

## AOR "Recherche et Greffe"

### Résumés et résultats

2006 - 2023

Cliquer sur les titres pour accéder au détail des projets

Nom et institution	Titre	Année AOR
COHEN Jacques H.M. - Hôpital R.Debré, REIMS	<a href="#">Dépôt érythrocytaire du fragment C4d du Complément. Mécanismes et régulation. Intérêt diagnostique du rejet humoral en transplantation.</a>	2006
ELJAAFARI Assia - HCL - Lyon	<a href="#">Développement d'une microméthode permettant de mesurer le profil de réponse T alloréactive locale et systémique vis-à-vis d'un greffon d'organe ou de tissus composites.</a>	2006
LE MAUFF Brigitte - INSERM U643 - CHU de Nantes	<a href="#">Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique</a>	2006
RONCO Pierre - Hôpital TENON, APHP	<a href="#">Glomérulonéphrite extramembraneuse après transplantation de rein ou de cellules hématopoïétiques: Identification des antigènes cibles.</a>	2006
CHARREAU Béatrice - INSERM U643 - CHU Nantes	<a href="#">Développement d'un cross match endothélial post-greffe, spécifique du couple donneur-receveur, chez des patients transplantés rénaux</a>	2007
EMILIE Dominique - INSERM U 764 - Clamart	<a href="#">Cellules dendritiques tolérigènes en transplantation: un nouveau modèle de souris transgéniques pour la compréhension de la tolérance au greffon.</a>	2007
LEGEMBRE Patrick - UMR CNRS 5164 - Bordeaux	<a href="#">Etude du signal de mort déclenché par l'Acide Mycophénolique - vers un dosage du MMF</a>	2007
VAN MEERJWIJK Joost - INSERM U563 CHU de TOULOUSE	<a href="#">Induction de la tolérance aux allogreffes avec des lymphocytes T régulateurs</a>	2007
PICARD Nicolas - INSERM	<a href="#">POLYCIS : polymorphisme des cibles protéiques des immunosuppresseurs et réponse au traitement en transplantation</a>	2008
RETIERE Christelle - EFS- Pays de Loire	<a href="#">Contribution à l'étude fonctionnelle du récepteur activateur KIR2DS1 dans l'alloréactivité cellulaire NK</a>	2008
ROUAS-FREISS Nathalie - CEA	<a href="#">Applications diagnostique et thérapeutique de HLA-G en transplantation</a>	2008

Nom et institution	Titre	Année AOR
SANQUER Sylvia - Necker - APHP	<a href="#">Multiplex "immunosup" test : dosage simultané d'un panel de biomarqueurs pour le suivi de l'état d'immunosuppression</a>	2008
SIEWEKE Michael - INSERM	<a href="#">Amplification des monocytes ex vivo à but de thérapie cellulaire régénérative d'organes</a>	2008
TAUPIN Jean-Luc - Université de Bordeaux	<a href="#">Immunisation anti-MICA survenant en l'absence d'anticorps anti-HLA et de facteur de risque d'allo-immunisation</a>	2008
ANEGON Ignacio - INSERM U643, CHU de Nantes	<a href="#">Induction de cellules dendritiques tolérogènes par le monoxyde de carbone</a>	2009
LE MAUFF Brigitte - Gilles BLANCHO - ITERT - CHU de Nantes	<a href="#">Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique (suite)</a>	2009
AUGE Nathalie - INSERM U858 CHU de TOULOUSEI	<a href="#">Rôle de l'alloréaction humorale dans le développement de la vasculopathie de transplantation</a>	2010
EZINE Sophie - INSERM	<a href="#">Molecular characterization of T cell engagement : towards an immunotherapy of transplantations</a>	2010
LEFEVRE Annick - INSERM U846	<a href="#">Evaluation de l'empreinte parentale dans la lignée ES de singe Rhésus LYON-ES1 et après différenciation en précurseurs neuronaux et cellules neuronales in vitro ou in vivo</a>	2010
COHEN José - INSERM Paris 12	<a href="#">Etude de l'effet bystander des lymphocytes T régulateurs : mécanismes d'action et application thérapeutique</a>	2011
RONDEAU Eric - Tenon - APHP	<a href="#">Nouveaux biomarqueurs non invasifs de néphrotoxicité de la ciclosporine : approche transcriptomique appliquée à la clinique</a>	2011
AUGE Nathalie - INSERM	<a href="#">Rôle des sphingolipides et de MMP-2 dans le développement du rejet chronique vasculaire médié par l'alloréaction humorale</a>	2012
CHAMPAGNE Eric - Inserm ADR Midi-Pyrénées, Limousin	<a href="#">Facteurs immunologiques associés à la persistance du virus de l'hépatite E chez les transplantés d'organes</a>	2012
CHARREAU Béatrice - ITERT - INSERM U643 - CHU de Nantes	<a href="#">Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon</a>	2012

Nom et institution	Titre	Année AOR
CHARREAU Béatrice - Université de Nantes	<a href="#">Contrôle immunitaire de la réponse anti-CMV et alloréactivité croisée ciblant les cellules endothéliales du greffon : définition et analyse d'un nouveau facteur de risque</a>	2013
HILLION Sophie - Université de Brest	<a href="#">Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B au cours du rejet chronique humoral d'allogreffe</a>	2013
VIDAL-TRECAN Gwenaëlle & Yvon CALMUS - Paris Descartes	<a href="#">Information aux futurs receveurs sur les risques liés aux dons : Evaluation des préférences des patients et des professionnels</a>	2013
GUILLONEAU Carole - ITERT - INSERM U643 - CHU de Nantes	<a href="#">Tregs CD8+ spécifiques du donneur en allo-transplantation: d'un modèle animal à une application clinique?</a>	2014
JAISSER Frederic - INSERM	<a href="#">Le Récepteur Minéralocorticoïde Vasculaire : Acteur au cours de l'ischémie Reperfusion et Cible Thérapeutique en Transplantation Rénale</a>	2014
AUGE Nathalie - INSERM U1048, CHU de Toulouse	<a href="#">Jonctions communicantes et connexines, nouvelles cibles de l'immunité humorale dans la vasculopathie de transplantation</a>	2015
BACCHETTA Justine - INSERM U1033, HCL, Lyon	<a href="#">Suivi de la microarchitecture osseuse par tomographie périphérique quantitative de haute résolution chez le patient transplanté</a>	2015
CHIFFOLEAU Elise - ITUN - INSERM U1064 - CHU de Nantes	<a href="#">Déterminer le rôle de CLEC-1 dans les cellules dendritiques humaines et la polarisation des LT CD4+ Th17</a>	2015
JABRANE-FERRAT Nabila - UMR1043 UMR 4282, CNRS CHU de Toulouse	<a href="#">Cellules Natural Killer et virus de l'hépatite E : complices ou rivaux dans la transplantation d'organes ?</a>	2016
AUGE Nathalie - INSERM U1048, CHU de Toulouse	<a href="#">Immunité humorale et hyperplasie intinale au cours du rejet de greffe: Rôle des connexines et recherche de marqueurs</a>	2017
McILROY Dorian - EA4271, Nantes	<a href="#">Obtention et évaluation in vitro des anticorps humains monoclonaux neutralisant le polyomavirus BK</a>	2017
FARGE Dominique - Saint-Louis - APHP	<a href="#">THERAPIE CELLULAIRE: Analyse des déterminants immunologiques de la réponse clinique observée après Traitement par Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) Allogéniques chez les patients atteints de Sclérodémie Systémique</a>	2018

Nom et institution	Titre	Année AOR
TAOUFIK YASSINE - UMR 1184 - APHP	<a href="#">Néphropathie à BK-virus : épuisement des lymphocytes T spécifiques du BK-virus et restauration fonctionnelle</a>	2018
GUCHET Xavier - COSTECH EA2223 - UTC Compiègne	<a href="#">Innovations technologiques et greffe d'organes : enjeux réglementaires, éthiques et culturels (acronyme : ITEGOREC)</a>	2020
COUZI Lionel - CNRS-UMR 5164, Bordeaux	<a href="#">Immunothérapie cellulaire gamma-delta anti-cytomegalovirus après transplantation d'organe : étude préclinique</a>	2021
IVANOVIC Zoran - EFS - Bordeaux	<a href="#">Pré-conditionnement des cellules stromales mésenchymateuses ex vivo avec alpha-tocophérol : accélération de la régénération osseuse ?</a>	2022
TAUPIN Jean-Luc - INSERM U976 HIPI - Labo HLA - Hôpital Saint-Louis	<a href="#">Immunsation par anticorps anti-HLA en transplantation d'organe : comprendre les épitopes allogéniques pour mieux les utiliser</a>	2022

Année: 2006

## Dépôt érythrocytaire du fragment C4d du Complément. Mécanismes et régulation. Intérêt diagnostique du rejet humoral en transplantation.

