

THÈME 1 : RECHERCHE EN SCIENCES HUMAINES

1 - **Claire BOILEAU** - Université de Bordeaux II

« Recueil et greffes de cellules souches hématopoïétiques: de la nécessité thérapeutique aux enjeux identitaires et sociaux »

Résumé :

Recherche de type ethnographique sur les procédures de recueil et de greffe des Cellules Souches Hématopoïétiques d'origine médullaire, sang périphérique ou sang placentaire afin de mettre en évidence les implications psycho-sociales internes à ce type de thérapeutique. La recherche prendra en compte à la fois la nature et les modalités du don, les motivations, le contexte biomédical et les conditions socio-culturelles de la cession ou du don de cellules. Il s'agira de suivre « l'événement thérapeutique » dans sa totalité, de l'attente de la greffe du côté du donneur comme du receveur. Le sang placentaire étant peut-être un des modes de recueil appelé à se développer, il serait intéressant d'explorer la perception et les représentations culturelles qu'il soulève afin de faire apparaître les motivations ou les résistances rencontrées chez les femmes au moment même du don ou de la cession, mais aussi dans un deuxième temps, lors des examens sanguins au titre de la traçabilité et de la validation sanitaire des greffons.

2 - **Dominique THOUVENIN** - Université de Paris VII

« Le consentement présumé au regard des règles générales relatives aux présomptions et au consentement »

Résumé :

Ce projet se propose, en tenant compte de ce qui est dit sur le rôle du consentement en matière de prélèvement d'organes sur une personne décédée de montrer comment les règles juridiques en la matière organisent cette question. Pour ce faire, il s'appuie sur une étude fouillée du système des présomptions dans le droit français ainsi que des différentes fonctions imparties au consentement. Une telle démarche a pour objectif de comparer le système particulier du consentement présumé aux règles générales relatives aux présomptions et au consentement. L'hypothèse qui le sous-tend est la suivante : le consentement présumé visant à faciliter le prélèvement apparaît comme une règle favorisant la personne qui est en attente de greffe ; or, en principe, toutes les présomptions peuvent être contestées par celui à qui elles sont opposées. Mais la loi n'organise pas véritablement la possibilité d'une démonstration du désaccord de la personne prélevée, ce qui rend cette règle fragile. Il serait donc utile d'envisager des solutions qui ménagent la possibilité d'une discussion sur la preuve en cas de contestation.

3 - **Robert CARVAIS** - CNRS - Centre d'étude d'histoire - URA 2014

« Analyse de l'enquête nationale sur la greffe d'organe »

Résumé :

Le colloque multidisciplinaire sur « La greffe, le don et la société » organisé sous l'égide de l'EfG a mis en évidence la nécessité impérieuse de réaliser une enquête nationale sur la greffe. Le comité scientifique mis en place à l'occasion dudit colloque a eu la charge d'établir le questionnaire nécessaire à cette enquête. Celle-ci est en cours de passation auprès de l'Institut de sondage MV2. C'est l'analyse multidisciplinaire de cette enquête qui fait l'objet de la présente demande de contrat. Cette demande regroupe les projets proposés par quatre équipes distinctes appartenant à des unités de sciences humaines tant de l'INSERM que du CNRS.

4 - **Janine MARZOUK-SCHMITZ** - Collège de France

« Dons et contre dons dans le circuit des greffes »

THÈME 2 : EVALUATION & AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ DES GREFFONS

1- **Xavier MOREAU-GAUDRY** - Hospices Civils de Lyon

« Modélisation de la fonction rénale au cours du 1er mois après transplantation rénale. Application à l'évaluation des lésions d'ischémie-reperfusion et de molécules susceptibles d'en diminuer les conséquences ».

X. Moreau-Gaudry, R. Ecochard, J. Esteve, C. Pouteil-Noble. « **Use of logistic function to analyse delayed graft function in renal transplantation** ». Transplantation Proceedings, 30, 2807 (1998).

2 - **Francis OBERLING** - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

« Autogreffe de cellules souches périphériques après amplification ex vivo du greffon à l'aide d'un oligonucléotide antisens anti-TGFB chez des patientes atteintes d'un cancer métastatique. Protocole d'étude »

Résumé :

Ce projet préclinique a permis de montrer qu'il était possible d'augmenter *in vitro* le nombre de progéniteurs hématopoïétiques précoces en utilisant une courte durée d'expansion de cellules souches hématopoïétiques obtenues par cytophérèse (3 jours) par l'utilisation combinée de cytokines et d'antisens. La technique proposée permet de

soumettre un protocole clinique d'expansion où la durée de culture ex vivo est notablement raccourcie par rapport à certains essais publiés (10 – 12 jours), ce qui est un facteur d'intérêt majeur dans le cadre de la sécurité transfusionnelle (diminution de la mortalité cellulaire et du risque de contamination par des agents pathogènes). Cette prolifération est obtenue principalement par la mise en cycle de ces progéniteurs qui sont quiescents en majorité (98%) dans les concentrés obtenus. L'intérêt immédiat de pouvoir réaliser un essai clinique est de tester la faisabilité et la tolérance de ce type de traitement et d'étudier un éventuel raccourcissement de la durée d'aplasie post-greffe. Dans un second temps, ce type d'approche devrait permettre d'augmenter le rendement de transfections rétrovirales de cellules souches hématopoïétiques qui donnent des résultats mitigés en raison du caractère quiescent des cellules les plus primitives. De plus cette méthodologie ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine de l'immunothérapie où grâce à l'augmentation du pool des progéniteurs précoces une partie du greffon pourra être utilisée dans le cadre de la greffe traditionnelle tandis que l'autre partie du greffon pourra être différenciée en cellules présentatrices d'antigènes.

3 - **Christian CHABANNON** - Institut Paoli Calmettes- Marseille

« *Evaluation du rôle des cellules médullaires cultivées in vitro dans la reconstitution hématopoïétique succédant à l'administration de chimiothérapies intensives chez des patientes atteintes de cancer du sein* »

Christian Chabannon, Jean-Louis Blache, Isabelle Sielleur, Judith Douville, Catherine Faucher, Gwenaëlle Gravis, Christine Arnoulet, Sandrine Oziel-Taïeb, Didier Blaise, Gisèle Novakoviitch, Jacques Camerlo, Isabelle Chabert, Dominique Genre, Mike Appel, Doug Armstrong, Dominique Maraninchi, Patrice Viens

«**Production of ex vivo expanded hematopoietic cells and progenitors in a closed bioreactor, starting with a small volume marrow collection: A feasibility study in patients with poor-risk breast cancer and receiving high-doses of cyclophosphamide**» International Journal of Oncology 15: 511-518, 199

4 - **Christine DOSQUET** - Etablissement de Transfusion sanguine

« *Mise au point d'une thérapie cellulaire de la cicatrisation cutanée utilisant des fibroblastes allogéniques du derme* »

Résumé :

Les objectifs étaient : 1) la mise au point d'un système de culture des fibroblastes (F) du derme qui soit utilisable pour la thérapie cellulaire de la cicatrisation cutanée, 2) la caractérisation fonctionnelle des F du derme superficiel (DS) et du derme profond (DP). Les F du derme sont obtenus par explant de déchets cutanés opératoires de chirurgie plastique mammaire. La mise dans les conditions des bonnes pratiques de fabrication est en fin de mise en point. Les fonctions explorées des F du DS et du DP sont la production de facteurs de croissance (KGF, VEGF), de chimiokines (IL-8, MCP-1), de protéine de la matrice extra-cellulaire (expression du gène de la tropoélastine) et d'enzyme de remodelage (TIMP-1). La régulation de ces fonctions par les plaquettes sanguines a été étudiée, mettant en évidence une stimulation dose-dépendante des F du DS et du DP. Une telle étude fonctionnelle doit guider le choix de cellules à utiliser pour la thérapie cellulaire et permettre d'établir des critères de contrôle de qualité.

C. Dosquet, MP Jacob, P. Senet, E. Barthélémy, MC Coudert, C. Lebreton, M. Benbunan, E. Dubertret, B. Coulomb. « **Human platelets stimulate the production of angiogenic regulators by fibroblasts from papillary (PD) and reticular dermis (RD)** ». International Society of Blood Transfusion. Paris, 15-18.7.01.

5 - **René FERRERA** - INSERM- Unité 121 - BRON

« *Protection et évaluation des cœurs prélevés arrêtés en vue d'augmenter le nombre de greffons cardiaques. Intérêt d'un préconditionnement pharmacologique pendant le coma dépassé* »

R. Ferrera. « **Interest of analyse coronary resistance to assess heart graft before transplantation** ». 1998.

R. Ferrera, G. Hadour, J. Guidolet, G. Dureau. « **Protection of ischemic myocardium during reperfusion: effect of reperfusion flow** ». Arch Mal Coeur et Vaisseaux : 91, 468, 1998.

R. Ferrera. « **Possibility to transplant heart after 10 minutes of in situ warm ischemia** » (en preparation)

P. Montagna, P. Sante, R. Ferrera, J. Ossette, G. Hadour, C. Chatel, P. Mikaeloff, O. Jegaden. « **Brain death: myocardial consequences, an experimental study on pigs** ». G. Ital Cardiol 1997 Apr; 27(4):337-41.

THÈME 3 : IMMUNOLOGIE DES ALLOGREFFES

1 - **Anne CAMBON-THOMSEN** - CNRS – Centre d'Immunopathologie et de génétique humaine-UPR 8291 - TOULOUSE

« *Immunogénétique moléculaire et stratégie de recherche d'un donneur compatible en greffe de moelle allogénique : évaluation de l'utilité de marqueurs moléculaires microsatellites de la région HLA* »

Travail terminé - Rapport disponible.

Foissac A, Fort M, Clayton J, Abbal M, Raffoux C, Moine A, Bensa JC, Bignon JD, Mercier P, Cambon-Thomsen A. **Microsatellites in the HLA region : HLA prediction and strategies for bone marrow donor registries.** *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar; 33(1-2):491-2.

Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A. **Microsatellites in the HLA region: 1999 update.** *Tissue Antigens.* 2000 Jun; 55(6): 477-509.

2 - **Anne JANIN** - *Institut Universitaire d'Hématologie - Hôpital Saint-Louis-Paris*

« Recherche de marqueurs d'évolutivité dans les réactions du greffon contre l'hôte (GVH) chroniques digestives »

Daneshpouy M, Socie G, Lemann M, Rivet J, Gluckman E, Janin A. **Activated eosinophils in upper gastrointestinal tract of patients with graft-versus-host disease.** *Blood.* 2002 Apr 15;99(8): 3033-40

3 - **Delphine MOREL** - *Université de Bordeaux II*

« Hyperhomocystéinémie et dysfonctionnement chronique des greffons rénaux »

Résumé :

L'hyperhomocystéinémie est pratiquement constante chez le transplanté rénal. Or sa toxicité vis à vis des différents constituants des parois vasculaires est bien connue. Nous avons donc étudié l'impact rénal de l'hyperhomocystéinémie :

- In vivo. Les transplantés ayant, un an après greffe, l'atteinte histologique la plus sévère (endartérite fibreuse, rejet chronique, toxicité de la cyclosporine) sont ceux dont l'homocystéinémie est la plus haute, indépendamment de la créatinine ou de la cyclosporinémie.

- In vitro. En 1h, l'homocystéine entraîne une diminution significative de la surface des cellules mésangiales et des glomérules. Cet effet est d'autant moins réversible, spontanément ou sous l'influence du Nitro-prussiate de sodium, que la concentration en homocystéine est plus élevée et/ou le temps de contact plus long. Le contact prolongé avec l'homocystéine augmente la susceptibilité des cellules mésangiales à l'influence constrictive de la cyclosporine.