COHEN Jacques H.M. - Hôpital R.Debré, REIMS

[Retour tableau](#)

### Résumé

Le diagnostic de rejet en transplantation, même aidé d'une biopsie, est souvent difficile du fait des nombreuses causes de dysfonctionnement des organes transplantés telles que infections, complications chirurgicales, récurrence de la maladie initiale, toxicité médicamenteuse ...De plus, l'intrication de plusieurs facteurs rend souvent le diagnostic de rejet et de son type particulièrement difficile. La molécule C4 du complément, est une molécule susceptible de fixation covalente en quelques secondes lorsqu'elle activée. Elle peut ensuite être dégradée jusqu'au dernier fragment C4d, restant fixé localement par cette liaison covalente. Il n'y a pas de récepteur connu pour le C4d. En transplantation rénale, des dépôts de C4d autour des capillaires péri-tubulaires ont été observés dans des cas de rejets humoraux aigus, parfois même en l'absence d'infiltrations cellulaires de dommages vasculaires ou d'autres dépôts de fragments du complément. Une telle constatation a été étendue dans les transplantations d'autres organes (cœur, foie, pancréas...). La détection de C4d en tant qu'outil diagnostique a été retenue par de nombreuses équipes bien que la lecture des dépôts de C4d soit parfois difficile sur des biopsies de situations complexes réduisant ainsi son intérêt clinique. La présence accrue de C4d à la surface des érythrocytes dans les pathologies à complexes immuns a été constatée et proposée comme marqueur de poussées du lupus érythémateux disséminé. Nous avons réalisé une étude préliminaire par cytométrie de flux du dépôt de C4d érythrocytaire de transplantés rénaux et observé un dépôt lors de rejets vasculaires aigus, mais aussi à un niveau plus faible chez des patients montrant des lésions histologiques compatibles avec la participation d'un rejet humoral aux dysfonctionnements même tardif de leur greffon. Réciproquement, aucun dépôt de C4d n'a été observé à la surface des érythrocytes de sujets transplantés ayant bénéficié de suites favorables. Ce résultat semble donc indiquer le potentiel de la détection de C4d à la surface d'érythrocytes en transplantation d'organes comme un test sensible et non invasif pour le diagnostic du rejet humoral. Nous comptons poursuivre l'étude préliminaire réalisée en transplantation rénale, d'une part dans une étude contrôlée multicentrique plus large permettant d'évaluer plus finement la valeur prédictive, la sensibilité, la spécificité de ce test et les interférences thérapeutiques éventuelles, d'autre part dans la transplantation d'autres organes dans une cohorte de transplantations cardiaques où les biopsies itératives sont une réelle contrainte pour les patients. Le mécanisme du dépôt de C4d sur les érythrocytes sera également étudié à la recherche de ses cibles et des récepteurs éventuellement impliqués ainsi que des facteurs sériques d'activation et d'inhibition de ce dépôt. Leur évolution en transplantation d'organes lors des situations de rejet sera également étudiée.

### Résultats

Haidar, F., A. Kisserli, T. Tabary, B. McGregor, L. H. Noel, B. Réveil, O. Toupance, et al. 2012. « Comparison of C4d Detection on Erythrocytes and PTC-C4d to Histological Signs of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: C4d on Erythrocytes and PTC-C4d in ABMR ». American Journal of Transplantation 12 (6): 1564-75.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Développement d'une microméthode permettant de mesurer le profil de réponse T alloréactive locale et systémique vis-à-vis d'un greffon d'organe ou de tissus composites.

ELJAAFARI Assia - Hôpital Edouard HERRIOT, LYON

[Retour tableau](#)

### Résumé

Un traitement immunosuppresseur au long cours accompagne toujours les greffes d'organes ou de tissus composites. Mais il expose à des effets secondaires graves, notamment des cancers dont la fréquence augmente au cours du temps. Définir l'état de tolérance stable vis-à-vis d'un organe ou d'un tissu transplanté permettrait d'espérer réduire cette immunosuppression. Il a été montré chez l'animal la présence de lymphocytes T régulateurs infiltrant les organes ou tissus greffés et induisant une tolérance périphérique. Dans cette situation, les lymphocytes T régulateurs non seulement inhibent les fonctions des lymphocytes T alloréactifs, mais parviennent également à les contrebalancer en nombre, grâce à leur capacité à induire l'émergence de nouveaux lymphocytes T régulateurs à partir de lymphocytes T naïfs. Récemment, nous avons démontré chez deux patients ayant été greffés des deux mains, qu'il était possible d'isoler des lymphocytes T à partir d'échantillon biopsique prélevé au sein du tissu greffé, et d'analyser leur fonction après expansion. Chez le premier patient greffé, une réponse de type suppressive vis-à-vis du greffon a été mise en évidence, 3 ans post-greffe. Alors que chez le second patient, la présence de lymphocytes T cytotoxiques semblait prédominer aux temps précoces post-greffe. En l'absence d'une mesure quantitative des ARN messagers caractéristiques des lymphocytes T régulateurs et des lymphocytes T effecteurs, et du suivi de la balance entre ces deux réponses au cours du temps, il nous semble difficile de pouvoir définir un état de tolérance stable, chez le premier patient. De plus, la technique cellulaire que nous avons utilisée était longue, laborieuse et couteuse en cellules. Elle est donc difficilement adaptable au suivi régulier des greffés d'organes ou de tissus. C'est pourquoi, afin de mieux suivre les patients greffés, nous proposons de développer au sein de notre unité, une microtechnique de réaction mixte lymphocytaire, permettant de quantifier les différents profils d'une réponse alloréactive T de type TH1, TH2, T régulatrice, ou T inflammatoire, et de suivre leur évolution au cours du temps. Ceci nous permettra de détecter une modification d'équilibre, en faveur d'une réponse de type régulatrice, au sein des tissus ou organes greffés. De plus, comparer ces réponses à celles de lymphocytes T issus du sang périphérique nous semble également intéressante, si nous voulons démontrer la présence préférentielle de cellules T régulatrices au sein de l'organe ou du tissu greffés, tel que démontré chez l'animal.

### Résultats

Eljaafari, Assia, Yin-Ping Li, et Pierre Miossec. 2009. « IFN- $\gamma$ , as Secreted during an Alloresponse, Induces Differentiation of Monocytes into Tolerogenic Dendritic Cells, Resulting in FoxP3+ Regulatory T Cell Promotion ». The Journal of Immunology 183 (5): 2932-45.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

## Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique

LE MAUFF Brigitte - CHU NANTES, INSERM U643/ITER, Nancy

[Retour tableau](#)

### Résumé

La survie à long terme d'une allogreffe n'est obtenue en clinique que grâce à une immunosuppression dont les effets secondaires restent majeurs. L'induction d'une tolérance au greffon est un objectif qui peut être atteint chez le rongeur mais reste difficile à transposer chez le primate. L'un des stratégies pour y parvenir consiste à bloquer des signaux de costimulation nécessaires à l'induction de la réponse immune contre le greffon, en particulier ceux issus des interactions CD40/CD40L et CD28/B7. Le blocage de ces voies est capable d'induire des cellules régulatrices chez le rongeur, mais leur blocage chez le primate par des anticorps monoclonaux anti-CD40L associés au CTLA4Ig, inhibiteur de la voie Cd28 et CTKLA4, a seulement permis de prolonger la survie des greffons. Nous voulons utiliser dans un modèle primate de nouveaux inhibiteurs de ces signaux, d'une part le CD40Ig et d'autre part une molécule de fusion sc28-AT qui inhibe spécifiquement la liaison B7 à CD28 mais ménage les interactions avec CTLA4 dont le rôle inhibiteur est bien établi. Des taux efficaces de ces molécules seront obtenus grâce à des vecteurs viraux de type AAV (AAV1 ou AAV8). Lorsque le plateau d'expression des transgènes sera atteint (2 mois) les animaux, macaques fascicularis, recevront une greffe de rein. La survie du greffon sera évaluée sur l'évolution de la fonction rénale. La capacité de réponse humorale à des antigènes tiers sera évaluée. En cas de survie prolongée du greffon, une greffe de peau provenant du même donneur sera pratiquée et comparée à une greffe d'un sujet tiers afin d'évaluer si cette acceptation est spécifique du donneur ou liée à une immunosuppression prolongée. L'effet sur les réponses mémoires et l'éventuelle induction d'auto-réactivité seront contrôlés. Nous attendons de ce protocole l'induction de cellules tolérogènes spécifiques des alloantigènes qui après extinction de l'expression des transgènes respectent les capacités de réponse du système immunitaire.

### Résultats

Angin, Mathieu, Nicolas Poirier, Nahzli Dilek, Caroline Le Guiner, Alice Toromanoff, Antoine Blancher, Yan Chereh, et al. 2012. « Gene Transfer of Human CD40Ig Does Not Prevent Rejection in a Non-Human Primate Kidney Allotransplantation Model ». *Transplant Immunology* 27 (4): 139-45.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

## Glomérulonéphrite extramembraneuse après transplantation de rein ou de cellules hématopoïétiques: Identification des antigènes cibles.

RONCO Pierre - Hôpital Tenon, 75020 PARIS

[Retour tableau](#)

### Résumé

La physiopathologie des glomérulopathies extramembraneuses (GEM) est mal connue, ce qui limite les possibilités thérapeutiques (absence de biomarqueurs circulants et d'antigènes identifiés). Nous avons identifié le premier antigène cible, l'endopeptidase neutre, dans une petite population d'enfants atteints de GEM anténatale. Nos résultats et les études expérimentales (Néphrite de Heymann) suggèrent que les antigènes cibles sont podocytaires. Les GEM survenant dans un contexte d'alloimmunisation peuvent être diagnostiquées précocement (contrairement à la plupart des GEM « idiopathiques ») quand il existe encore des anticorps néphritogéniques circulants. L'objectif principal est d'identifier des antigènes podocytaires impliqués dans le développement de GEM se développant dans un contexte d'alloimmunisation (GEM de novo ou récurrente après transplantation rénale, GEM après greffe de moelle ou de cellules souches allogéniques). Les objectifs secondaires sont de mettre au point des dosages des anticorps néphritogènes circulants, et ultérieurement des méthodes d'immunosuppression spécifique (induction de tolérance aux peptides immunodominants). Méthodologie : les patients seront recrutés en France et à l'étranger (NIH, Allemagne) en utilisant notamment les canaux de la Société Francophone de Transplantation. Vingt sérums sont déjà en cours d'étude dont six nous ont mis sur la piste d'antigènes podocytaires spécifiques. Les sérums sont étudiés par immunofluorescence indirecte sur une série de sections de rein humain normal et par Western blot sur des extraits podocytaires humains. En cas de réactivité, les antigènes seront identifiés par les techniques récentes de protéomique que nous avons adaptées au laboratoire, incluant des étapes successives de purification suivies d'électrophorèse bidimensionnelle et de spectrométrie de masse (MALDI-TOF et LC-MS/MS). Les épitopes immunodominants seront caractérisés par les techniques de PEPSPOT et d'ELISPOT, et des dosages ELISA des anticorps néphritogènes seront mis au point. En outre, les antigènes identifiés chez les patients atteints de GEM « alloimmunes » seront recherchés par microscopie confocale dans les dépôts extramembraneux chez les patients atteints de GEM « idiopathique ». Résultats attendus : l'identification des antigènes cibles permettra de développer des outils de surveillance (dosage des anticorps circulants) et de nouvelles méthodes thérapeutiques (désensibilisation peptidique). Elle peut également éclairer la physiopathologie des GEM « idiopathiques » qui touchent environ 12 000 malades en France, dont 20 à 40 % évoluent vers l'insuffisance rénale « terminale ».

### Résultats

Debiec, H., et P. Ronco. 2007. « Fetomaternal Alloimmunization with Antenatal Glomerulopathies ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1110 (1): 559-66.

Ronco, P., et H. Debiec. 2007. « Target Antigens and Nephritogenic Antibodies in Membranous Nephropathy: Of Rats and Men ». *Seminars in Immunopathology* 29 (4): 445-58.

Ronco, Pierre, et Hanna Debiec. 2007. « Podocyte Antigens and Glomerular Disease ». *Nephron Experimental Nephrology* 107 (2): e41-46.

[Retour tableau](#)

Année: 2007

## Développement d'un cross match endothélial post-greffe, spécifique du couple donneur-receveur, chez des patients transplantés rénaux

**CHARREAU Béatrice** - INSERM U 643

CHU Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

Par l'expression des molécules du HLA de classe I et de classe II, les cellules endothéliales du greffon sont la première cible cellulaire des anticorps allospécifiques préformés ou induits posttransplantation. Les mécanismes résultants de cette interaction sont multiples et leurs implications dans les différents types de rejet ne sont pas encore clairement établies. L'objectif principal de ce projet est de réaliser un cross-match endothélial post-greffe sur une cohorte de receveurs d'une transplantation rénale pour évaluer la valeur prédictive d'un cross-match endothélial précoce postgreffe (CME). Ces patients (n = 52 à ce jour) ont reçu des greffons issus de donneurs d'organes pour lesquels nous avons pu isoler des cellules endothéliales. Pour chacune de ces transplantations, nous possédons des sérums pré- et post-greffe (n = 510 au total) qui seront analysés, par cytométrie de flux, pour la recherche d'anticorps réagissant avec les cellules endothéliales du donneur. L'objectif secondaire de ce projet est de poursuivre le développement et la caractérisation d'une collection de cultures de cellules endothéliales primaires issues de donneurs d'organes prélevés dans notre centre pour l'étude de l'alloréactivité endothéliale donneur-spécifique. A ce jour, nous disposons de 33 cultures de cellules endothéliales issues de donneurs d'organes et correspondant à 52 transplantations rénales réalisées dans notre centre entre 1999 et 2006. Une des perspectives de ce projet est de développer un test relativement simple qui pourrait trouver une place dans le suivi des patients greffés en complément des bilans biologiques, de la recherche d'anticorps anti-HLA et des ponctions-biopsies du greffon.

### Résultats

Canet, Emmanuel, Julie Devallière, Nathalie Gérard, George Karam, Magali Giral, Béatrice Charreau, et Stéphanie Coupel. 2012. « Profiling Posttransplant Circulating Antibodies in Kidney Transplantation Using Donor Endothelial Cells »: *Transplantation* 93 (3): 257-64.

Guitton, C., A. Cottureau, N. Gerard, T. Quillard, A. Chauveau, J. Devalliere, P. Tonnerre, et B. Charreau. 2011. « Protective Cross Talk between Activated Protein C and TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells: Implication of EPCR, Noncanonical NF- B, and ERK1/2 MAP Kinases ». *AJP: Cell Physiology* 300 (4): C833-42.

Guitton, Christophe, Nathalie Gérard, Thibaut Quillard, et Béatrice Charreau. 2011. « Circulating Endothelial Cell Protein C Receptor: Endothelial Regulation and Cumulative Impact of Gender and A3 Haplotype ». *Journal of Vascular Research* 48 (4): 336-46.

Guitton, Christophe, Nathalie Gérard, Véronique Sébille, Cédric Bretonnière, Olivier Zambon, Daniel Villers, et Béatrice Charreau. 2011. « Early Rise in Circulating Endothelial Protein C Receptor Correlates with Poor Outcome in Severe Sepsis ». *Intensive Care Medicine* 37 (6): 950-56.

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

## Objectif:

Détecter et caractériser les anticorps circulants post-transplantation capables de réagir avec l'endothélium du greffon et évaluer leur impact sur la survie de la greffe

## Méthodologie

Développement d'un cross match endothélial (ECXM) post-greffe, spécifique du couple donneur-receveur, chez des patients transplantés rénaux

1. Isolement et culture de cellules endothéliales du donneur au moment de la transplantation (Biocoil DIVAT INSERM)
2. Traitement des CE par des cytokines pour une expression optimale des molécules du HLA et autres antigènes membranaires

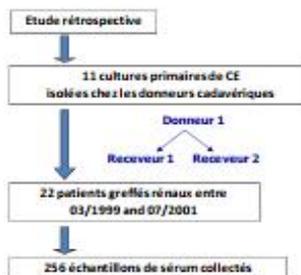


3. Réalisation du cross match endothélial (ECXM) par incubation des sérums post-greffe du receveur avec les cellules endothéliales du donneur

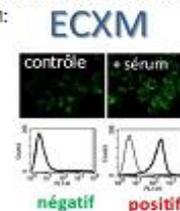


4. Analyse rétrospective des anticorps post-greffe d'une cohorte de transplantés pour lesquels des cultures de cellules endothéliales du donneur étaient disponibles.

## Design de l'étude

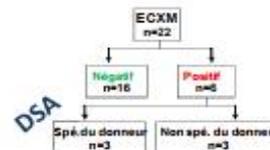


Exemple de détection d'anticorps post-greffe réagissant avec les cellules endothéliales et détectés par ECXM:



## Principaux résultats

Patients (n=22)



### ECXM +

- 27,3% des patients transplantés rénaux
- forte association à l'immunisation anti-HLA post-greffe
- spécifique du donneur (DSA) dans 50% (anti-HLA class II)
- détection d'anticorps non DSA dans 50% des cas
- titre non lié à la spécificité anti-donneur de l'alloréactivité
- IgG1 : isotype majoritairement impliqué

### Impact clinique:

ECXM+ associé à des DSA: rejet humoral et perte de greffon à 10 ans  
ECXM+ associé à des anticorps non DSA: créatininémie ( $133.1 \pm 44.2$   $\mu\text{mol/L}$ ) et protéinurie ( $0.13 \pm 0.06$  g/24h) normales 10 post-greffe

Les résultats de cette étude ont été publiés dans « Transplantation »  
Canet E., Devallière J., Gérard N., Karam, G., Giral M., Charreau B. and Coupel S., Profiling post-transplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor-specific endothelial cells. *Transplantation*, 2012; 93(3):257-64.

Béatrice Charreau, équipe 5/INSERM UMR1064, CRTI, Labex Transplantex, Labex IGO, CHU de Nantes

**Année: 2007**

## Cellules dendritiques tolérigènes en transplantation: un nouveau modèle de souris transgéniques pour la compréhension de la tolérance au greffon.

**EMILIE Dominique** - INSERM U 764

Clamart

[Retour tableau](#)

### Résumé

Les cellules dendritiques (CD) jouent un rôle central dans la décision du système immunitaire d'être tolérant ou de répondre à un antigène. Nous avons montré chez l'homme que la protéine GILZ (Glucocorticoid-induced leucin zipper), induite dans les CD par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le TGFbeta, contribue à cette décision de la CD, avec pour conséquence une induction de lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigène. Nous avons généré des souris surexprimant de manière nonrégulable GILZ dans les CD, avec des résultats préliminaires indiquant des phénomènes de tolérance immunitaire. Nous utiliserons ce modèle pour démontrer qu'il est possible d'induire une tolérance en transplantation par le biais de CD surexprimant GILZ. Dans une partie du projet, ces CD seront utilisées ex vivo pour stimuler des lymphocytes T allogéniques. Nous analyserons en particulier l'induction de lymphocytes T régulateurs/suppresseurs dans ce modèle, et nous caractériserons les mécanismes de l'inhibition. Dans une autre partie du projet, nous chercherons à démontrer qu'in vivo des CD surexprimant GILZ permettent une survie prolongée de greffons cutanés, en essayant de mettre en évidence le rôle prépondérant des CD du donneur ou du receveur dans l'induction de tolérance. Ce projet, d'une durée d'un an, a pour objectif de prouver le concept d'une induction de tolérance allogénique par des CD surexprimant GILZ, et de jeter les bases d'une étude ultérieure plus ambitieuse, notamment pour sa composante in vivo, au cours de laquelle seraient explorés dans le détail les mécanismes de la tolérance allogénique induite par les CD surexprimant GILZ.