4 - **Pascale PAUL & Nathalie ROUAS-FREISS** - *C.E.A - PARIS*

« Rôle tolérogène de la molécule HLA-G du système majeur d'histocompatibilité humain : implications en transplantation »

Résumé :

Nos travaux sur l'étude du rôle tolérogène de la molécule HLA-G ont démontré cinq faits majeurs : (i) HLA-G exerce des fonctions immunotolérantes en inhibant les réponses cytotoxiques NK et lymphocytaires T ; (ii) HLA-G inhibe la réponse proliférative lymphocytaire mise en place au cours de réponses allogéniques mimant un modèle de transplantation entre deux individus histoincompatibles ; (iii) l'expression de HLA-G est induite par l'interleukine-10 et l'interféron à la surface des monocytes du sang périphérique ; (iv) HLA-G exprimé physiologiquement sur les cellules trophoblastiques joue un rôle dans la tolérance foeto-maternelle en inhibant l'activité cytotoxique des cellules NK de la decidua utérine ; et (v) HLA-G est exprimé lors de pathologies tumorales, permettant aux tumeurs d'échapper à l'action du système immunitaire. Sur la base de ces observations, nous avons initié des travaux sur les applications potentielles des fonctions de tolérance immunitaire de HLA-G en transplantation afin de déterminer si l'expression de HLA-G au niveau d'une greffe cellulaire allogénique ou xénogénique permettrait de limiter les mécanismes immuns de rejet de greffe. De plus, nous étudions l'expression « ectopique » de HLA-G au cours de transplantations (cœur, poumon, rein, foie) afin de définir si cette expression est corrélée à une meilleure acceptation de la greffe chez le receveur.

P.Paul, N.Rouass-Freiss, I.Khalil-Daher, P.Moreau, B.Riteau, F-A.Le Gal, M-F.Avril, J.Dausset, J-G.Guillet, E.D.Carosella « **HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance** » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4510-4515

P. Moreau, P. Paul, N. Rouass-Freiss, M. Kirszenbaum, J. Dausset, E.D. Carosella. « **Molecular and immunologic aspects of the non- classical HLA class I antigen HLA-G.Evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft** » *Am J Reprod Immunol.* 1998 Sept; 40(3): 136-144

E.D.Carosella, N.Rouass-Freiss, P.Paul, J.Dausset « **HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex** » *Immunol. Today.* 1999 Feb; 20(2):60-62. Review. No abstract available.

N.Rouass-Freiss, I.Khalil-Daher, B.Riteau, C.Menier, P.Paul, J.Dausset, E.D.Carosella « **The immunotolerance role of HLA-G** » *Semin. Cancer Biol.* 1999 Feb; 9(1):3-12. Review

I.Khalil-Daher, B.Riteau, C.Menier, C.Sedlik, P.Paul, J.Dausset, E.D.Carosella, N.Rouass-Freiss « **Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself** » *J.Reprod.Immunol.* 1999 Jul; 43(2):175-182.

F.Adrian-Cabestré, P.Moreau, B.Riteau, E.C.Ibrahim, C.Le Danff, J.Dausset, N.Rouass-Freiss, E.D.Carosella, P.Paul « **HLA-G Expression in Human Melanoma Cells: Protection from NK Cytolysis** » J Reprod Immunol.1999 Jul; 43(2):183-193

F.Adrian-Cabestré, S.Lefèbvre, P.Moreau, N.Rouass Freiss, J.Dausset, E.D.Carosella, P.Paul « **HLA-G expression: immune privilege for tumour cells?** » Semin Cancer Biol. 1999 Feb; 9(1):27-36. Review.

P.Paul, N.Rouass Freiss, E.D.Carosella « **HLA-G : une molécule de tolérance impliquée dans l'échappement des tumeurs à la surveillance immunitaire** » Path. Biol. (Paris).47(8):766-70.

THÈME 4 : XÉNOGREFFE ET XÉNOASSISTANCE

1 - **Ignacio ANEGON** - CHU de Nantes

« *Transplantation d'organes xénogéniques co-exprimant le CD 55 humain et une forme mutée-d'IKB β TaALPHA* »

2 - **Brigitte LEMAUFF** - CHU de Nantes

« *Mise au point d'une technique d'isolement d'îlots pancréatiques à partir de porc de 50-60 Kg* »

Résumé :

Notre programme visait à mettre au point au laboratoire une technique d'isolement d'îlots pancréatiques à partir de jeunes porcs (poids 50-60 kg) après prélèvement du pancréas en conditions chirurgicales.

Après laparotomie et pose d'une sonde de Gillot, le pancréas perfusé d'Euro-Collins est transféré au laboratoire. L'isolement est effectué par digestion de l'organe à 37°C dans des conditions statiques. Les résultats médiocres obtenus avec la collagénase de type XI ont été nettement améliorés par l'utilisation de Libérase-PI, permettant l'obtention d'environ 1700 îlots-équivalents/g de tissu (leq, taille μ m). Par contre la purification, même dans ces conditions de digestion ne permet pas de récupérer de façon reproductible plus de 50% des îlots qui de plus sont relativement fragmentés. Ainsi, les pertes après 24h de culture restent très importantes.

La préparation de grandes quantités d'îlots de bonne qualité à partir de jeunes porcs posent donc de nombreux problèmes. Si l'utilisation d'une bonne enzyme permet d'améliorer la digestion, la purification des îlots reste difficile. Un paramètre supplémentaire, à savoir le prélèvement chirurgical au lieu de l'exsanguination pourrait intervenir et mériterait d'être évalué.

Pas de publication

3 - **Jorge CARDOSO** - Université de Paris V

« *Perfusion ex-vivo de foie de porc dans deux modèles d'insuffisance hépatique aiguë. Optimisation du système de perfusion et détermination de conditions pour une assistance hépatique en clinique humaine* »

4 - **Jean GUGENHEIM** - Faculté de Médecine de Nice

« *Correction de l'insuffisance hépatique aiguë par transplantation d'hépatocytes isolés cryopréservés et encapsulés* »

Résumé :

Nous avons étudié la transplantation allo et xénogénique d'hépatocytes isolés encapsulés et cryopréservés sans immunosuppression. Les hépatocytes étaient macroencapsulés dans une fibre d'hydrogel anionique AN 69. Dans le modèle allogénique chez le rat dans la combinaison DA sur Lewis, les hépatocytes cryopréservés encapsulés étaient fonctionnels in vitro. De plus, la transplantation d'hépatocytes a permis de diminuer in vivo la mortalité d'une insuffisance hépatique aiguë provoquée par une hépatectomie à 95%. Dans le modèle xénogénique, des hépatocytes de porc ont été isolés, cryopréservés pendant un mois puis encapsulés dans la fibre creuse et transplantés dans la cavité péritonéale d'un rat Lewis pendant un mois. Les hépatocytes de porc ont survécu, sont restés différenciés et ont conservé leur activité fonctionnelle de synthèse d'urée et d'albumine.

Ce travail a généré deux mémoires de DEA de sciences chirurgicales et a été présenté oralement ou par affiche.

5 - **Bruno CLEMENT** - INSERM- Unité 456

« *Foie bioartificiel extracorporel aux fins de suppléance hépatique transitoire* »

M. Desille, L. Corcos, A. L'Helgoualc'h, B. Fremont, JP Champion, A. Guillouzo, B. Clément. **Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy.** Transplantation 1999, Nov. 27;68(10):1437-43.

M. Desille, B. Fremont, S. Mahler, Y. Malledant, P. Seguin, A. Bouix, Y. Lebreton, J. Desbois, JP Champion, B. Clément. **Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver.** Transplantation Proceedings 2001, Feb-March; 33(1-2):1932-4.

THÈME 5 : EPIDÉMIOLOGIE ET SANTÉ PUBLIQUE

1 - Denis CASTAING - Université de Paris-Sud

« La transplantation hépatique : Etude prospective longitudinale de la qualité de vie des patients »

2 - Norbert Claude GORIN - Association Claude Bernard - Paris

« Etude de l'influence de certains facteurs pronostiques sur le suivi à long terme des greffes de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement des leucémies aiguës »

Résumé :

In order to compare autologous bone marrow (BMT) and blood cells transplantation (BCT) in patients with acute myeloid leukemia (AML) in first remission (CR1), we retrospectively reviewed the data of 1393 patients registered to EBMT and undergoing either BCT (n=100), purged (n=252) or unpurged (n=104) BMT. Hematopoietic recovery was significantly quicker after BCT than after either purged or unpurged BMT. The 2-year leukemia free survival (LFS), relapse incidence (RI) and overall survival for the entire population of patients were 52+/-1%, 43+/-1% and 58+/-1% and were significantly influenced by FAB subtype (M3 versus over) and the intervals between diagnosis and CR1 or CR 1 transplant. After BCT, LFS and RI were 44+/-6% and 50+/-6% and did not differ significantly to that found for unpurged BMT (49+/-2% and 45+/-2%; p=NS). However, LFS (57+/-3%) and RI (37+/-3%) of patients undergoing purged BMT were significantly different from that found for BCT patients (p=0.01 and p=0.006). As some characteristics of patients undergoing BCT or purged BMT differed significantly (age, intervals between diagnosis and CR1 or CR1 transplant), the better outcome observed for purged BMT over BCT patients need to be prospectively investigated.

Yazid Belkhacemi, Myriam Labopin, Jean-Paul Vernant, Hans G.Prentice, André Tichelli, Anton Shattenberg, Marc A.Bougaerts, Peter Ernst, Aldo Della Volpe, Anthony H.Goldstone, Jean-Pierre Jouet, Leo F.Verdonck, Anna Locasciulli, Bernard Rio, Mahmoud Ozsahin, Norbert C.Gorin « **Cataracts after total body irradiation and bone marrow transplantation in patients with acute leukemia in complete remission : a study of the European group for blood and marrow transplantation** » Int J.Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 41, No 3 : 659-668.

JY Cahn, M. Labopin, J. Sierra, D. Blaise, J. Reiffers, A. Ferrant, L. Bergmann, G. Visani, J. Cornelissen, T. De Witte, A. Bosi, F. Frassoni, NC Gorin. **No impact of high-dose cytarabine on the outcome of patients transplanted for acute myeloblastic leukaemia in first remission. Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).** Br. J. Haematol 2000, Aug; 110(2):308-14

F. Frassoni, M. Labopin, R. Powles, JY Mary, W. Arcese, A. Bacigalupo, D. Bunjes, E. Gluckman, T. Ruutu, U.W. Schaefer, J. Sierra, JP Vernant, R. Willemze, Theo de Witte, NC Gorin. **Effect of center on outcome of bone-marrow transplantation for acute myeloid leukaemia.** The Lancet, 22 April 2000, Vol.355, N°9213

J. Reiffers, M. Labopin, M. Sanz, M. Korbling, D. Blaise, J. de la Rubia, NC Gorin. **"Autologous blood cell vs marrow transplantation for acute myeloid leukemia in complete remission: an EBMT retrospective analysis"**. Bone Marrow Transplant 2000 Jun; 25(11): 1115-9

RECHERCHE et GREFFE (1998)

THÈME 1 : RECHERCHE EN SCIENCES HUMAINES

1 - **Christian HERVE** - *Université de Paris V*

« *Prélèvements d'organes et paradoxe de la communication* »

Résumé :

Les difficultés à disposer d'organes en vue de transplantation en France, malgré une organisation et une communication active, pourraient partiellement reposer sur un paradoxe de la communication. Les principaux facteurs de non prélèvement sont l'absence de proposition par les médecins, et le refus des proches. L'hypothèse sur laquelle repose ce projet est qu'il existe une inadéquation entre le contenu du discours médical, le contexte dans lequel il est tenu lors des situations de prélèvement potentiels, et la perception du « don » d'organes véhiculé par les médias. La confusion qui en résulte pour les proches, et parfois pour les professionnels, peut mener à l'absence de proposition ou à un refus de prélèvement. L'objectif de cette étude est d'analyser le contenu de l'information médiatique à propos des prélèvements, de le confronter avec les données culturelles et anthropologiques françaises sur la mort. De plus, l'hypothèse d'un paradoxe de la communication sera analysée par une étude portant sur l'attitude des professionnels (anesthésistes) confrontés aux situations de demandes de prélèvement, d'une part à l'aide d'entretiens semi directifs incluant des coordonateurs de centres de prélèvement, et d'autre part en envoyant un questionnaire anonyme aux anesthésistes et réanimateurs, afin de définir les difficultés liées à une inadéquation entre l'organisation « théorique » d'un prélèvement, et la pratique médicale. Ce travail devra fournir des propositions permettant une meilleure adaptation au contexte social et affectif des situations de prélèvement, tant pour les professionnels que pour les familles.