[Retour tableau](#)

Année: 2007

## Etude du signal de mort déclenché par l'Acide Mycophénolique - vers un dosage du MMF

**LEGEMBRE Patrick** - UMR CNRS 5164

Univ Bordeaux-2

[Retour tableau](#)

### Résumé

L'acide mycophénolique (AM) est un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme essentielle pour la biosynthèse de novo de purine. Cet immunosuppresseur est utilisé en transplantation pour contenir la réponse allo-immune et éviter le rejet de l'organe greffé. Cependant le mécanisme moléculaire responsable de la mort des lymphocytes activés reste inconnu. Nos résultats préliminaires indiquent que l'AM déclenche un signal de mort qui biochimiquement et morphologiquement ressemble à de l'apoptose (condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN) mais qui est indépendant de l'activation des caspases. A ce jour, le signal apoptotique a toujours été associé à l'activité des caspases, il semble donc que cet immunosuppresseur induit une mort non-conventionnelle. Nos objectifs vont être 1) de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans cette mort, ce qui permettra ensuite 2) de développer un moyen efficace pour doser fonctionnellement l'acide mycophénolique présent dans le sérum de patients greffés. Nous possédons des cibles potentielles impliquées dans cette voie de mort caspase-indépendante. En effet, il a été rapporté que la voie des MAP kinase appelée Jun Kinase (JNK) est responsable des signaux de mort indépendants des caspases lors de la production de radicaux libres. Certains autres facteurs ont été impliqués dans des voies dites «nécrotiques» comme la protéine adaptatrice FADD et la sérinéthréonine kinase RIP. L'utilisation de lignées lymphomateuses T dépourvues de FADD ou de RIP, nous permettra de déterminer rapidement l'implication de ces protéines dans le signal déclenché par l'AM. En parallèle, nous réaliserons une étude plus générale afin de caractériser les voies de signalisation induites par l'acide mycophénolique. Pour caractériser les signaux de stress induits lors du traitement par l'acide mycophénolique, nous isolerons des lymphocytes du sang périphérique, les activerons et nous étudierons les facteurs de transcription induit par l'acide mycophénolique. L'activation de différentes voies de signalisation lors du traitement aboutira à l'activation de facteurs de transcription potentiellement impliqués dans le signal de mort. Ces facteurs de transcription seront étudiés en utilisant des puces à facteurs de transcription développées par Panomics (TranSignal™ TF-TF Interaction Array). Cette méthode permet de déterminer, de manière extrêmement sensible, l'activité de 96 facteurs de transcription différents. Nous définirons ainsi le profil des voies de signalisation induit lors du traitement par l'AM. Le rôle tenu par ces voies dans l'induction du signal caspase-indépendant déclenché par l'AM sera ensuite étudié plus en détail en utilisant des techniques classiques de biologie moléculaires, de biochimie et de biologie cellulaire (ex : transfection de siRNA, expression de dominant négatif). La caractérisation du signal responsable de la mort cellulaire induite par l'acide mycophénolique permettra de définir des cibles moléculaires dont l'expression ou l'activité sera corrélée à l'intensité du signal AM. Donc ces molécules seront utilisées pour générer des tests permettant de doser spécifiquement la quantité d'AM présent dans le sérum de patient transplanté.

### Résultats

Chaigne-Delalande, Benjamin, Gwendaline Guidicelli, Lionel Couzi, Pierre Merville, Walid Mahfouf, Stéphane Bouchet, Mathieu Molimard, Benoit Pinson, Jean-François Moreau, et Patrick Legembre. 2008.

« The Immunosuppressor Mycophenolic Acid Kills Activated Lymphocytes by Inducing a Nonclassical Actin-Dependent Necrotic Signal ». *The Journal of Immunology* 181 (11): 7630-38.

Chaigne-Delalande, Benjamin, Gwendalline Guidicelli, Lionel Couzi, et Patrick Legembre. 2009. « An Atypical Necrotic Signal Induced by Immunosuppressive and Anti-Viral Agents ».

Chaigne-Delalande, Benjamin, Jean-François Moreau, et Patrick Legembre. 2008. « Rewinding the DISC ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 56 (1): 9-14.

[Retour tableau](#)

Année: 2007

## Induction de la tolérance aux allogreffes avec des lymphocytes T régulateurs

**VAN MEERJWIJK Joost** - INSERM U563

CHU PURPAN

TOULOUSE

[Retour tableau](#)

### Résumé

Depuis les premières expériences scientifiques de transplantation, réalisée par Jacques-Louis Reverdin en 1869, il est apparu que le principal frein à la greffe d'organes restait l'activation du système immunitaire du receveur. La découverte des drogues immunosuppressives, dès les années 60, a permis en partie de contrôler cette forte activation et d'assurer une meilleure survie du greffon. Malheureusement, leur utilisation chez les patients s'accompagne d'effets secondaires importants et d'une augmentation des risques d'infections et de cancers en raison de leur inhibition aspécifique du système immunitaire. De plus, elles se sont révélées incapables de contrôler le développement du rejet chronique, conduisant à une destruction progressive de l'organe greffé. De nombreuses équipes de scientifiques et de médecins se sont donc tournées vers l'induction d'une tolérance aux antigènes du donneur. Une tolérance similaire existe déjà à l'état physiologique vis-à-vis des antigènes du soi. Elle est en grande partie médiée en périphérie par une sous-population lymphocytaire douée de propriétés immunosuppressives : les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+. Ces cellules inhibent le développement des maladies auto-immunes, de l'allergie et ont un effet délétère sur l'immunité antitumorale. Plus intéressant, il a été montré qu'elles étaient aussi indispensables à l'établissement de la tolérance foëto-maternelle, soulevant la question de leur intérêt en transplantation. Notre laboratoire a ainsi montré que, chez des souris préalablement irradiées à des doses sous-létales, les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ activés in vitro de façon appropriée inhibent le rejet d'une moelle osseuse allogénique. De plus, les souris ainsi traitées acceptent une greffe de cœur de même fond génétique. La tolérance induite est durable et, de façon importante, bloque les phases de rejet aigu ainsi que chronique. Forts de ces résultats encourageants, nous souhaiterions étendre notre modèle à un tissu plus immunogène que le cœur, la peau. Bien que notre protocole de pré-conditionnement soit en principe applicable dans la clinique, elle suscite des hésitations chez les cliniciens. Nous souhaiterions par conséquent évaluer si l'irradiation des souris receveuses puisse être remplacée par un préconditionnement moins contraignant. Nous proposons d'affaiblir temporairement le système immunitaire avec des drogues immunosuppressives qui ciblent les cellules effectrices du rejet mais n'affectent pas l'action des lymphocytes T régulateurs (ex. la rapamycine et le FTY720). Nous aimerions également évaluer les mécanismes impliqués dans l'immunosuppression par les Treg dans notre modèle expérimental. Les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ pourraient ainsi servir, à l'avenir, dans des protocoles de thérapie cellulaire visant à l'induction de la tolérance aux allogreffes et limiter l'utilisation des drogues immunosuppressives.

### Résultats

Pasquet, L., J.-Y. Douet, T. Sparwasser, P. Romagnoli, et J. P. M. van Meerwijk. 2013. « Long-Term Prevention of Chronic Allograft Rejection by Regulatory T-Cell Immunotherapy Involves Host Foxp3-Expressing T Cells ». *Blood* 121 (21): 4303-10.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

## POLYCIS : polymorphisme des cibles protéiques des immunosuppresseurs et réponse au traitement en transplantation

PICARD Nicolas - INSERM

[Retour tableau](#)

### Résumé

Le succès d'une greffe d'organe dépend en majeure partie de l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs (IS). Ces médicaments présentent tous des effets indésirables majeurs (toxicité rénale, apparition de cancers, troubles hématologiques, ...) et sont administrés à vie le plus souvent. L'adaptation de posologie des IS pour garantir des concentrations sanguines efficaces et non toxiques a été pratique courante depuis plus de vingt ans, mais est encore aujourd'hui encore loin d'être optimale. Ce projet s'intéresse à la génétique de l'efficacité et de la toxicité des IS. L'utilisation de données génétiques pour identifier les patients présentant un risque de sous-immunosuppression ou à l'opposé un risque d'effets indésirables représente une évolution majeure pour le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) de cette classe médicamenteuse. Cependant la pharmacogénétique est une discipline de recherche relativement nouvelle et la plupart des études sur les IS se sont concentrées sur les relations pharmacogénétique-pharmacocinétique et n'ont pas exploré les relations pharmacogénétique-pharmacodynamie. Ce projet de recherche vise à : (i) identifier les polymorphismes génétiques des gènes des cibles protéiques (ou des protéines associées) des 2 principales classes d'IS actuellement commercialisés (inhibiteurs de la calcineurine et de la m-TOR) ; (ii) étudier les conséquences fonctionnelles de ces mutations sur l'activité constitutive des cibles et sur l'effet inhibiteur des IS, par des approches ex-vivo ; (iii) évaluer l'influence de ces mutations sur des critères cliniques d'efficacité ou de toxicité des IS chez des patients transplantés rénaux. Les deux premières parties du projet (recherche des mutations et études fonctionnelles) seront réalisées à partir d'une collection d'échantillons biologiques (ADN génomique et lymphocytes) constituée à partir de volontaires sains recrutés dans le cadre d'un protocole de recherche clinique multicentrique (Etude GENCOLON). Les relations entre les polymorphismes identifiés et les critères cliniques d'efficacité ou de toxicité seront recherchées rétrospectivement à partir des données de deux essais cliniques coordonnés par l'Unité (plus de 300 patients). Ce projet de recherche est conçu sur un mode translationnel de l'expérimental à la clinique. Il devrait faire la « preuve de concept » de l'utilité de marqueurs génétiques de la réponse aux IS pour l'individualisation thérapeutique des traitements IS et il permettra la mise en place des outils (génétique et analytique) nécessaire à la réalisation d'une étude clinique prospective de validation de ce concept chez des patients transplantés. A terme, l'objectif de cette recherche est de faire bénéficier les patients transplantés d'une « médecine personnalisée » grâce à des tests génétiques précoces.

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

« POLYCIS » : Polymorphismes des cibles moléculaires des médicaments immunosuppresseurs : étude exploratoire pharmacogénétique : le cas de la mTOR

Nicolas PICARD<sup>1</sup>, Jean-Baptiste WOILLARD<sup>1</sup>, Deborah Postil<sup>2</sup>, Pierre MARQUET<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Inserm UMR-S850, Université et CHU de Limoges (nicolas.picard@unilim.fr) ; <sup>2</sup>CIC Limoges

## Contexte

> La mTOR est une sérine thréonine kinase cible d'inhibiteurs immunosuppresseurs (sirolimus, évérolimus) ou anticancéreux (témsirolimus, évérolimus).

> Son principal effecteur est la ribosomal protein S6 Kinase (p70S6K), une protéine proposée comme biomarqueur pharmacodynamique (Peralba et col. 2003; Hartmann et col. 2005) présentant une très importante variabilité d'activité basale et d'inhibition (Fig.1).

Son inhibition est par ailleurs en faible corrélation avec l'exposition sanguine aux inhibiteurs de la mTOR (ImTORS)

## Hypothèses

La variabilité génétique de la mTOR ou de la P70S6K pourrait contribuer aux

> Différences d'activité basale des protéines (expression ou fonction)

> Différences d'effets des ImTORS Et donc potentiellement à la variabilité de réponse thérapeutique

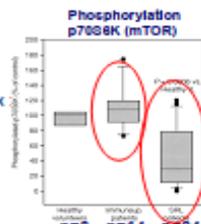


Fig. 1 (Hartmann et col. 2005)

## Objectifs

1- Décrire la variabilité génétique de la mTOR et de la p70S6k à partir des données du projet international HapMap (Nature des SNP et des haplotypes ; fréquences dans la population Française)

2- Etudier l'influence des SNP mTOR sur son expression lymphocytaire (ARNm)

## Méthodes

> Exploitation des données du projet international HapMap (Release 22 ; PHASE II) [hapmap.org] : données du groupe « CEU » : 90 individus (30 trios) Caucasiens → identification des haplotypes et sélection de SNP marqueurs ou "TagSNP" [Logiciel Haploview 4.1]

> Etude chez le volontaire sain (VS ; n=44) :

-CIC de Limoges (23 hommes/21 femmes ; 66±13 ans)

-Extraction d'ADN génomique et d'ARN leucocytaire

-Génotypage des TagSNP (technique TaqMan)

-Identification des haplotypes (logiciel Phase<sup>®</sup> [Stephens et al., 2001])

-Etude d'expression en ARN messenger (PCR TaqMan)

-Analyse statistique (Par haplotype : logiciel Theias<sup>®</sup>

[D. Tregouet; genecanvas.ecgene.net] ; Par SNP : test non paramétrique de Kruskal-Wallis). Etude de corrélation (expression-âge) (test r de Pearson)

## Résultats

> Données HapMap :

-mTOR (gène FRAP1) : 35 SNP (31 introniques ; 4 exoniques synonymes) fréq. 25-45%

-p70S6K (gène RPS6KB1) : mTOR 17 SNP (introniques)

fréq. 7,5-31%

-Structure haplotypique

Les données HapMap ont permis la sélection de TagSNP (Fig.2). Ces TagSNP ont permis l'identification des haplotypes dans la population de VS (la nature et la fréquence des haplotypes étaient conformes aux données HapMap).

- Expression leucocytaire de la mTOR

La distribution de l'expression en ARNm de la mTOR chez les 44 VS est représenté ci-dessous (Fig.3). Aucune association avec les SNP ou haplotypes a été identifiée. L'expression de la mTOR diminue en revanche avec l'âge des VS (Fig.4).



Fig. 2

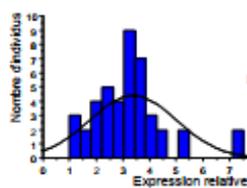


Fig.3

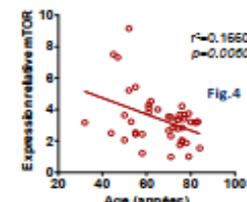


Fig.4

## Conclusion et perspectives

Ce travail confirme l'existence d'une variabilité génétique de la mTOR et de la p70S6K. En revanche, aucune association des SNP avec l'expression en ARNm mTOR chez le VS n'a été mise en évidence. La diminution de l'expression avec l'âge nécessite d'être confirmée avec l'activité biologique mTOR (et P70S6k) mais elle pourrait suggérer qu'une adaptation posologique soit pertinente chez le sujet âgé. Un travail récent faisant suite à cette étude exploratoire a permis de retrouver une association entre un haplotype de la mTOR et l'évolution des concentrations d'hémoglobine chez des patients transplantés traités par sirolimus [Woillard et col. 2012 Pharmacogenetics and genomics]

Année: 2008

## Contribution à l'étude fonctionnelle du récepteur activateur KIR2DS1 dans l'alloréactivité cellulaire NK

RETIERE Christelle - EFS-Pays de Loire

[Retour tableau](#)

### Résumé

La fonction des cellules Natural Killer (NK) est régulée par une balance entre des signaux inhibiteurs et activateurs transmis par différents récepteurs NK, incluant les KIR qui reconnaissent spécifiquement les molécules HLA de classe I. Si la fonction des récepteurs KIR inhibiteurs est bien documentée, le rôle des récepteurs KIR activateurs reste encore énigmatique. Dans cette étude, notre objectif est d'étudier l'expression du récepteur activateur KIR2DS1 et son implication dans la fonction cellulaire NK. Pour cela, nous étudierons l'expression du KIR2DS1 sur les lymphocytes NK et T par cytométrie en flux à partir d'un large panel de donneurs pour lesquels les génotypes HLA et KIR ont été déterminés (au moins 26 donneurs). La fréquence des cellules NK KIR2DS1+ sera analysée en fonction du génotype HLA et de l'expression du KIR2DL1. Pour étudier l'impact fonctionnel du récepteur KIR2DS1, nous étudierons les sous-populations cellulaires NK KIR2DL1/2/3/2DS2- KIR2DS1+ par cytométrie en flux en utilisant un anticorps monoclonal spécifique de KIR (8C11) produit et caractérisé dans notre laboratoire. Cet anticorps 8C11, spécifique du KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 et 2DS2 mais pas du KIR2DS1, sera utilisé en combinaison avec l'EB6 (spécifique du KIR2DL1 et du KIR2DS1) afin de cibler les cellules NK KIR2DL1/2/3/2DS2- KIR2DS1+ identifiées comme cellules NK EB6+ 8C11-. Nous effectuerons les expériences fonctionnelles de dégranulation (CD107a) et de production d'IFN $\gamma$  par cytométrie en flux 4 couleurs, dans lesquelles les cellules NK seront caractérisées par l'absence d'expression du KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 et NKG2A permettant d'exclure une possible modulation de la fonction NK par ces récepteurs NK inhibiteurs. Les pourcentages de cellules NK KIR2DS1+ productrices d'IFN $\gamma$  et exprimant le CD107a seront analysés après stimulation avec les cellules 221 transfectées pour exprimer le ligand C2 en comparaison à ceux observés avec la lignée 221 ou la lignée 221 transfectée pour exprimer le ligand C1. De plus, pour étudier l'impact du récepteur KIR2DS1 sur la fonction des cellules NK, nous inhiberons l'expression du gène KIR2DS1 par RNA interférence. Nous avons construit 5 plasmides lentiviraux recombinants avec 5 shRNA KIR2DS1 différents afin de transduire les cellules NK. La production du lentivirus contrôle est en cours. Ce lentivirus contrôle sera utilisé pour mettre au point la transduction des cellules NK. Les expériences fonctionnelles de dégranulation (CD107a) et de production d'IFN $\gamma$  seront effectuées en ciblant les cellules NK transduites par le lentivirus shKIR2DS1 le plus efficace. Les résultats seront alors comparés à ceux obtenus sans RNA interférence afin de définir l'impact du KIR2DS1 sur la fonction cellulaire NK. Ces résultats doivent permettre de mieux définir le rôle du récepteur KIR2DS1, qui peut jouer un rôle significatif dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques dans laquelle un rôle majeur des gènes KIR activateurs a été fortement suggéré.

### Résultats

Morvan, Maelig, Gaëlle David, Véronique Sébille, Aurore Perrin, Katia Gagne, Catherine Willem, Nolwenn Kerdudou, et al. 2008. « Autologous and Allogeneic HLA KIR Ligand Environments and Activating KIR Control KIR NK-Cell Functions ». *European Journal of Immunology* 38 (12): 3474-86.

# Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR receptors control KIR NK cell functions

Maelig Morvan<sup>1</sup>, Gaëlle David<sup>1</sup>, Véronique Sébille<sup>2</sup>, Aurore Perrin<sup>1</sup>, Katia Gagne<sup>1</sup>, Catherine Willem<sup>1</sup>, Nolwenn Kerdudou<sup>1</sup>, Laure Denis<sup>1</sup>, Béatrice Clémenceau<sup>2</sup>, Gilles Folléa<sup>3</sup>, Jean-Denis Bignon<sup>1</sup> and Christelle Retière<sup>1</sup>



<sup>1</sup> EA 4271 Immunovirologie et Polymorphisme Génétique, Etablissement Français du Sang, Nantes  
<sup>2</sup> EA 4275 Biostatistique, Recherche Clinique et Mesures Subjectives en Santé, UFR Pharmacie, Nantes  
<sup>3</sup> UMR 892 Centre de Recherche en Cancérologie, Inserm, Nantes

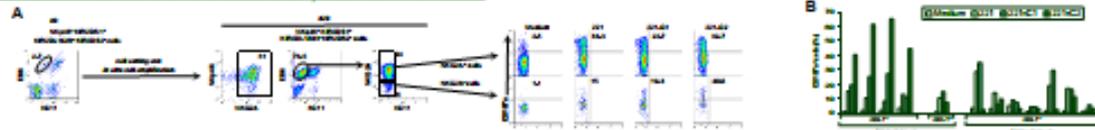


## Introduction

Natural Killer (NK) cells play a key role in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) by eliminating leukemia cells, limiting graft rejection and protecting against graft versus host disease (GvHD). NK cell functions are regulated by a balance between inhibitory and activating KIR receptors, which specifically recognize HLA class I molecules. Although the ligands and functions of inhibitory KIR receptors are well documented, this is not the case for activating KIR receptors. Here, we defined the conditions whereby the NK cells expressing the activating receptor KIR2DS1 could be functional, using a combination of KIR-specific mAb targeting KIR2DS1. Because both KIR2DS1 and its inhibitory counterpart KIR2DL1 recognize C2 ligand, but with opposite signaling pathways, we sought to determine how allogeneic and autologous C2 ligands can modulate the expansion of the KIR2DL1/51 NK cell pool, by using an *in vitro* culture model. This study will contribute to a better understanding of factors regulating KIR NK cell alloreactivity, like the allogeneic HLA environment, the education process via inhibitory KIR-HLA interactions and the activating KIR receptors.