2 - **Jean-Christophe GALLOUX - Hélène GAUMONT-PRAT** - *Université Versailles St Quentin*

« *Problèmes juridiques et éthiques liés aux xénogreffes* »

3 - **Philippe CHAVOT** - *Université Louis Pasteur*

« *Entre savoirs et confiance : médiation et crise de la transplantation en France* »

Résumé :

Ce projet vise à étudier l'évolution des représentations publiques de la transplantation, en questionnant et en mettant en rapport le discours de différents types d'acteurs : les publics, les journalistes, les médecins généralistes, les associations et, enfin, les médecins transplantateurs. Trois questionnements sont à la base de ce projet. En premier lieu, il faut interroger la façon dont les médias mettent en scène la transplantation et contribuent à former des représentations faisant exister la crise. Dans ce cadre, il importe d'étudier l'évolution du discours des médias concernant les pratiques et l'institution biomédicales. En deuxième lieu, il faut comparer les représentations (scientifiques et culturelles) du corps offertes par les médias à celles (plus individuelles, et constamment retravaillées) du public. En effet, la crise de la transplantation ne tiendrait-elle pas à un oubli de la dimension symbolique du corps, par les scientifiques et les médias ? Enfin, toute étude des représentations de la science et du corps se doit désormais de prendre en compte les réaménagements actuels du partage et du savoir. Celui-ci ne se diffuse plus d'un émetteur, détenteur de l'autorité du savoir, vers un public passif. Il convient donc d'étudier le rôle de médiateur joué tant par les médecins généralistes, les associations, que les médecins transplantateurs. La mise en relation de ces trois niveaux devrait permettre d'apporter des éléments de réponse au problème de la représentabilité de la transplantation : une reconsidération des modalités du partage du savoir ouvrirait, telle est notre hypothèse, sur la restauration de la confiance envers le système biomédical.

THÈME 2 : EVALUATION & AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ DES GREFFONS

1 - **Jean-Luc DESCOTES** - *Université J. Fournier - Grenoble*

« *Cryopréservation des vaisseaux sanguins : test de viabilité et prototypes d'appareillages associés à la vitrification* »

2 - **René FERRERA** - *Inserm Unité 121 - Bron*

« *Transfection génique expérimentale du greffon cardiaque. Evaluation par la tomographie d'émission de positons* »

Résumé :

L'objectif de ce projet est de valider une méthode permettant d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité des transferts de gènes au niveau cardiaque. La méthode consiste à transfecter le gène de la thymidine kinase herpétique (Tkh) comme gène « reporteur » sur des cardiomyocytes en culture puis sur cœur isolé perfusé. L'efficacité de transfert Tkh sera évaluée par tomographie d'émissions de positons (TEP) grâce à l'injection de ganciclovir marqué au fluor 18 ([¹⁸F]-FHPG). Cette molécule est spécifiquement phosphorylée par la Tkh et reste alors stockée dans la cellule transfectée. Ce projet devrait nous permettre d'établir l'intérêt de la TEP au ([¹⁸F]-FHPG) comme méthode d'évaluation de l'efficacité des transferts de gènes dans le système cardio-vasculaire.

Dans un 2^{ème} temps, il sera envisagé de coupler le gène Tkh au gène de la superoxide dismutase (SOD) et au gène HSP (codant pour une protéine de choc thermique). Après contrôle de l'efficacité des transfections Tkh-SOD et Tkh-HSP par la TEP, nous tenterons d'évaluer la contribution de ces gènes à la protection myocardique sur 2 modèles précliniques : i)

cœurs transfectés soumis à une séquence d'ischémie-reperfusion, ii) greffons cardiaques transfectés et transplantés en position orthotopique.

3 - Eliane GLUCKMAN - Association pour la Recherche des transplantations médullaires - Paris
« Etude du métabolisme des télomères lors de la reconstitution d'une hématopoïèse post-greffe »

Résumé :

La longueur des télomères et l'activité de la télomérase sont des déterminants de la stabilité chromosomique et de la capacité de prolifération cellulaire. Dans les cellules hématopoïétiques, la longueur des télomères se réduit progressivement avec l'âge (foie fœtal > cordon > moelle osseuse (jeune > âgé)). Le modèle de souris KO-télomérase a montré que la réduction de capacité des cellules hématopoïétiques à former des colonies apparaît après réduction de la longueur des télomères en raison de l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose due à l'instabilité chromosomique. Cette corrélation entre réduction de la taille des télomères et mort cellulaire par apoptose est aussi observée après chimiothérapies. Nous l'avons également montré dans la maladie de Fanconi. Trois groupes ont montré début 1998 un raccourcissement des télomères à l'issue des greffes de moelle. Les cellules du receveur montrent en moyenne un raccourcissement correspondant à un vieillissement de 10 à 15 ans. L'âge du donneur et le nombre de cellules infusées semblent être des facteurs associés à un vieillissement supplémentaire. Ces données suggèrent une capacité limitée des cellules souches hématopoïétiques à l'auto-renouvellement. Nous documenterons la cinétique de raccourcissement post-greffe des télomères. D'autres facteurs pouvant influencer le vieillissement des cellules hématopoïétiques infusées seront étudiés : la GVH, les infections, la disparité HLA, le type de cellules infusées (CB/PBMC/BM ; CD34+), l'adjonction de facteurs de croissance. La recherche d'une relation de causalité entre la taille des télomères et la présence d'une hématopoïèse de stress (mesures d'activité télomérase) ou de leucémies secondaires sera faite. Le but est l'obtention de facteurs objectifs d'analyse des différents protocoles de greffe en cours, cordon après expansion inclus.

4 - Thierry HAUET- Laboratoire de Chirurgie expérimental - INRA - Surgères

« Effet de la trimétazidine sur les lésions d'ischémie - reperfusion hépatique après 24 heures d'ischémie froide chez le rat wistar »

Résumé :

Malgré les améliorations des moyens de préservation, les dysfonctions précoces des greffons hépatiques restent une cause majeure d'échec. L'ischémie froide exacerbe les effets du stress oxydatif au niveau des cellules hépatiques. Les données récentes démontrent que la base du processus lésionnel est liée à une perte de fonction mitochondriale et à des perturbations de l'homéostasie cellulaire en particulier du métabolisme calcique. La voie des molécules protectrices de l'ischémie et du métabolisme cellulaire constitue une piste sérieuse. Nous avons étudié l'effet de la trimétazidine (TMZ), molécule protectrice de l'ischémie dans des modèles d'ischémie froide (48 h de conservation dans la solution Euro-Collins (EC) et dans la solution University of Wisconsin (UW) sur le rein isolé perfusé de porc Large White et de rat Wistar. Nos conclusions démontrant que la TMZ diminue les effets délétères de l'ischémie-reperfusion. Dans ces modèles, la récupération du Ph intracellulaire est plus rapide durant la reperfusion avec une meilleure protection de la mitochondrie et du métabolisme cellulaire. Ces résultats sont associés à une meilleure reprise fonctionnelle des reins et une diminution des lésions histologiques. Nous voulons vérifier si la TMZ est également efficace contre l'ischémie reperfusion hépatique. L'étude se fera avec un modèle de foie perfusé de rat conservé pendant 24h dans EC ou dans UW avec ou sans TMZ. L'étude de fonction se fera par la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et concernera l'évolution de métabolites tels que le triméthylamine, l'alanine, le benzoate ou l'arginine. Elle portera également sur l'aspect histologique et sur la mesure des résistances vasculaires pendant la reperfusion.

THEME 3 : IMMUNOLOGIE DES GREFFES

1 - Antoine TOUBERT - INSERM Unité 396 - Hôpital Saint-Louis - Paris

« Etude du répertoire lymphocytaire T après greffe de moelle intrafamiliale HLA-A2 identique : corrélations avec le statut clinique et le typage de l'antigène mineur d'histocompatibilité HA-1 »

Talvensaari K, Clave E, Douay C, Rabian C, Garderet L, Busson M, Garnier F, Douek, Gluckman e, Charron D, Toubert A. **A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation.** Blood. 2002 Feb 15; 99(4):1458-64.

Toubert A, Charron D. **Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: gaining experience without losing naivety.** Hum Immunol. 2001 May; 62(5):500-3.

Toubert A, Clave E, Talvensaari K, Douay C, Charron D. **New tools in assessing immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation.** Vox Sang. 2000;78 Suppl 2:29-31.

2- Jean-Charles GUERY - INSERM Unité 28 - Purpan

« Régulation de l'induction des lymphocytes CD4 de type TH2 dans les manifestations immunopathologiques induites par des interactions allogéniques »

Foucras G, Coudert J, Coureau Ch, Guéry JC. **Dendritic cells prime in vivo alloreactive CD4 T lymphocytes toward type 2 cytokine and TGF- β -producing cells in the absence of DC8 T cell activation.** The Journal of Immunology, 2000, 165: 4994-5003.

Coudert J, Foucras G, Demur C, Coureau Ch, Mazerolles C, Delsol G, Druet Ph, Guéry JC. **Lethal host-versus-graft disease and hypereosinophilia in the absence of MHC I-T-cell interactions.** The Journal of Clinical Investigation, April 2000, Volum 105, Number 8.

3 - Jean-Claude AMEISEN - Université de Paris VII

« Exploration dans des modèles murins du rôle de la mort cellulaire programmée (apoptose) dans la pathogénèse et la prévention des réactions de greffons contre l'hôte (GVH) »

Résumé :

Ce projet, qui a bénéficié en 1999 d'une subvention de l'Etablissement français des Greffes, a été développé autour de deux axes principaux :

- 1) L'exploration, dans des modèles murins, des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la GVHD, et en particulier dans l'induction des phénomènes de mort cellulaire (apoptose) dans les tissus cibles du receveur, et
- 2) L'exploration de stratégies thérapeutiques expérimentales fondées sur la modulation des phénomènes d'apoptose dans le but de prévenir dans ces modèles l'induction des lésions de GVHD.

Janin A, Deschaumes C, Daneshpouy M, Estaquier J, Micic-Polianski J, Rajagopalan-Levasseur P, Akarid K, Mounier N, Gluckman E, Socie G, Ameisen JC. **CD95 engagement induces disseminated endothelial cell apoptosis in vivo : immunopathologic implications.** Blood 2002 Apr 15 ; 99(8) : 2940-7.

4 - Anna SENIK - CNRS - UPR 420 - Villejuif

« Prévention du rejet d'allogreffes humaines chez la souris SCID-hu par induction, à travers la molécule CD2, de mort apoptotique des lymphocytes T alloréactifs »

5- Diane DAMOTTE - Hôpital Necker Enfants Malades - Paris

« Etude de l'interaction précoce des cellules immunitaires et des cellules endothéliales : Peut-on prédire le rejet chronique ? »

Résumé :

Le pronostic à long terme d'un organe transplanté est dépendant du rejet chronique. Les lésions histologiques du rejet chronique sont une endartérite fibreuse, une fibrose tissulaire et une atrophie des structures épithéliales. De nombreuses études suggèrent que les lésions de rejet chronique débutent précocement, au moment de la transplantation ou des épisodes de rejet aigu. Notre hypothèse est que le rejet chronique est la conséquence d'une interaction entre les cellules T cytotoxiques et les cellules endothéliales avec expression de cytokines Th1 et des marqueurs impliqués dans la mort et la prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses de la paroi vasculaire. Pour démontrer notre hypothèse, nous allons étudier *in situ* par immunohistochimie, histoenzymologie et RT-PCR cette interaction cellulaire. Nous allons phénotyper les cellules, étudier l'apoptose par une méthode histoenzymologique, l'expression protéique des gènes A20, bcl-2, bcl-x_L, hemoxygénase, bax et NF-kB. L'étude va comparer des patients transplantés rénaux avec et sans rejet chronique à 10 ans. Pour l'étude pendant le premier mois après greffe qui paraît primordial, nous allons étudier en parallèle un groupe de patients transplantés intestinaux avec et sans rejet aigu au cours du premier mois. Sur la base de nos résultats nous envisagerons un essai thérapeutique permettant d'adapter l'immunosuppression au risque de rejet chronique.