## Results

### KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells are C2 alloreactive only from C2<sup>-</sup> individuals

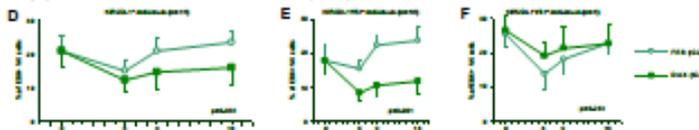


We used a KIR2DL1/2/3 and KIR2DS2 specific mAb (8C11) recently generated in our laboratory, in combination with the KIR2DL1/51-specific EB6 mAb to target KIR2DS1 expression (8C11\*EB6\*) by a specific pattern of binding. Using this mAb combination, KIR2DS1<sup>+</sup> (8C11\*EB6\*) NK cells were characterized by the absence of HLA-Cw specific KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 and 2DS2 expression. (A) KIR2DS1<sup>+</sup>KIR2DL1/2/3-2DS2<sup>-</sup> NK cells (NKp46\*8C11\*EB6\*) were cell sorted from PBMC (d0) and amplified *in vitro* with irradiated allogeneic PBMC and EBV-B cells as feeders. After 3 weeks of stimulation (d20), phenotype of these sorted cells was performed by flow cytometry. These amplified cells are NK cells (NKp46<sup>+</sup>) of which majority are KIR2DS1<sup>+</sup>KIR2DL1/2/3\*2DS2<sup>-</sup> (8C11\*EB6\*) and express the inhibitory NKG2A marker (8C11\*NKG2A<sup>+</sup>). Functional assays were performed on NKG2A<sup>+</sup> and NKG2A<sup>-</sup> gated cell populations and suggesting that a triggering of KIR2DS1 by C2 happened whatever NKG2A expression. (B) Results of CD107a mobilization obtained for KIR2DS1<sup>+</sup> genotyped individuals are presented after stimulation of the NKG2A<sup>+</sup> gated KIR2DL1/2/3-2DS2<sup>-</sup>KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells. Only C2<sup>-</sup> individuals harboring the KIR2DL1 gene expressed CD107a marker when challenged with 221-C2 cell line. Similar results were obtained for IFN- $\gamma$  production (data not shown).

### Impact of allogeneic C2 ligand expression on the evolution of the KIR2DL1/51 NK cell expansion

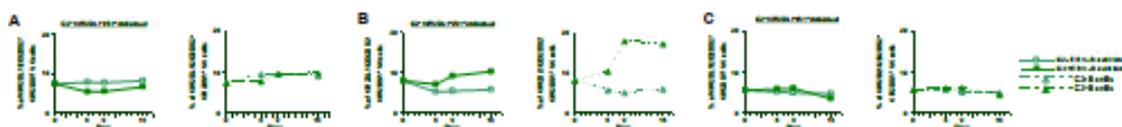


Frequencies of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells, described as NK cells, and EB6<sup>+</sup> NK cells were determined for 16 individuals by flow cytometry at days 0, 6, 9 and 16 following stimulation with the irradiated C2<sup>+</sup> FEB (C1C1, Bw6Bw6) or C2<sup>-</sup> DAX (C2C2, Bw4Bw4) EBV-B cell line at a ratio (PBMC: EBV-B cells) of 10:1. (A) The absolute numbers of total cells and NK cells ( $\times 10^6$  cells) demonstrate a cellular amplification in this model. (B) Absolute numbers ( $\times 10^6$  cells) of EB6<sup>+</sup> NK cells increased although their frequency did not. (C) Evolution of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells frequency is similar after stimulation with C2<sup>+</sup> or C2<sup>-</sup> EBV-B cell lines.



(D) EB6<sup>+</sup> (KIR2DL1/51) cell frequency was significantly higher ( $p=0.038$ ) after stimulation of PBMC with the C2<sup>-</sup> FEB EBV-B cell line (c) compared to stimulation with the C2<sup>+</sup> DAX EBV-B cell line (b) from 16 KIR genotyped individuals. (E) Differential evolution of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell expansion in C2<sup>+</sup> versus C2<sup>-</sup> EBV-B cell stimulating environments in KIR2DL1/51\* genotyped individual groups. (F) Absence of a difference in KIR2DL1/51 NK cell frequency after C2<sup>+</sup> and C2<sup>-</sup> EBV-B cell cocultures in KIR2DL1/51\* genotyped individuals.

### KIR2DS1<sup>+</sup> NK cell frequency is higher after C2<sup>+</sup> than C2<sup>-</sup> cell stimulation in KIR2DL1\* genotyped individuals who do not express C2 ligand



Percentages of KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>\*8C11\*EB6\*) after PBMC stimulation with C2<sup>+</sup> or C2<sup>-</sup> EBV-B cells or B cells are obtained from : (A) C2<sup>+</sup> KIR2DL1/51\* representative individual of 3 studied individuals; (B) C2<sup>+</sup> KIR2DL1/51\* representative individual of 3 studied individuals; (C) one C2<sup>+</sup> KIR2DL1/51\* individual. The KIR2DS1<sup>+</sup> NK cell frequency increased only after stimulation of PBMC from C2<sup>+</sup> KIR2DL1/51\* individuals by C2<sup>+</sup> non EBV-transformed B cells.

## Discussion

We demonstrated for the first time that NK cells expressing the KIR2DS1 receptor are functional in terms of degranulation, cytokine production and proliferation after stimulation by C2<sup>+</sup> target cells, but only from C2<sup>+</sup> individuals. So, from an individual harboring both inhibitory KIR2DL1 and activating KIR2DS1 genes, just one of both KIR receptors is functional, depending on the presence or absence of autologous C2 ligand. Using an *in vitro* cellular model to amplify NK cells, we show that the absence of the cognate C2 ligand leads to a significant increase in KIR2DL1/51 NK cell frequency, which is reinforced in absence of KIR2DS1 gene. In the absence of EBV infection, KIR2DS1<sup>+</sup> NK cell expansion is more important after stimulation by C2<sup>+</sup> B cells from only C2<sup>-</sup> individuals harboring KIR2DL1 gene. Thus, those alloreactive KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells against C2<sup>-</sup> allogeneic cells can be useful in HLA-Cw mismatched HSCT to eliminate C2<sup>-</sup> malignant cells and to select by this way HSCT donors taking into account their activating KIR genes, education of inhibitory KIR NK cells and HLA KIR ligands expressed by the recipient to ensure a good allogeneic response. Further studies are required to assess whether these rules are operative *in vivo* and whether they are adhered to despite different graft parameters.

Année: 2008

## Applications diagnostique et thérapeutique de HLA-G en transplantation

ROUAS-FREISS Nathalie - CEA

[Retour tableau](#)

### Résumé

La participation de la molécule HLA-G aux mécanismes de la tolérance est étudiée depuis plusieurs années par notre groupe. Les résultats obtenus jusqu'à présent confirment le potentiel tolérogène de cette molécule. En effet, l'expression atypique de HLA-G a été démontrée au niveau de transplants tolérés cardiaques, hépatiques et rénaux, ainsi qu'au niveau de cellules présentatrices d'antigènes infiltrant les greffons. De plus, nos études ont permis d'établir une association significative entre l'expression de HLA-G et une réduction de nombre des épisodes de rejet aigu et une absence de rejet chronique chez les patients étudiés. Exprimée par les tissus transplantés, HLAG inhiberait les effecteurs immuns et constituerait donc une protection contre la réaction de rejet. Face au problème de santé publique que représentent les greffes d'organes confrontées au risque majeur de rejet de greffe et au manque d'organe à greffer, notre projet a pour objectif de développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques utilisant la molécule HLA-G. Nous proposons dans le cadre de ce projet de poursuivre deux axes d'investigations :

(i) la validation de l'utilisation diagnostique de HLA-G en tant que marqueur de tolérance dans une étude multicentrique sur de grandes cohortes de patients transplantés, et (ii) l'étude du potentiel thérapeutique de HLA-G en tant que nouvelle molécule tolérogène limitant le rejet de greffe. Pour réaliser ces objectifs, deux équipes du Service de Recherches en Hémato-Immunologie vont potentialiser leur savoir-faire en immunologie et en biologie moléculaire associés à des services cliniques de pointe en transplantation avec des files actives de patients de plus de 2600 malades (Hôpitaux Henri-Mondor, Bicêtre et Paul Brousse). Le caractère ambitieux de ce projet est de permettre aux cliniciens d'utiliser (i) le dosage plasmatique de HLA-G comme indicateur de tolérance à la greffe et sur la base de ce dosage de diminuer voire d'arrêter le traitement immunosuppresseur en cours, et (ii) les propriétés tolérogènes de HLA-G sous forme de protéine de fusion comme alternative aux traitements classiques d'immunosuppression délétères à long terme pour les patients.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

## Multiplex "immunosup" test : dosage simultané d'un panel de biomarqueurs pour le suivi de l'état d'immunosuppression

SANQUER Sylvia - HOP NECKER

[Retour tableau](#)

### Résumé

Objectifs : Tester et valider un nouveau suivi biologique de l'état d'immunosuppression, le multiplex

« »

immunosup test, fondé sur un panel de marqueurs pertinents et complémentaires. L'étude de ce panel de marqueurs est rendu possible par l'utilisation de la spectrométrie de masse, et 3 objectifs seront poursuivis : 1) accroître la sensibilité et la spécificité des techniques existantes, 2) développer le dosage simultané des activités calcineurine, mTOR et IMPDH, 3) inclure de nouveaux biomarqueurs potentiels du rejet dans le panel proposé, comme PF-4, HO-1 et les isoformes -1 et -2 de l'IMPDH

Résultats attendus : Ce projet devrait permettre 1) un suivi fonctionnel du traitement prophylactique du rejet pour l'ensemble des patients transplantés, y compris les enfants, 2) d'avoir une vue d'ensemble des voies de signalisation impliquées lors de l'activation lymphocytaire, 3) d'avoir à disposition une plus large batterie de tests pour prédire le rejet et/ou constituer un critère diagnostique du rejet moins agressif que ne le sont les biopsies actuellement utilisées. La finalité de cette étude est de proposer, dans un avenir proche, des tests biologiques simples, rapides et peu coûteux qui permettent de mieux définir, à l'échelon individuel, la posologie d'immunosuppresseur la mieux adaptée, et la plus faible possible, pour prévenir efficacement le rejet tout en évitant les complications, infectieuses et tumorales, de la «sur-immunosuppression».