6- Hélène LEVREY - Université Claude Bernard - Lyon

« Inhibition des lésions de bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire à l'aide de peptides de fibronectine dans un modèle expérimental animal »

7 - Vincent BORDERIE - Etablissement de Transfusion sanguine - Hôpital Saint-Antoine

« Cross-match tissulaire immunohistochimique de flux en western-Blot avant allogreffe de cornée : rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité dans le rejet »

Résumé :

Bien que la cornée bénéficie d'un privilège immunologique lié à son caractère avasculaire, le rejet reste la première cause d'échec de greffe de cornée. Nous avons mis au point une technique de **cross-match tissulaire** en incubant la collerette cornéo-sclérale du greffon avec le sérum du receveur. Des *IgM dirigées contre le stroma du greffon* ont été retrouvées chez certains receveurs. Ces anticorps semblent associés à un risque majoré de rejet irréversible. Dans une étude portant sur 100 greffes de cornée consécutives, la survie sans rejet a été significativement meilleure chez les receveurs n'ayant pas de marquage intense des lamelles de collagène de la cornée que chez ceux en ayant un. L'étape suivante de l'identification de ces anticorps préformés est l'analyse en *Western Blot* et en *cytométrie de flux*. L'objectif du projet est double : 1) Identifier chez le receveur les anticorps préformés dirigés contre des antigènes mineurs d'histocompatibilité exprimés par la cornée du donneur et associés à un risque plus important de rejet. 2) Obtenir une technique non invasive de diagnostic biologique du rejet en recherchant dans les larmes du receveur des anticorps

néoformés dirigés contre des antigènes exprimés par la cornée du donneur. Ce travail de recherche comporte deux phases successives : un travail *in vitro* à partir des sérums et tissus antérieurs et une *étude clinique*. Il devrait permettre d'améliorer la prévention et le traitement du rejet (par un diagnostic précoce) chez les receveurs à haut risque de rejet.

8 - **Manuel LOPEZ** - *Faculté de Médecine Saint- Antoine - Paris*

« *Bases expérimentales de transplantations de cellules stromales humaines génétiquement modifiées* »

9 - **Philippe WOLF** - *Laboratoire de Chirurgie Expérimentale – Université Louis Pasteur – Strasbourg*

« *Prévention du rejet d'hépatocytes allogéniques dans un modèle d'insuffisance aiguë chez le rat. Transfection avec des adénovirus codant pour l'interleukine-10, le TGF β et le récepteur au TNF α* ».

Kaulek V, Saas P, Alexandre E, Grant H, Richert L, Jaeck D, Tiberghien P, Wolf P, Azimzadeh A. **Comparative phenotype and immunogenicity of freshly isolated and immortalized rat hepatocytes**. *Cell Transplant*. 2001; 10(8): 739-47.

THÈME 4 : XÉNOGREFFE ET XÉNOASSISTANCE

1 – **Philippe POUILLART** - *Institut Supérieur Agricole de Beauvais*

« *Optimisation d'un greffon cardiaque de xénodonneur porcin : étude anatomique fonctionnelle et anatomopathologique selon l'âge du donneur et son alimentation* »

Résumé :

A l'heure où les résultats de la recherche valident les espoirs de réussite de la xéno greffe cardiaque à partir de porcs génétiquement modifiés (OGM), notre département a engagé depuis 1997 une réflexion sur les moyens dont devait se prémunir la filière « production de xénotransplants cardiaques porcins », pour proposer un greffon aux performances biomédicales standardisées. Nous proposons d'étudier la fonction cardiaque selon l'âge du donneur et la présence d'éléments athérogènes ou non dans son alimentation, sur le porc non OGM. Par la méthode non-invasive d'échographie transoesophagienne multiplan (ETO), nous devons suivre tout d'abord la croissance morphométrique du système cardiovasculaire et le potentiel fonctionnel hémodynamique du xénodonneur porcin en fonction de son stade physiologique. Nous souhaitons ainsi obtenir un index prédictif d'adéquation anatomo-physiologique du greffon par rapport à l'âge du receveur en transplantation pédiatrique ou adulte. L'essentiel de notre étude portera ensuite sur la prévention des risques valvulo-coronariens de dégénérescence précoce pré-transplantationnelle ou de sténose post-transplantationnelle. Nous devons étudier l'effet de l'introduction du lin, riche en acide alpha-linolénique, dans l'alimentation des animaux xéno-donneurs. Cette matrice alimentaire, potentiellement athéroprotectrice, sera comparée à un aliment de référence, potentiellement athérogène. L'étude anatomique et fonctionnelle par ETO est complétée par des investigations anatomopathologiques sur les tissus cibles.

2 - **Béatrice CHARREAU** - *Unité INSERM 437 - Nantes*

« *Etude de l'activation des cellules endothéliales xénogéniques par le plasma et les leucocytes de patients insuffisants rénaux hyperimmunisés* »

Résumé :

Par l'étude des sérums de cinq patients insuffisants rénaux hyperimmunisés nous avons tout d'abord montré que ces patients ne possèdent quantitativement pas plus d'anticorps naturels dirigés contre l'épitope xénogénique Gal α 1-3Gal qu'un panel de donneurs sains. Cette observation indique que l'immunisation de ces patients ne constitue pas un obstacle majeur pour une xéno greffe. Pour certains de ces patients, nous avons observé une réactivité croisée des anti-HLA, tout du moins de classe I, avec les SLA de classe I portés par l'endothélium porcin non activé. Cette interaction n'induit pas la prolifération des cellules endothéliales porcines et n'induit pas l'expression de la cytokine IL1 alpha par l'endothélium porcin. Le développement d'un modèle animal pour l'étude des interactions anticorps-endothélium nous a permis d'observer l'induction de l'expression de la E-sélectine, Rantes, TIMP-1, IL alpha, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et ADAM-10 dans le rein des rats traités par un pool de sérum humain normal ou déplété en anti-Gal.

Nous avons également mis en place des outils importants pour l'étude de l'activation endothéliale tant *in vitro* que *in vivo* (isolement des cellules endothéliales issues de porcs transgéniques pour le DAF, production de rats transgéniques pour le DAF humain, clonage de l'ADNc codant pour ICAM-2 de rat, RT-PCR quantitative (TaqMan[®]) qui devraient nous permettre de poursuivre l'étude des interactions anticorps-endothélium dans des conditions expérimentales proches de celles retenues pour les essais de xéno greffes d'organes de porc chez le primate.

1 - Edgar MENGUY - CHU ROUEN

« Réseau régional qualité-greffe : Analyse des conditions de mise en place d'une démarche qualité sur l'activité de prélèvements »

Résumé :

L'objectif global du projet est la prise de conscience de l'importance de cette activité et la mise en place de procédures formalisées visant à répondre aux besoins sanitaires de la région, aux exigences éthiques, morales, médico-légales et économiques du prélèvement, au respect et à l'accueil des familles de donneurs et au résultats fonctionnel optimum des transplantations réalisées. Ce projet se fixe égale l'objectif de pouvoir être transposé à d'autres régions qui pourraient le réutiliser pour suivre une démarche identique. Les actions nécessaires à la réalisation du projet seront des apports importants à la pratique dans la région. Ainsi il faut prévoir : i) de définir les étapes du processus du prélèvement d'organes, ii) de constituer les référentiels, iii) d'établir des procédures et les diffuser en utilisant en particulier le support Internet, iv) de définir des critères et des indicateurs de qualité, v) de décrire un système de suivi de la démarche, vi) d'identifier les facteurs de résistance et de réussite de la politique de prélèvements en Haute-Normandie, vii) de valider les différentes étapes par une expérimentation sur la région Haute-Normandie

2 - Catherine CORDONNIER - Université de Paris VII

« Analyse des interactions cellulaires et moléculaires entre conidies d'*Aspergillus fumigatus* et cellules épithéliales des voies aériennes respiratoires humaines »

Résumé :

L'aspergillose invasive est une infection souvent létale, acquise par voie aérienne par inhalation de spores en suspension dans l'air. Les mécanismes par lesquels *Aspergillus* peut, dans certaines conditions, en particulier chez les sujets immunodéprimés, échapper au système de surveillance de l'épithélium bronchique, ne sont pas connus avec précision. L'objectif de ce projet est l'étude des interactions cellulaires et moléculaires entre conidies d'*Aspergillus fumigatus* et les cellules de l'épithélium respiratoire. Nous avons d'abord établi un modèle d'étude à partir de cultures d'épithélium de polypes nasaux en interface air/liquide, modèle présentant d'une part l'avantage d'une différenciation cellulaire, en particulier ciliée, très proche des conditions in vivo, et d'autre part celui de reproduire la situation réelle de la colonisation aspergillaire vis à vis des cellules épithéliales, c'est à dire sans immersion. Puis nous avons montré qu'*A. fumigatus*, et non *A. niger* ou *P. chrysogenum*, altérerait les propriétés fonctionnelles des cellules épithéliales en modifiant leurs résistances transépithéliales et leurs différences de potentiel. En l'absence de modifications ultrastructurales des jonctions intercellulaires, ces altérations évoquent avant tout un trouble du transport ionique dont nous explorons le mécanisme. Nous projetons d'étudier l'expression et l'effet de facteurs de croissance et de cytokines dans ce modèle, et de tester certaines molécules antifongiques dans différents vecteurs, sur l'épithélium respiratoire.

3- Véronique BAUDOIN - Hôpital Robert Debré - Paris

« Etude comparative de la charge virale EBV et du statut immunologique chez l'enfant après transplantation d'organes. »

Résumé :

Le rôle de l'EBV dans le développement des syndromes lymphoprolifératifs après transplantation est bien établi. Les modifications de la réponse immunitaire anti-EBV jouent probablement un rôle facilitant dans le développement des syndromes lymphoprolifératifs EBV-induits après transplantation. Ces modifications ne sont pas bien identifiées à l'heure actuelle. Cette étude a pour objectif l'identification de critères biologiques quantitatifs et/ou qualitatifs de déficience de l'immunité anti-EBV après transplantation d'organe. Ces critères seront analysés comparativement à la charge virale EBV cellulaire et plasmatique. Il s'agit d'une étude prospective, non randomisée, ouverte, multicentrique, concernant 20 enfants suivis avant et après transplantation rénale ou transplantation intestinale ou hépato-intestinale. Les paramètres étudiés seront :

- immunologiques (phénotypages lymphocytaires par analyse en cytométrie de flux, cytotoxicité T-CD8 spécifique anti-EBV par test de cytolysse, étude de la sécrétion d'IFN γ par technique de RT-PCR semi-quantitative et cytométrie de flux, étude de la fonctionnalité des T-CD4 et exploration de la cytotoxicité médiée par Fas-FasL.)
- virologiques (profil sérologique EBV par le dosage des anticorps anti-VCA (IgG et IgM), anti-EBNA et anti-EA, par une technique immunoenzymatique utilisant un kit commercial (Biorad), quantification de la charge virale EBV cellulaire et plasmatique, par technique Taqman).

Un statut déficient sera défini par l'observation d'une réponse immunitaire anti-EBV basse ou indétectable associée à une charge virale importante chez certains malades contrastant avec des réponses immunitaires intenses et associées à une charge virale faible chez d'autres malades. La détermination de tels critères est un préalable indispensable à une étude élargie visant à établir des critères virologiques et immunologiques prédictifs de l'apparition d'un syndrome lymphoprolifératif après transplantation.

4 - Renée KRIVOSIC - CHRU Lille

« Evaluation de l'activité de recensement de la mort encéphalique dans la région Nord-Pas-de Calais : Etude pilote au CHRU de Lille »

RECHERCHE et GREFFE (1999)

THÈME 1 : RECHERCHE EN SCIENCES HUMAINES

1 – **Philippe PAMART** – *CH de Cambrai*

« *Le prélèvement de cornée et son acceptation : évaluation du rôle du médecin de famille* »

Résumé :

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'intégration du médecin de famille dans le cadre d'un projet de prélèvement de cornées au sein d'un établissement hospitalier préleveur. En effet, en cas d'hésitations de la famille, et ce malgré l'intervention des médecins hospitaliers concernés et formés, notamment le médecin-coordonateur hospitalier, la participation à la réflexion du médecin traitant augmente-t-elle l'acceptation familiale ? L'étude s'attachera dans un premier temps à évaluer les connaissances des médecins traitants de la région sanitaire vis-à-vis des prélèvements et greffes d'organes, et en particulier les cornées. Dans un second temps, un réseau de confrères volontaires sera établi et une évaluation en termes de bénéfice d'une telle collaboration pourrait être chiffrée.

THEME 2 : EVALUATION ET AMELIORATION DE LA QUALITE DES GREFFONS

1 – **Françoise NOROL** – *INSERM U362*

« *Détermination dans un modèle de transplantation autologue chez le primate non humain de la dose seuil de progéniteurs hématopoïétiques amplifiés ex vivo assurant la reconstitution hématopoïétique à court et à long terme* »

Résumé :

Le but de notre recherche est d'évaluer si l'expansion ex vivo des cellules hématopoïétiques autorise la constitution d'un greffon permettant une récupération hématopoïétique après irradiation létale en amplifiant des cellules recueillies en nombre initialement insuffisant pour assurer cette reconstitution. Le problème, dans ce contexte, est de déterminer si la technique d'expansion permet une réelle amplification des cellules primitives responsables de la reconstitution à long terme et d'évaluer la dose minimale de cellules amplifiées assurant la reconstitution à court et long terme. Le projet sera réalisé dans un modèle d'autogreffe chez le babouin (n=15), primate proche de l'homme. Les cellules hématopoïétiques sanguines seront prélevées après mobilisation par Endoxan (100mg/kg) et G-CSF (40 µg/kg/jour) et le conditionnement à la greffe comportera une irradiation corporelle totale à la dose de 10 Gy fractionnée. Les animaux recevront un greffon de cellules amplifiées ex vivo obtenues par culture de cellules CD34+ en présence de FLT-3 ligand, SCF, TPO et IL-3 pendant 6 jours ; une culture sur cellules stromales autologues pourra être réalisée en fonction des données d'études préliminaires. Les cellules, avant et après amplification, seront identifiées au moyen de différents tests in vitro, cytométrie de flux, étude des progéniteurs clonogéniques (LTC-IC, CFU-GM, CFU-MK) et injection à la souris NOD-SCID. Différentes doses de cellules amplifiées seront administrées. L'évaluation portera sur la récupération hématopoïétique (globules blancs, globules rouges et plaquettes) à court et long terme (6 mois). La dose minimale de cellules hématopoïétiques amplifiées assurant la reconstitution sera déterminée de même que le ou les tests in vitro corrélant le plus directement avec cette reconstitution à court et long terme. Outre l'intérêt fondamental de la question de la capacité de l'expansion *in vivo* à amplifier les cellules hématopoïétiques primitives, cette étude est susceptible d'applications cliniques directes.

2 – **Philippe HERNIGOU** - *Hôpital Henri Mondor Créteil*

« *Evaluation d'un protocole d'expansion in vitro du potentiel ostéogénique de la moelle osseuse* »

Résumé :

L'objectif principal est d'étudier in vitro l'expansion d'ostéoblastes à partir d'échantillons de moelle osseuse humaine de 2 ml en présence d'un facteur de croissance. L'hypothèse de départ est la suivante : l'expansion d'ostéoblastes à partir de cultures de moelle osseuse peut être accélérée par des facteurs de croissance. Compte-tenu du fait que l'injection de moelle osseuse est un outil thérapeutique permettant de traiter les pseudarthroses, si cette hypothèse se vérifie in vitro, l'étape clinique suivante pourrait être l'injection percutanée de moelle osseuse autologue en association avec un facteur de croissance afin d'obtenir une amélioration de l'effet ostéogénique dans le traitement des fractures et en particulier des pseudarthroses. Sur le plan méthodologique, la moelle humaine nécessaire à l'étude in vitro sera obtenue en prélevant 2 ml sur les 150 à 300 ml qui sont utilisés à des fins thérapeutiques. A partir de cette moelle osseuse, des cultures in vitro d'ostéoblastes et de fibroblastes seront effectuées en présence ou en l'absence de facteur de croissance. Le critère de jugement sera l'effet du facteur de croissance sur le nombre de colonies obtenues selon que l'on place ou non le facteur de croissance dans la culture de fibroblastes ou la culture d'ostéoblastes. Cette étude in vitro devrait permettre d'étudier le comportement des progéniteurs osseux in vitro en présence d'un facteur de croissance et d'apprécier ainsi l'utilité clinique éventuelle d'ajouter un facteur de croissance à une injection de moelle osseuse dans le traitement des pseudarthroses.

3- Luc DOUAY – INSERM U417

« Faisabilité de l'évaluation *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques primitives dans les cellules de sang amplifiées *ex vivo*. Comparaison à la capacité de reconstitution de l'hématopoïèse chez la souris NOD/SCID »

Résumé :

Il est maintenant d'utiliser le sang de cordon comme source de cellules souches hématopoïétiques dans me traitement de certaines maladies du sang. Toutefois l'obstacle majeur dû au petit nombre des cellules souches obtenues dans le sang limite encore son utilisation chez l'adulte. Il faut donc mettre au point les conditions expérimentales de leur expansion *ex vivo* et démontrer la capacité de ces cellules amplifiées à maintenir une hématopoïèse à court terme et à long terme. Notre projet est d'étudier l'intérêt des méthodes de culture de cellules souches hématopoïétiques primitives *in vitro* (LTC-IC) par comparaison aux résultats observés *in vivo* dans le modèle animal de la souris NOD/SCID, pour définir des critères d'évaluation de ces greffons et aussi améliorer leur qualité.

Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F, Izac B, Coulombel L, Douay L. **CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells.** *J. Hematother Stem Cell Res.* 2001 Apr; 10(2):273-81.

Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, Li X, Titeux M, Izac B, Leteurtre F, Coulombel L, Douay L. **In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells.** *Ex Hematol.* 2000 dec;28(12):1470-80.

4 – Camille FRANCES – Pitié Salpêtrière

« Morbidité de l'infection HHV8 en transplantation rénale (soumis à un PHRC) »

Résumé :

Les conséquences d'une infection HHV-8 préalable à la transplantation rénale ou transmise par le donneur sont encore largement méconnues. Les objectifs de ce travail sont d'étudier la prévalence de l'infection HHV-8 préalable à la transplantation et celle transmise par le donneur au moment de la transplantation ainsi que les conséquences médicales de cette infection HHV-8 en termes de survie, de la fonctionnalité du rein et de l'émergence d'une maladie de Kaposi, de préciser la valeur prédictive de la virémie quantitative HHV8 dans la survenue d'une maladie de Kaposi et d'étudier les rôles d'éventuels cofacteurs favorisant l'émergence de cette maladie de Kaposi. Tous les donneurs et les receveurs des centres français de transplantation rénale, qui acceptent de rentrer dans l'étude, seront testés à la recherche d'anticorps anti-HHV-8 par une technique en immunofluorescence. Trois cohortes de transplantés seront suivies cliniquement et biologiquement en collaboration avec les dermatologues de chaque centres : A) Les malades séropositifs pour HHV-8 au moment de la transplantation, B) les malades séronégatifs au moment de la transplantation ayant reçu un rein d'un donneur séropositif, et C) les malades séronégatifs au moment de la transplantation ayant reçu un rein d'un donneur séronégatif. Les malades des cohortes A et B auront tous les 3 mois pendant 3 ans une consultation de dermatologie et un prélèvement sanguin pour sérothèque et lymphothèque. La cohorte C sera normalement suivie par les centres de transplantation et servira de groupe témoin (recueil de données survie, survie du greffon, maladie de Kaposi). Cette étude donnera des éléments de réponse aux principaux problèmes soulevés par l'infection HHV-8 en transplantation rénale : Faut-il faire en France une sérologie HHV-8 systématique du donneur et du receveur ? Faut-il refuser de transplanter les dialysés HHV-8 positifs ou simplement modifier leur traitement et leur surveillance ? Faut-il refuser les organes des donneurs HHV-8 positifs alors que le nombre d'organes transplantables est déjà très faible ? Elle permettra d'identifier les principaux facteurs associés à la maladie de Kaposi après transplantation rénale.

5- Philippe DIOLEZ – CNRS / Université de Bordeaux

« Néphrotoxicité de la cyclosporine A : rôle du pore de transition de perméabilité mitochondrial »

Résumé :

Dans le but d'améliorer notre connaissance des mécanismes à l'origine des dysfonctionnements observés au cours des phases de conservation-réimplantation des organes, nous avons entrepris ce programme d'étude de l'énergétique de l'organe aux différents niveaux d'intégration (cellulaire et mitochondriale). Ce modèle comporte le suivi de l'énergétique cellulaire *in situ* des organes isolés-perfusés (foie, cœur et rein de rat) par RMN du phosphore 31, couplé à l'analyse *in vitro* des mitochondries isolées préparées à partir de ces mêmes organes. Le projet proposé prévoyait l'étude comparative de deux organes sensible (rein) et insensible (foie) vis à vis de la toxicité à la Cyclosporine A (CsA). L'effet de la CsA a été testé sur foie de rats perfusés, soumis à RMN du 31P et dont les fonctions mitochondriales ont été testées. Une étude comparative de la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPT) dans les mitochondries de rein et de foie a été entreprise en utilisant les techniques de mesure du gonflement mitochondrial induit par l'ouverture du MPT. Dans le cas du foie perfusé, nous avons ainsi pu clairement montrer une association directe entre la dysfonction énergétique de l'organe (perte d'ATP) au moment de la reperfusion et une dysfonction mitochondriale affectant les processus de phosphorylation. Ces deux dysfonctions sont parfaitement empêchées par l'addition préventive de CsA, inhibiteur spécifique de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPT), démontrant son implication dans la dysfonction mitochondriale. Dans ce cas la CsA s'est donc non seulement révélée non toxique mais possède même un rôle bénéfique sur la survie de l'organe. Les mêmes expériences réalisées sur les reins de cochon perfusés se sont traduites par un échec : la présence de cyclosporine dans le milieu de perfusion provoque

systématiquement une destruction rapide des mitochondries. Les résultats sont en accord avec une néphrotoxicité de la cyclosporine médiée par la perturbation d'une fonction physiologique inconnue du MPT.

*Leducq N, Delmas-Beauvieux M.C., Boudel-Marchasson I, Dufour S, Gallis J.L., Canioni P, Diolez P. **Mitochondrial and energetic dysfunctions of liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore.** Transplantation Proceedings, 32, 479-480(2002).*

6 – **Patrick Sabatier**- Banque française des yeux

«Introduction du polyéthylène glycol et de la trimétazidine (TMZ) dans les milieux de conservation de cornée en organoculture à 31°C (C31), pour lutter contre l'hydratation et l'ischémie tissulaire »

Résumé :

Le rapport d'activité du laboratoire de la banque Française des Yeux (1998) fait état d'un taux de 49% de tissus cornéens non conformes pour une transplantation (Donneur en arrêt cardio-respiratoire persistant). La mauvaise qualité endothéliale en est la principale cause (35%). Pour améliorer la qualité des tissus, les milieux de conservation de cornée en organo-culture à 31°C (C31) représentent une cible privilégiée. Deux axes de recherche sont identifiés : d'abord lutter contre l'hydratation globale tissulaire (extra et intra cellulaire) : en testant une molécule de Poly-Ethylène Glycol 20.000 (PEG) comme substance imperméabilisante durant la conservation à la place du Dextran, actuellement utilisés, ce dernier ne l'étant qu'à la phase de déturgescence (pendant 48 h avant la transplantation) en raison de son métabolisme et de sa toxicité endothéliale (Pels E, The effects of high molecular weight dextran on Preservation of human corneas. Cornea 1985 ; 3 : 219-27). Ensuite protéger la voie aérobie mitochondriale à localisation endothéliale en évaluant un protecteur mitochondrial d'ischémie dès l'étape du prélèvement : la trimétazidine (TMZ). L'évaluation de la cornée en organo-culture C31 est un modèle expérimental remarquable de mesure de la viabilité tissulaire par trois outils : l'examen microscopique (test isotonique, et coloration vitale au bleu trypan) avec étude morphométrique endothéliale (analyseur d'image), la pachymétrie ultrasonique (hydratation tissulaire) et la Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (étude métabolique).