Méthodologies : Notre «multiplex immunosup test» sera mis au point en suivant les principes généraux des dosages par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : les molécules à doser seront, en premier lieu, cassées par un spectromètre de masse triplequadripole, les différents fragments « fils » ainsi générés seront analysés, et l'on sélectionnera les 2 « transitions » (de l'ion parent aux ions fils) les plus représentatives de chacune des molécules à doser. En fonction des résultats obtenus, nous réaliserons une séparation chromatographique préalable plus ou moins poussée afin que les molécules à doser puissent être quantifiées spécifiquement en un minimum de temps. Nous réaliserons ensuite la validation biologique de ces nouveaux dosages à l'aide de cultures de cellules mononuclées activées ou non, en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques. Finalement, nous procéderons à la validation clinique de ces dosages en utilisant les banques de protéines et d'ARN que nous avons établies lors de 2 études cliniques, CALCICLO en greffe de moelle osseuse et CALCICOEUR en greffe cardiaque.

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

## Multiplex immunosup test : dosage simultané d'un panel de biomarqueurs pour le suivi de l'état d'immunosuppression

par  
Sylvia Sanquer, Laurence Herry, Céline Lena,  
Robert Barouki

### Objectifs

Tester et valider un nouveau suivi  
biologique de l'état d'immunosuppression  
après transplantation

### Méthodologie

Le suivi biologique de l'état d'immunosuppression est fondé sur un panel de marqueurs pertinents et complémentaires : le multiplex immunosup test.

Ce suivi biologique a été rendu possible par l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

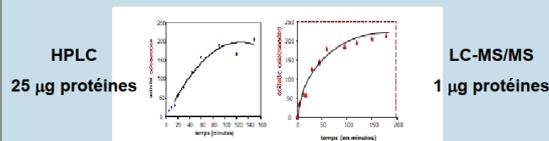
Trois objectifs ont été poursuivis:

- 1- Accroître la sensibilité et la spécificité des techniques existantes
- 2- Développer le dosage simultané des activités calcineurine, mTOR et IMPDH
- 3- Inclure de nouveaux biomarqueurs potentiels du rejet dans le panel proposé comme le facteur plaquettaire-4 (PF-4), l'hème oxygénase-1 (HO-1) et les isoformes -1 et -2 de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH)

L'étude de la calcineurine, cible des immunosuppresseurs anti-calcineurine, est donnée en exemple ici.

### Résultats

#### Développement du dosage de l'activité de la calcineurine par LC-MS/MS



Accroissement de la sensibilité et de la spécificité du test par LC-MS/MS

#### Evaluation de l'activité calcineurine pendant 2 ans après transplantation pulmonaire

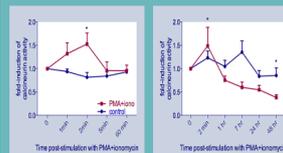


Détermination d'une zone d'activité optimale pour la calcineurine avec 2 seuils :

**12-102 pmol/mg/min**

- si activité calcineurine >102 pmol/mg/min  
➔ Rejet chronique
- si activité calcineurine <12 pmol/mg/min  
➔ Rejet chronique
- ➔ Infections virales et cancer

#### Régulation de la calcineurine après activation lymphocytaire



Stimulation transitoire rapide suivie d'une inhibition durable de la calcineurine

- ➔ Activité calcineurine après 2 minutes
- ➔ Activité calcineurine après 24-48 heures

Ce même type d'approche a été développé pour les autres marqueurs constituant le multiplex immunosup test afin de déterminer des valeurs seuils au-delà desquelles il y a un risque de développer un rejet et/ou des effets indésirables. Un algorithme sera défini, qui nous servira par la suite à adapter la posologie des immunosuppresseurs.

Année: 2008

## Amplification des monocytes ex vivo à but de thérapie cellulaire régénérative d'organes

**SIEWEKE Michael** - Inserm

[Retour tableau](#)

### Résumé

Partout dans le monde, les possibilités de transplantation sont limitées par un nombre insuffisant de greffons. En 2004 en France, le nombre de patients en attente d'une greffe de foie ou de pancréas dépasse d'un facteur 2 le nombre de transplantations réalisées. Ce décalage continue de poser des problèmes pratiques et moraux considérables, et des solutions alternatives aux allogreffes sont désespérément recherchées pour aider les patients.

Les thérapies basées sur le remplacement de cellules sont une alternative prometteuse notamment pour les transplantations de foie, de pancréas ou des îlots du pancréas. Il a été montré récemment que les monocytes, les macrophages ainsi que leurs précurseurs prolifératifs immédiats, présentent un potentiel intéressant et bien toléré de régénération d'organe, particulièrement pour le foie et le pancréas. Ces cellules myelo-monocytaire matures, d'origine humaine ou souris, contribuent de manière significative à la régénération du foie ou des îlots du pancréas dans différents modèles murins et participent normalement aux fonctions de ces organes<sup>1, 2, 3</sup>. Bien qu'il ne soit pas clair si cette régénération implique la fusion cellulaire, la reprogrammation des cellules greffées ou les deux en même temps, ces observations indiquent que l'administration de macrophages directement dans l'organe endommagé ou la transplantation par voie veineuse de progéniteurs prolifératifs pourraient représenter une stratégie thérapeutique attrayante et peu invasive. La perspective d'une application clinique est cependant entravée par la difficulté d'amplifier en culture, sur une période de temps courte, un nombre suffisant de monocytes. En effet, les monocytes en cultures n'effectuent qu'un nombre limité de division cellulaires avant de devenir adhérents et d'arrêter de proliférer.

Au laboratoire, nous avons montré que les monocytes déficients pour les facteurs de transcription MafB et c-Maf continuent de proliférer en culture pendant plusieurs mois jusqu'à atteindre un facteur d'amplification d'au moins 10<sup>10</sup> fois, sans monter de signes ni de transformation ni de perte d'expression de marqueurs, de morphologie ou de fonction macrophagiques. De manière intéressante, chez la souris, les monocytes doublement déficients pour MafB et c-Maf n'induisent pas de leucémies, contribuent normalement au tissu macrophagique et ne dépassent pas un nombre normal. De plus, les monocytes MafB/c-Maf doublement déficients peuvent toujours être amplifiés en culture même à partir du sang de souris âgées. Les applications thérapeutiques potentielles de ces observations sont incluses dans une demande de brevet (European patent application EP 07 300717.1). Nous proposons ici d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénotype et tenterons de transférer nos observations au système humain en utilisant l'interférence ARN et des protéines porteuses d'activité c-Maf et MafB dominante-négative

### Résultats

Wade, C. M., E. Giulotto, S. Sigurdsson, M. Zoli, S. Gnerre, F. Imsland, T. L. Lear, et al. 2009. « Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse ». Science 326 (5954): 865-67.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

## Immunisation anti-MICA survenant en l'absence d'anticorps anti-HLA et de facteur de risque d'allo-immunisation

TAUPIN Jean-Luc - Université

[Retour tableau](#)

### Résumé

Le système MICA est un ensemble de gènes proches des gènes HLA, et présentant un polymorphisme. Les molécules MICA sont surtout exprimées en situation de stress par les épithélia. Elles n'ont pas de rôle dans la présentation antigénique, mais stimulent la réponse immunitaire lymphocytaire T indépendamment de l'antigène, ainsi que NK. En situation de transplantation, l'immunisation contre les antigènes MICA allogéniques du donneur a été démontrée, et ces anticorps ont été impliqués dans les mécanismes humoraux de rejet du greffon. Nous avons mis en évidence la présence d'anticorps anti-MICA chez certains patients dépourvus d'anticorps anti-HLA et n'ayant jamais été soumis à aucune des causes d'allo-immunisation classiques pour le système HLA, à savoir greffe, transfusion ou grossesse. Des résultats très préliminaires semblent montrer que la réactivité de ces anticorps est néanmoins dirigée contre des antigènes MICA allogéniques. L'objectif de ce projet est de caractériser cette immunisation à l'aide d'une grande série (n = 150) de patients remplissant les conditions énumérées ci-dessus, et inscrit sur liste d'attente de transplantation d'organe. Nous confirmerons qu'il s'agit bien d'une allo-immunisation (génotypage des allèles MICA du patient, et identification de la spécificité des anticorps à l'aide d'allèles sous la forme de protéines recombinantes), puis nous déterminerons les épitopes cibles de ces anticorps (méthode du « peptide scanning » en ELISA). Ensuite, une étude fonctionnelle de ces anticorps permettra de mettre en évidence leur capacité éventuelle à moduler la réponse immunitaire (activité cytotoxique via le complément, inhibition de l'activation T ou NK par blocage de l'interaction entre MICA et son récepteur). Enfin, nous essaierons d'identifier le mécanisme de cette allo-immunisation (proximité antigénique des épitopes peptidiques cibles avec des peptides d'agents microbiens par bioinformatique, possibilité de microchimérisme materno-fœtal par typage MICA chez la mère). Cette étude permettra de mieux comprendre l'immunisation anti-MICA, et les propriétés des anticorps générés. Elle permettra de décrire une situation d'allo-immunisation sans événement immunisant classiquement reconnu. Les patients étudiés étant inscrits sur liste d'attente de greffe, et la compatibilité donneur/receveur dans le système MICA ne faisant pas partie des critères d'attribution des organes, il sera possible ultérieurement d'étudier le devenir des organes greffés en incompatibilité MICA chez ces patients.