7- **Anne WEBER** – Hôpital Antoine Bécclère Clamart

«Immortalisation des hépatocytes humains et simiens adultes et fœtaux : mise au point des conditions d'isolement, d'expansion et de cryopréservation»

Résumé :

Notre projet a pour objectif de mettre au point des conditions d'isolement, d'expansion et de cryopréservation des hépatocytes humains adultes et fœtaux par transfert rétroviral de gènes d'immortalisation évalués au préalable sur des hépatocytes simiens. Trois gènes seront utilisés et leur efficacité relative sur les hépatocytes simiens adultes et fœtaux comparée. Il s'agit de l'antigène T de SV40, la sous-unité catalytique de la télomérase humaine et une combinaison des 2. Les gènes codants pour ces protéines seront introduits dans des vecteurs rétroviraux bicistroniques et les rétrovirus recombinants serviront à infecter les hépatocytes simiens. Les clones seront isolés, caractérisés pour l'expression de fonctions hépatiques et leur stabilité génétique. Les conditions de cryopréservation seront également mises au point. Les virus véhiculant le / les gènes le plus approprié seront utilisés pour immortaliser les hépatocytes humains. Parallèlement, nous développerons des méthodes de biologie cellulaire afin de cultiver et d'amplifier les hépatocytes embryonnaires humains et les hépatoblastes, cellules souches hépatiques. Les conditions d'immortalisation et de cryopréservation seront également mises au point à partir des résultats obtenus sur les hépatocytes fœtaux simiens.

8- **Saddek MOHEND SAID**- Université Louis Pasteur Strasbourg

«Effet de la transplantation de photorécepteurs sur la survie des cônes sur un modèle transgénique de rétinopathie pigmentaire : étude anatomofonctionnelle.»

Résumé :

Nous étudierons l'effet de la transplantation de photorécepteurs sur la survie des cônes, sur un modèle transgénique de rétinopathie pigmentaire. Une quantification immunohistochimique et une analyse fonctionnelle seront réalisées. L'effet de greffe de bâtonnets sur la survie des cônes a été étudié sur la souris *rd* et a montré un prolongement significatif de leur survie lié à un (des) facteur(s) diffusible(s). La taille réduite de la souris ne permet, cependant, pas d'élucider certains aspects importants de l'effet observé. La disponibilité du modèle de rat transgénique permettra de vérifier sa reproductibilité indépendamment du type de mutation en cause dans les dégénérescences rétinienues. Différentes sources de greffons seront explorées. Des transplants seront préparés à partir de rétines de rats adultes, nouveau-nés et au stade embryologique ou à partir de cultures cellulaires de photorécepteurs. En outre, nous réaliserons une étude dose-effet en greffant des transplants de différentes tailles, de photorécepteurs de rats normaux adultes chez les animaux transgéniques. Le rôle de l'orientation des transplants sera également vérifié en transplantant des photorécepteurs selon deux orientations (segment externe vers l'épithélium pigmentaire ou vers la rétine neurale). Enfin, la survie des greffons dans l'espace sous rétinien sera contrôlée à différents temps après la transplantation. Selon les expériences, les rats seront répartis en lot de 12 à 15 et chaque groupe comportera son propre contrôle opéré ou pas. L'analyse de l'effet sur la survie des cônes sera réalisée par quantification immunohistochimique et sera corrélée à une étude électrophysiologique par l'enregistrement de l'électrorétinogramme selon les méthodes standards et selon la technique du VERIS (ERG multifocal).

1 – Philippe LE BOUTEILLER – INSERM U395

« Fonction des isoformes solubles de la molécule HLA-G de classe Ib dans la tolérance maternelle au fœtus »

Résumé :

La première partie de notre projet a consisté à mettre au point une technique de purification de la molécule HLA-G soluble à partir de surnageants de culture de transfectants eucaryotes sécrétant cette molécule, à l'exclusion de toute autre molécule de classe I, par passage sur colonne d'immunoaffinité, élution, screening et concentration des fractions positives. La seconde partie de notre projet a consisté à mettre au point un test Elisa spécifique de la molécule HLA-G soluble. Différents anticorps monoclonaux anti-HLA-G ont été évalués et comparés. Trois d'entre eux ont été retenus et, par combinaison avec un anticorps anti-HLA de classe I biotinylé en seconde couche, ont permis de mettre au point un test spécifique de détection de la molécule HLA-G soluble aussi bien dans des surnageants de culture que dans des liquides biologiques (liquide amniotique, sérums). Des expériences de compétition ont permis de mettre en évidence certains domaines et/ou épitopes de la molécule HLA-G contre lesquels ces anticorps étaient dirigés. La troisième partie, enfin, a permis de mettre en évidence une nouvelle fonction, immunosuppressive, exercée par la molécule HLA-G soluble. Utilisant les deux techniques ci-dessus, nous avons mis en évidence que HLA-G soluble induisait l'apoptose des lymphocytes T CD8+ activés. Cette propriété est dépendante de la molécule CD8 et s'exerce par la voie Fas/ Fas ligand. Elle est de plus indépendante du T cell receptor.

Le Bouteiller P, Solier C. **Is antigen presentation the primary function of HLA-G?** Microbes Infect. 2001 Apr;3(4):323-32.

Fournel S, Huc X, Aguerre-Girr M, Solier C, Legros M, Praud- Brethenou C, Moussa M, Chaouat G, Berrebi A, Bensussan A, Lenfant F, Le Bouteiller P. **Comparative reactivity of different HLA- G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules.** Tissue Antigens. 2000 Jun; 55(6): 510-8

Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P. **Cutting edge : soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8.** J. Immunol. 2000 Jun 15; 164(12): 6100-4

2 – Ghislaine STERKERS - Hôpital Robert Debré

« Etude de la reconstitution immunitaire anti-EBV après allègement de l'immunosuppression lors des lymphomes en transplantation rénale »

Résumé : La faisabilité d'une thérapie cellulaire consistant à administrer des lymphocytes T spécifiques de l'EBV lors de lymphomes B en transplantation d'organe a été récemment démontrée. Les indications de telles thérapies qui seront logiquement limitées aux échecs de l'allègement de l'immunosuppression restent à préciser.

Objectif : Evaluer la qualité de la restauration d'une réponse immunitaire anti-EBV efficace lors de l'allègement de l'immunosuppression non seulement par des critères clinico-pathologiques mais également immunologiques et virologiques.

Méthode : Il s'agit d'une étude multicentrique ouverte, incluant tous les centres participant au registre français des syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation. Il est anticipé de recruter 20 malades en 18 mois avec un suivi individuel de 6 mois (au diagnostic et à 15 jours, 1, 2 et 6 mois suivant l'allègement thérapeutique). La régression tumorale sera évaluée selon les critères de l'OMS et selon les recommandations du National Cancer Institute Sponsored Working Group. Elle sera corrélée 1) au niveau de la charge virale EBV (méthode de TacMan), et 2) à la réponse immunologique évaluée par la numération des lymphocytes T CD4 et CD8 périphériques activés (cytométrie en flux) et fonctionnelle (réponse cytokinique + T cytotoxique non spécifique et spécifique soit du virus soit de peptides de l'EBV).

Résultats attendus : associer aux critères cliniques d'efficacité de l'allègement de l'immunosuppression des critères virologiques et immunologiques de restauration d'une réponse immunitaire anti-EBV efficace permettant de mieux rationaliser les indications thérapeutiques lourdes et onéreuses adjuvantes (anticorps anti-B et thérapie cellulaire).

3- Caroline SUBERBIELLE-BOISSEL – Hôpital St Louis Paris

« Impact des anticorps anti-cellules endothéliales, anti-cellules épithéliales et anti-monocytes en transplantation rénale »

Résumé :

Comme les anticorps anti-HLA spécifiques du greffon, les Ac anti-cellules endothéliales, anti-cellules épithéliales et les Ac anti-monocytes sont considérés comme potentiellement responsables de rejets en transplantation d'organe. Après mise au point des tests de détection en routine de ces Ac non HLA, nous avons réalisé une étude prospective monocentrique sur une population de patients détransplantés rénaux pour rejet de 1987 à 1995. L'immunisation développée par ces patients peut être évaluée de la façon suivante : 69% d'Ac anti HLA spécifiques du greffon, 25% d'Ac anti-cellules endothéliales, 26 % d'Ac anti-cellules épithéliales et 18% d'Ac anti-monocytes. Les cibles de ces Ac, distinctes des molécules HLA, sont multiples et la communauté antigénique observée entre les différents types cellulaires n'est que partielle. Les objectifs de ce projet visant à évaluer le rôle des Ac non HLA sont les suivants :

1. finaliser l'étude rétrospective monocentrique par l'analyse des profils d'immunisation anti-HLA et non HLA après transplantation chez tous les sujets greffés dans la même équipe pendant la même période que la population de patients détransplantés.
2. Préciser les cibles antigéniques et les modes d'action, cytotoxicité, apoptose ou activation, des Ac anti-cellules endothéliales, anti-cellules épithéliales et anti-monocytes.

4 – Alain BERNARD – INSERM U343

« Modulation de la circulation et de la migration des lymphocytes. Rôle de certaines molécules de surface et notamment de CD47-Etude autour des greffes d'organes »

Résumé :

La circulation et la migration des lymphocytes dans un greffon restent encore un aspect fort peu étudié des mécanismes de rejet. Pourtant, c'est une étape indispensable, dont les mécanismes moléculaires commencent d'être connus. Lorsqu'un foyer inflammatoire se développe, les cellules T mémoires s'arrêtent « spontanément » sur l'endothélium des veinules post-capillaires pour migrer au travers de l'endothélium et gagner le foyer. L'arrêt ferme est principalement dû à la voie des intégrines $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ – VCA - $\alpha 4\beta 7$ -Mad CAM) car le ligand des intégrines apparaît à la surface des cellules endothéliales inflammatoires ; du côté cellules T, on suppose classiquement que les chemokines doivent jouer un rôle dans l'induction des intégrines à un état nécessaire de haute affinité/avidité. Nous venons de montrer que le recrutement de la molécule CD47/IAP des lymphocytes T joue un rôle important, sinon prépondérant dans l'arrêt « spontané » des lymphocytes T mémoires. D'autre part, nous avons montré que CD47 préside une puissante voie accessoire d'activation des cellules T qui semblent jouer un rôle important dans l'allogénicité, et bien distincte de la voie CD28. Nos objectifs visent à préciser :

A – in vitro – Etablir les relations CD47-intégrines $\alpha 4$ au sein des lymphocytes T et les mécanismes moléculaires conduisant à l'augmentation d'avidité/affinité des intégrines ; confirmer le rôle de la thrombospondine (sécrétée par les cellules endothéliales vasculaires) dans ce déclenchement et la mise en jeu éventuelle d'autres ligands de CD47 ; l'intervention et l'influence éventuelle des plaquettes ; préciser un rôle éventuel de CD47 dans la migration transendothéliale ; établir les relations entre le rôle modulateur de l'adhérence et de la locomotion et son rôle activateur des cellules T.

B – in vivo – Etablir la validité de ces mécanismes dans le rejet des greffes sur des modèles de greffes non vasculaires et vasculaires chez la souris et l'étude de l'influence des Acs contre CD47 et ces ligands et de constructions moléculaires par l'utilisation ; suivi du devenir de ces greffes solubles des souches de souris CD47-/- et immunodéficientes.

C – A poursuivre la recherche systématique des molécules de surfaces aptes à moduler occasionnellement l'affinité des intégrines au cours de la diapédèse, au premier rang desquelles la molécule CD99.

5- Daniel OLIVE – Institut Paoli Calmettes

SOUTIEN : 80.000 F

« Lymphome post-greffe .Expression et fonction de molécules de la famille du TNF et du TNF récepteur »

Résumé :

Les lymphomes sont une des principales pathologies associées à la transplantation. Le rôle du virus EBV est de mieux en mieux compris. Les dysfonctions de la reconnaissance immune, qui permettent normalement l'élimination des cellules néoplasiques, restent peu explorées. Chez les patients non immunodéprimés, plusieurs anomalies aboutissant à une mauvaise élimination des cellules néoplasiques, sont décrites. Ainsi, la cellule tumorale peut n'exprimer qu'une faible quantité d'antigènes tumoraux à sa surface, être déficiente en molécules de costimulation, induire une apoptose des cellules lymphocytaires qui les ont reconnus, être résistantes aux signaux d'apoptose. Il a été retrouvé au niveau des cellules lymphomateuses B des dysfonctions importantes des molécules appartenant à la famille du TNF récepteur. Par ailleurs, les traitements immunosuppresseurs chez les patients greffés préviennent l'expression des ligands de la famille du TNF (CD40 ligand), ce qui devrait interférer avec les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes. Connaissant l'importance de ces molécules dans le contrôle de la prolifération lymphoïde et dans l'élimination des cellules néoplasiques, la présence d'une dysfonction à leur niveau est un des mécanismes importants de la carcinogenèse ou de la prolifération néoplasique. Nous souhaitons compléter les données sur cette famille, en analysant la présence et le fonctionnement des membres récemment découverts : CD40/CD40L, HVEM, RANK ligand, OX40, Trail R2 et R3. Cette analyse sera réalisée au niveau des cellules lymphomateuses, des cellules lymphocytaires des patients atteints, des cellules lymphocytaires des patients transplantés sains, et in vitro sur des cellules lymphocytaires soumises à des posologies croissantes des principaux médicaments immunosuppresseurs. La découverte d'une anomalie de fonctionnement peut aboutir à une meilleure gestion du traitement immunosuppresseur, à une stimulation thérapeutique des voies déficientes et permettre ainsi une prise en charge plus efficace des néoplasies post-transplantation. .

6 – Bernard MAILLÈRE – CEA SACLAY

« Répartition fonctionnelle des molécules HLA de classe II »

Résumé :

Nous avons récemment mis au point des tests de liaison de peptides vis-à-vis des principales molécules HLA-DR de la population française. Nos résultats mettent en évidence des similarités et des différences majeures dans la capacité de ces molécules à reconnaître des peptides. Notre objectif est dorénavant d'identifier les résidus polymorphes qui

contribuent aux différences de reconnaissance des peptides et d'établir une nouvelle classification des molécules HLA de classe II. Cette répartition fonctionnelle servira à optimiser le choix des incompatibilités pour la greffe de rein en établissant une liste d'incompatibilités permises ou préférables. Elle pourra également faciliter le choix des donneurs de moelle en identifiant les molécules fonctionnellement identiques. Nous proposons d'étudier la capacité de liaison des peptides pouvant intervenir dans le rejet de greffe et de caractériser les modes de liaison des peptides à chacune des molécules. Nous comptons également étendre nos capacités de test à d'autres molécules de classe II prépondérantes de la population française (2^{ème} molécules DR et molécules DQ). La mise en place de nouveaux outils mathématiques nous permettra de confronter des programmes de simulation à ces données expérimentales.

7- Nicolas GLAICHENHAUS – CNRS Valbonne

« *L'expression de molécules anti-apoptotiques dans les cellules bêta des îlots pancréatiques est-elle suffisante pour protéger ces îlots du rejet allogénique* »

Résumé :

Le diabète autoimmunitaire est provoqué par la destruction auto-immune des cellules β d'îlots pancréatiques, productrices d'insuline. L'étude de souris NOD, qui deviennent diabétiques spontanément, a montré que l'infiltration du pancréas par des lymphocytes T autoréactifs constituait une phase déterminante de la maladie qui conduisait à la mort par apoptose des cellules β et à l'apparition du diabète. Chez l'homme, la transplantation d'îlots, considérée comme prometteuse pour soigner les individus diabétiques, se heurte encore très souvent aux phénomènes de rejet. Pour prolonger la survie des îlots greffés, nous avons essayé d'accroître la résistance des cellules β à l'apoptose. Pour cela, nous avons construit des souris NOD transgéniques chez lesquelles la protéine antiapoptotique CrmA de poxvirus était exprimée sélectivement dans les îlots pancréatiques. Chez ces souris les cellules β sont effectivement plus résistantes à l'apoptose que celles de leurs sœurs non transgéniques et les îlots pancréatiques, lorsqu'ils sont utilisés dans des expériences de greffe allogéniques, sont moins fréquemment rejetés que ceux préparés à partir de souris non transgéniques. Nous nous proposons de reproduire ces expériences de greffes sur un grand nombre de souris de manière à préciser les mécanismes qui sont responsables de la diminution des phénomènes de rejet. Grâce à une étude histologique, des greffons prélevés sur les souris survivantes et à l'analyse des splénocytes de ces mêmes souris, nous essaierons de déterminer si l'expression du gène CrmA a non seulement permis d'accroître la résistance des cellules β mais aussi de créer un état de tolérance envers des antigènes pancréatiques. De manière à pouvoir préparer de grandes quantités d'îlots exprimant le gène CrmA, nous construirons un adénovirus recombinant capable de transférer avec de hautes efficacités le cDNA du gène CrmA.

8- Jean-Paul SOULILLOU – INSERM U437

« *Analyse quantitative et qualitative du transcriptome V- β du récepteur des cellules T, une nouvelle méthode d'analyse des réponses immunes in vivo et son application à l'allo-reconnaissance* »

Résumé :

L'analyse du répertoire du TCR est un reflet indirect de l'état de la mobilisation T dans une situation biologique donnée. Cependant, l'importante réactivité croisée du TCR, ainsi que la grande diversité des peptides apprêtés, rend difficile l'utilisation des altérations du répertoire V β prise isolément (ex : Immunoscope®) en tant que marqueur pour comprendre le comportement immunologique précis des cellules T suite à une allogreffe par exemple. Une approche permettant de quantifier la somme des altérations qualitatives (Reperturb®) permet une vision plus synthétique des altérations du répertoire. Malgré leur intérêt, ces méthodes d'analyse du TCR ne permettent pas d'avoir une connaissance précise de la taille du pool de lymphocytes T utilisant un réarrangement des chaînes V β données. Ainsi, la méthode que nous proposons de mettre au point combine l'analyse obtenue par le programme Reperturb® et par Immunoscope® de l'altération de la taille du CDR3 (dans une famille V β donnée), comparée avec le profil gaussien au repos, avec une mesure quantitative de chaque transcrite V β , par PCR quantitative TaqMan de chaque famille V β . Grâce à une collaboration avec un mathématicien, une analyse factorielle sera utilisée pour définir les cohérences d'utilisation des V β et leur altération, ce que ne permet pas le programme Reperturb®. Une telle méthode basée sur une vue « intégrée » de l'altération du TCR, au lieu de la description individuelle des altérations de chaque famille V β , est propice pour comprendre les mécanismes de rejet et de tolérance mais aussi d'autres événements immunologiques fondamentaux et appliqués.

Guillet M, Brouard S, Gagne K, Sébille F, Cuturi M.C., Delsuc M.A., Souillou J.P. **Different qualitative and quantitative regulation of V β TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction.** The Journal of Immunology, 2002, 168:5088-5095.

9- Olivier LANTZ – INSERM Paris

« *Réponse auxiliaire Th1/Th2 et présentation allogénique directe/indirecte dans un modèle oligoclonal de rejet de greffe* »

Résumé :

L'influence du type de cellules présentatrices (lymphocyte B, cellules dendritiques ou fibroblastes), du lieu d'immunisation (s.c., i.v., i.p.) et du mode de présentation directe ou indirecte d'un alloantigène sur la différenciation Th1/Th2 sera étudiée dans un nouveau modèle de souris transgénique pour un récepteur T où le mode de présentation et le caractère naïf ou mémoire des cellules T CD4⁺ répondeuses peuvent être parfaitement contrôlés. Une souris transgénique pour un TCR anti-H-Y présenté par I-A^b a été produite et croisée en fond RAG déficient pour obtenir des populations pures de

lymphocytes T naïfs. Comme le clone original provenait d'une souris F1H-2^{b/k}, il ne réagit pas vis-à-vis des haplotypes b ou k. Les cellules transgéniques seront transférées dans des femelles H-2^{b/b} ou H-2^{k/k} RAG^{-/-} yc^{-/-} où l'absence de cellules T ou NK empêchera la destruction de l'inoculum. Les chimères seront ensuite immunisées avec plusieurs types de cellules mâles selon différentes routes. Des greffes de peau seront aussi effectuées. Le phénotype des cellules CD4 répondeuses sera étudié par FACS et directement ex vivo, sans restimulation in vitro, par PCR quantitative pour l'IL-2, -4, -10 et l'interféron γ ; dans ce modèle, H-Y se comporte comme un antigène majeur d'histocompatibilité et il est possible d'étudier une présentation exclusive directe ou indirecte d'un alloantigène et de définir si ces deux modes de présentation entraînent des profils différents de sécrétion de lymphokines par les cellules CD4.

10- **Van MEERWIJK Joost** – INSERM U395 CHU Purpan Toulouse

« Les mécanismes responsables du phénomène de la Tolérance scindée des lymphocytes T »

Résumé :

Le phénomène de la « tolérance scindée », c'est-à-dire la réactivité in vitro contrastant avec une tolérance in vivo, a été observé avec des lymphocytes T provenant de certains types de chimères hématopoïétiques ainsi que des souris transgéniques. Les mécanismes qui en sont responsables restent inconnus et font l'objet du projet de recherche proposé. La tolérance des lymphocytes T peut globalement être divisée en deux types majeurs : leur élimination ou inactivation (« tolérance récessive ») et la régulation de leur activité par d'autres cellules T (« tolérance dominante »). Nous avons préalablement établi des chimères hématopoïétiques dans lesquelles la sélection positive des thymocytes a lieu normalement, alors que l'induction de la tolérance par des cellules d'origine hématopoïétique est absente. Les cellules T qui se différencient dans ces chimères peuvent être activées par des cellules présentatrices d'antigène in vitro, alors qu'elles sont inertes in vivo. Nous proposons d'étudier le mécanisme responsable de cet état de tolérance scindée. Le rôle potentiel de la tolérance dominante sera analysé par injection simultanée de deux populations de cellules T provenant de chimères hématopoïétiques, l'une réactive et l'autre tolérante in vivo. Il sera analysé si la deuxième population peut contrôler la réactivité de la première. L'implication de la tolérance récessive sera déterminée par « l'hébergement » in vivo des lymphocytes T, suivi de l'analyse de leur activité in vitro. Si l'hébergement in vivo rend les cellules T inactives, on peut conclure qu'un mécanisme récessif est impliqué dans la tolérance scindée. La compréhension des mécanismes sous-jacents à la tolérance scindée pourra aider au développement de thérapeutiques visant le contrôle de la réactivité allogénique T-lymphocytaire in vivo.

THÈME 4 : XENOGREFFE ET XENOASSISTANCE

1 – **Béatrice CHARREAU** – INSERM U437 CHU de Nantes

« Activation de cellules endothéliales en xénotransplantation : mise en évidence et caractérisation de nouvelles molécules régulées au cours de l'activation des cellules endothéliales porcines »

Résumé :

L'activation des cellules endothéliales constitue à l'heure actuelle l'évènement majeur associé au rejet de greffes entre espèces discordantes ou xénogreffes. La connaissance des gènes régulés au cours du processus d'activation endothéliale devrait permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués de ce phénomène, de mieux en évaluer les conséquences et peut-être d'envisager de nouvelles stratégies de prévention. Le but de cette étude est d'appliquer la technique de RNA differential Display à la comparaison et à l'identification de nouveaux gènes régulés de façon spécifique au cours de l'activation des cellules endothéliales porcines par des stimuli tels que le LPS, le TNF ou plus spécifique des xénogreffes tels que la fixation des anticorps naturels xénogéniques (dirigés contre le porc) et l'activation du complément. Les premiers résultats obtenus ont déjà permis de mettre en évidence 70 ADNc transcripts à partir d'ARNm régulés sélectivement de façon positive ou négative dans les cellules endothéliales porcines en réponse aux divers stimuli. La majorité de ces ADNc ont été sous-clonés puis séquencés. La moitié des séquences obtenues ne présente aucune homologie avec des séquences déjà répertoriées. Parmi les gènes déjà identifiés et pour lesquels une régulation spécifique par le sérum humain a pu être confirmée, il y a l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase TIMP-1 et la Disintegrin et métalloprotéinase ADAM-10. Des facteurs transcriptionnels, PAF acétyl hydrolase et la coproporphyrinogène oxydase figurent parmi les transcripts dont l'expression reste à analyser. La contribution de ces molécules aux processus inflammatoires associés au rejet de greffe sera analysée in vitro et in vivo. Le clonage des ADNc codant pour de nouvelles molécules impliquées dans l'activation endothéliale sera également réalisée afin de permettre leur caractérisation et d'évaluer leur fonction.

2 – **Hervé WATIER** – Université François Rabelais Tours

« Etude de l'association de la Bêta2-microglobuline de porc aux chaînes lourdes du CMH humain de classe I »

Résumé :

Les rejets à médiation lymphocytaire constituent maintenant l'un des écueils majeurs des xénogreffes en raison de l'abondance et de la diversité des peptides hétérologues. De plus, en situation xénogénique, les chaînes lourdes HLA-I des cellules dendritiques du receveur pourraient se charger de β 2-microglobuline (β 2-m) porcine au moment de leur passage dans le greffon, ce qui risque encore d'accroître et d'altérer les réponses immunitaires. Pour permettre l'étude des échanges membranaires entre β 2-m porcine et β 2-m humaine, nous avons d'abord pour objectif de purifier la β 2-m de porc et de la produire sous forme recombinante, puis de produire des anticorps monoclonaux (AcMo) reconnaissant

spécifiquement la β 2-m de porc et non l'humaine. Avec ces outils, nous pourrions analyser par cytométrie quantitative l'importance de ces échanges en fonction des concentrations de β 2-m de porc libre. Nous déterminerons alors par BIAcore les constantes physico-chimiques des échanges de β 2-m, après avoir fixé des formes solubles monomériques d'HLA-A2/ β 2-m humaine. Nous transfecterons également l'ADN d'HLA-A*0201 dans des cellules Daudi déjà transfectées par l'ADN de la β 2-m de porc ou par l'ADN de β 2-m humaine, afin d'étudier les modifications épitopiques sur la chaîne HLA-A2. Enfin, nous profiterons des différents outils développés pour mettre au point un test immunoenzymatique de dosage de la β 2-m de porc qui pourra trouver de nombreuses applications en xénogreffe, en recherche biomédicale et en médecine vétérinaire.

3 - **Bernard WEILL** – Université René Descartes Paris V UFR Cochin

« Rôle de l'interaction FAS-FAS LIGAND (CD95-CD95L) dans le rejet cellulaire xénogénique »

Résumé :

L'expression du ligand de Fas (Fas L) dans les sites immunologiquement privilégiés (testicules, chambre intérieure de l'œil), participe de façon cruciale à la protection de ces organes contre une agression du système immunitaire par induction de l'apoptose des clones T SPECIFIQUES activés exprimant Fas. Il a été montré qu'une allogreffe de cellules de Sertoli exprimant FasL induisait l'apoptose des cellules T activées dirigées contre le greffon, et permettant sa survie. Le but de notre projet est de prévenir le rejet xénogénique par l'utilisation de greffon provenant d'animaux transgéniques exprimant le ligand de Fas, et d'étudier les mécanismes impliqués dans cette protection. Le modèle étudié sera celui de la greffe de thyroïde de souris transgéniques exprimant le ligand de Fas, chez les rats Lewis. Des souris transgéniques exprimant le ligand de Fas sur leurs thyroïdes ont été produites par l'un d'entre nous. Les thyroïdes d'animaux transgéniques et de souris normales seront transplantées selon une combinaison concordante, sous la capsule rénale de rats Lewis. La survie des greffons sera étudiée, leur fonctionnalité et l'infiltrat cellulaire caractérisé à différents temps après la transplantation. Ces observations permettront d'apprécier le rôle de l'interaction Fas-Fas ligand dans la prolongation de la survie des greffons. En cas de résultats positifs, Fas Ligand pourrait être considéré comme un transgène supplémentaire utilisable pour inhiber le rejet xénogénique.

Tourneur L, Malassagne B, Batteux F, Fabre M, Mistou S, Lallemand E, Lores P, Chiochia G. **Transgenic expression of CD95 ligand on thyroid follicular cells confers immune privilege upon thyroid allografts.** J. Immunol. 2001 Aug 1 ;167(3) :1338-46.

THÈME 5 : RECHERCHE CLINIQUE ET SANTE PUBLIQUE

1 – **Colette RAFFOUX** – France greffe de moelle Paris

« Evaluation de l'adéquation entre le fichier des volontaires au don de cellules hématopoïétiques et les besoins des patients »

Résumé :

L'évaluation de l'adéquation entre le fichier des donneurs de moelle non apparentés et les besoins des patients pour lesquels est posée l'indication thérapeutique de greffe de moelle entre dans le cadre d'études visant à améliorer tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif et économique le fichier National de Donneurs de moelle. Ces études sont menées en collaboration entre plusieurs unités INSERM et France Greffe de Moelle. Plusieurs approches complémentaires sont envisagées : (1) analyse de la distribution des polymorphismes HLA des donneurs et des receveurs selon leur situation géographique, (2) calcul de la probabilité de trouver un donneur compatible au sein du fichier prenant en compte les fréquences des haplotypes HLA chez les receveurs, (3) localisation géographique plus fine des polymorphismes HLA des donneurs et des patients par la méthode patronymique, (4) formalisation des stratégies de campagne de recrutement de donneurs fléchées géographiquement, en s'appuyant sur les données de études précédentes, (5) analyse des perceptions sociales et des questions éthiques inhérentes à l'optimisation de la constitution du fichier par un choix non au hasard des donneurs, (6) sur la base de cette analyse, propositions relatives au contenu de l'information et aux modalités de communication vers le public et via les médias lors des campagnes de recrutement de nouveaux donneurs.

2 – **Claude LE PEN** – **Annabel DUNBAVAND LEGOS** – Université Paris Dauphine

« Analyse medico-économique de la pénurie d'organes dans le domaine de la transplantation en France »

Résumé :

Les niveaux de pénurie en greffons rénaux dans les régions administratives françaises ont été évalués, ainsi que le coût de la pénurie et les économies potentielles dans ces régions, afin de donner aux décideurs des arguments économiques pour développer l'organisation du prélèvement et de la greffe dans leur région. **Méthode :** L'étude se situe en 1998 et toutes les données ont été extraites du système d'information de l'EfG. La pénurie en greffons est estimée par la différence entre la demande de greffe (nombre de patients inscrits en liste d'attente) et l'offre de greffons (nombre de greffons prélevés dans la région). Le coût de la pénurie est estimé par la différence entre le coût de la dialyse et le coût de la greffe. **Résultats :** Toutes les régions qui réalisent des greffes de reins ont à faire face à une situation de pénurie d'ampleur variable. Le coût estimé de cette pénurie, au terme de 5 années, représente plus de 450 millions d'euros (3 milliards de francs). Il est variable d'une région à l'autre, allant de 3,5 à 154 millions d'euros.

Conclusion : les disparités régionales de pénurie reflètent les inégalités d'accès à la greffe rénale. Une des missions de l'Établissement français des Greffes est de lutter contre ces inégalités afin de rétablir l'équité. Il est maintenant nécessaire de s'intéresser aux moyens des équipes de greffe afin d'anticiper l'augmentation de l'activité et de mieux répondre à la demande de la population des malades ayant une insuffisance rénale.

3- Eliane GLUCKMAN – Hôpital St Louis Paris

« Etude comparative des résultats de greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques non apparentées de sang de cordon ou de moelle osseuse chez l'enfant atteint de leucémie aiguë »

Résumé :

L'objectif de la recherche est d'étudier les résultats des greffes allogéniques en comparant les cellules du sang de cordon, de la moelle des donneurs non apparentés chez les enfants atteints de leucémie aigue. Les patients seront enregistrés au moment de l'inscription sur la liste d'attente. La survie, la prise de greffe, la fréquence de la réaction aigue et chronique du greffon contre l'hôte et les rechute seront comparées dans les deux groupes. Dans chaque groupe l'évolution des patients après greffe sera étudiée en fonction du statut de la maladie et des différences HLA. Le résultat médical et le coût des différentes stratégies de choix du donneur seront effectuées.

4 – Bruno PHILIPPE – Jean-Paul LATGE – Institut Pasteur Paris

« Etude de la phagocytose d'*aspergillus fumigatus* par le macrophage alvéolaire dans la transplantation pulmonaire »

Résumé :

L'aspergillose invasive (AI) due à *A. fumigatus* est une des causes infectieuses majeures de mortalité dans la greffe d'organes et son incidence est en constante augmentation. Ceci résulte de (1) un diagnostic très difficile et le plus souvent tardif, (2) l'emploi quasi exclusif en thérapeutique de l'Amphotéricine B dont les effets toxiques secondaires sont importants et (3) d'une très mauvaise compréhension de la physiopathologie de la maladie. Les connaissances concernant les interactions hôte-*A. fumigatus* chez les sujets immunocompétents et immunodéprimés restent aujourd'hui très parcellaires. La méconnaissance des mécanismes de la phagocytose des conidies de *A. fumigatus* est confirmée par l'hétérogénéité des résultats rapportés dans la littérature. Nos recherches seront centrées sur les macrophages alvéolaires qui sont responsables du premier contact entre l'hôte et *A. fumigatus* et jouent un rôle primordial dans l'élimination précoce des conidies. L'objectif du programme de recherche est de répondre aux 2 questions suivantes : (1) Quels sont les modèles cellulaires les plus appropriés à l'étude de l'interaction entre *A. fumigatus* et son hôte. Les confrontations conidies/hôte seront effectuées in vivo, ex vivo à l'aide de cellules isolées de l'homme et des animaux ou in vitro (lignées cellulaires). Les études de phagocytose seront comparatives et seront réalisées en présence de facteurs susceptibles de favoriser (corticoïdes) ou de limiter (immunoprotection naturelle ou induite, antifongique) l'invasion aspergillaire. (2) Quels sont les mécanismes mis en jeu par le champignon et la cellule hôte lors des étapes précoces de la germination. Les méthodologies cellulaire, moléculaire et biochimique mises en œuvre permettront d'identifier : (a) les différentes étapes cellulaires de la phagocytose, (b) les mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs responsables de l'élimination de la conidie et leur sensibilité aux traitements immunosuppresseurs et (c) le rôle de différents antigènes fongiques dans l'immunomodulation. Ces études devraient aboutir à une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'infection aspergillaire invasive chez l'hôte immunodéprimé, et en particulier des phases précoces de l'infection, avec comme application un meilleur contrôle thérapeutique de ces infections et une amélioration du diagnostic.

5- Jean-Luc DAVIGNON – INSERM U395 CHU Purpan Toulouse

« Analyse de la réponse lymphocytaire T CD4+ anti-protéine IE1 du cytomégalovirus au cours de greffes d'organes et de moelle osseuse à l'aide de tétramères de HLA-DR-peptide »

Résumé :

Les transplantations de moelle et d'organe représentent un cadre très fréquent d'infection par le cytomégalovirus humain (HCMV) en raison des traitements immunosuppresseurs (60 à 100% des patients sont infectés). Cette infection a une forte incidence sur le rejet du greffon (greffes d'organe) et la réaction de greffon contre l'hôte (greffe de moelle). La réponse T CD4+ anti-protéine très précoce IE1 représente une composante importante de la réponse immune anti-HCMV chez les sujets sains infectés de façon latente. Les hypothèses que nous formulons sont les suivantes : l'intensité de la réponse T CD4+ anti-protéine IE1 du HCMV dans la période post-greffe est un reflet important de l'état de la réponse immunitaire anti-HCMV. L'évolution de cette réponse peut fournir des indications importantes sur l'évolution de la réponse anti-HCMV en général et sur l'évolution vers la pathologie. Nous avons émis l'hypothèse, dans un travail précédent, que la réponse T CD4+ anti-IE1 pourrait contrôler l'infection in vivo selon des mécanismes propres (cytokines, cytotoxicité). Les objectifs sont les suivants : obtenir des tétramères de HLA-DR + peptide IE1 en utilisant la technologie dérivée de celle développée pour les tétramères de HLA-A2-peptide. Marquer les PBMC de patients HCMV+ greffés grâce à ces réactifs. Confronter les résultats avec les données cliniques. Trier par cytométrie de flux les cellules T CD4+ anti-E1 marquées et les cloner.

Vaz-Santiago J, Lule J, Rohrlich P, Jacquier C, Gibert N, Le Roy E, Betbeder D, Davignon JL, Davrinche C. **Ex vivo stimulation and expansion of both CD4(+) and CD8(+) T cells from peripheral blood mononuclear cells of human cytomegalovirus-seropositive blood donors by using a soluble recombinant chimeric protein, IE1- pp65.** J. Virol. 2001 Sept ; 75(17) :7840-7.