[Retour tableau](#)

Année: 2009

## Induction de cellules dendritiques tolérogènes par le monoxyde de carbone

ANEGON Ignacio - INSERM U643, CHU de Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

Des résultats expérimentaux ont montré un rôle tolérogène pour l'hème oxygénase (HO-1) et un de ses produits le monoxyde de carbone (CO). Cependant les mécanismes impliqués dans ce processus sont mal compris et pourraient représenter un nouveau mode de tolérisation immunologique. L'objectif global du projet est de comprendre les effets de l'axe HO-1/CO sur les cellules dendritiques (CD) dans le but de proposer un protocole pour le traitement des maladies autoimmunes.

Nos résultats préliminaires ont montré que les CD traitées au CO sont capables d'induire une tolérisation des lymphocytes T CD8+ dans un modèle de diabète induit. Le premier objectif de notre projet est donc de caractériser cette tolérisation. Pour cela, nous proposons d'aborder les points suivants :

1- Nous analyserons de quelle façon des CD qui présentent des antigènes peuvent influencer la réponse des lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Pour cela, nous analyserons leur production de cytokines, l'expression de facteurs de transcription et leur phénotype.

2- Nous tenterons par la suite d'identifier et d'isoler la (les) population(s) cellulaire(s) responsable(nt) de la tolérance induite in vivo par les CD traitées au CO.

Même si les méthodes d'administration de l'insuline s'améliorent constamment, ce traitement ne permet pas une régulation parfaite de la glycémie et peut conduire à des événements d'hyperglycémie pouvant mener à des complications cardiovasculaires fatales. C'est une des raisons pour lesquelles la prévention, voire l'arrêt de l'attaque auto-immune, sont des domaines de recherche actifs. Des essais thérapeutiques récents se sont concentrés sur des méthodes d'immunosuppression globales. Cependant une immunosuppression spécifique de peptide serait plus appropriée afin d'éviter tout effet généralisé sur le système immunitaire. C'est pourquoi des CD chargées avec des peptides d'îlots □ traitées au CO pourraient représenter une voie intéressante car elle éviterait les effets toxiques du CO administré par inhalation et permettrait une tolérisation spécifique de peptide.

Le troisième axe de notre projet est donc d'optimiser un protocole de tolérance induite par le CO dans le cadre de l'autoimmunité et de l'allogreffe d'îlots pancréatiques.

3- Notre objectif est de reproduire les résultats de tolérisation des lymphocytes CD8+ autoréactifs obtenu dans le modèle de diabète induit décrit ci-dessus chez la souris NOD (Non Obese Diabetic). À cette fin, des souris NOD âgées d'un mois recevront des CD traitées au CO et chargées avec un épitope d'insuline reconnu pour avoir un rôle central dans l'initiation de l'autoinflammation.

Afin d'optimiser un protocole de tolérisation par le CO dans la réduction de rejet de greffe chez les souris diabétiques, nous rendrons diabétiques des souris insHA par injection de CD8+ autoréactifs activés qui recevront des greffes d'îlots de donneurs allogéniques. Des CD du donneur chargées avec des peptides de cellules □ et traitées au CO seront alors utilisées pour induire la tolérance.

### Résultats

2 publiés ne citant pas l'agence

[Retour tableau](#)

Année: 2009

## Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique (suite)

LE MAUFF Brigitte - Gilles BLANCHO - ITERT

[Retour tableau](#)

### Résumé

La survie à long terme d'une allogreffe n'est obtenue en clinique que grâce à une immunosuppression aux effets secondaires majeurs. L'induction d'une tolérance au greffon reste un objectif difficile à obtenir chez le primate. L'une de stratégies pour y parvenir consiste à bloquer des signaux de costimulation nécessaires à l'induction de la réponse immune contre le greffon. Le blocage des voies CD40/CD40L et CD28/B7 peut induire des cellules régulatrices chez le rongeur, mais leur blocage chez le primate par des anticorps monoclonaux anti-CD40L associé au CTLA4Ig, inhibiteur de la voie CD28 et CTLA4, permet seulement de prolonger la survie des greffons. Nous voulons utiliser dans un modèle primate de nouveaux inhibiteurs de ces signaux, le CD40Ig et une molécule de fusion sc28-AT qui inhibe spécifiquement la liaison de B7 à CD28 mais ménage les interactions avec CTLA4 dont le rôle inhibiteur est bien établi. Des taux efficaces de ces molécules seront obtenus grâce à des vecteurs viraux de type AAV. Au plateau d'expression des transgènes (2 mois) les macaques fascicularis recevront une greffe de rein. La survie du greffon sera évaluée sur l'évolution de la fonction rénale. En cas de survie prolongée du greffon, une greffe de peau du même donneur sera pratiquée et comparée à une greffe d'un sujet tiers afin d'évaluer si cette acceptation est spécifique du donneur ou liée à une immunosuppression prolongée. La capacité de réponse humorale à des antigènes tiers sera déterminée et l'effet sur les réponses mémoires et l'éventuelle induction d'auto-réactivité seront contrôlés. Au-delà de la prévention du rejet de greffon nous souhaitons évaluer la capacité de ce protocole à induire des cellules tolérogènes spécifiques des alloantigènes, qui après extinction de l'expression des transgènes respectent les capacités de réponse du système immunitaire.

### Résultats

Angin, Mathieu, Nicolas Poirier, Nahzli Dilek, Caroline Le Guiner, Alice Toromanoff, Antoine Blancher, Yan ChereI, et al. 2012. « Gene Transfer of Human CD40Ig Does Not Prevent Rejection in a Non-Human Primate Kidney Allotransplantation Model ». *Transplant Immunology* 27 (4): 139-45.

[Retour tableau](#)

Année: 2010

## Rôle de l'alloréaction humorale dans le développement de la vasculopathie de transplantation

AUGE Nathalie - INSERM , U858/I2MR CHU Rangueil

[Retour tableau](#)

### Résumé

La vasculopathie de transplantation (VT) ou artériosclérose de greffe, est une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les patients transplantés. Elle se caractérise par un épaississement concentrique au niveau des vaisseaux du greffon, aboutissant à une ischémie chronique et au rejet de l'organe. La pathogénie de cette affection n'est pas définie et il n'existe pas de traitement efficace permettant de prévenir l'hyperplasie néointimale. Le système immunitaire, notamment l'alloréaction humorale dirigée contre le système HLA de classe I du greffon est impliqué dans la VT. La survenue de la VT est plus fréquente chez les patients ayant développé des anticorps anti-HLA (en particulier, anti-HLA de classe I). De plus, les anticorps anti-HLA de classe I sont mitogènes *in vitro* pour les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) en culture.

Notre projet est d'étudier les mécanismes impliqués dans la prolifération des CML induite par les anticorps anti-HLA classe I. L'hypothèse est que ces anticorps, comme divers agents de stress, activent une (ou plusieurs) voies mitogènes impliquant des métalloprotéases (MT1-MMP et MMP2), et la voie des sphingolipides, dont le rôle dans la prolifération des CML a été récemment décrit par notre équipe. Les études préliminaires montrent que les anticorps anti-HLA de classe I activent cette voie métalloprotéases/sphingolipides sur les CML en culture. Par ailleurs, nous avons développé un modèle de VT chez des souris immuno-déficientes SCID/Beige, greffée avec des segments d'artères mésentériques humaines en position d'aorte infrarénale, et traitées par des anticorps anti-HLA de classe I (Galvani et al. 2009). Ces anticorps anti-HLA induisent le développement d'une hyperplasie intinale au niveau du greffon d'artère humaine.

Notre objectif est d'étudier i/ l'implication la voie de signalisation métalloprotéases/sphingolipides dans la prolifération des CML induite par les anticorps anti-HLA de classe I, ii/ comment la fixation des anticorps sur les molécules HLA-I des CML active la signalisation mitogène, iii/ quels sont les médiateurs et les acteurs moléculaires situés en amont de la voie métalloprotéases/sphingolipides; iv/ les liens éventuels entre la voie métalloprotéases/sphingolipides et la voie PI3K/Akt/mTOR, elle aussi activée par les anticorps anti-HLA-I. Ces études seront validées sur des artères humaines maintenues en culture organotypique et stimulées *ex vivo* par les anticorps anti-HLA-I. L'évaluation du rôle de cette voie de stress dans la VT sera aussi réalisée *in vivo* dans le modèle de souris SCID/Beige greffées avec des segments d'artère humaine et traitées par des anticorps anti-HLA-I. Par ailleurs, nous testerons l'effet d'inhibiteurs des métalloprotéases ou des sphingolipides sur l'hyperplasie intinale. Enfin, nous effectuerons des études cliniques chez des patients transplantés rénaux ayant ou non développés des anticorps contre le greffon afin de voir une éventuelle corrélation entre la présence de ces anticorps et l'augmentation de MMP2 et S1P plasmatique.

Les résultats attendus devraient montrer que les MMPs et la S1P sont impliquées dans le mécanisme de VT, et que la VT peut être prévenu par des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies de signalisation.

Ce modèle devrait permettre de mieux comprendre certains mécanismes moléculaires de VT, de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, et de nouveaux marqueurs plasmatiques (MMP2, S1P) pour le suivi des patients transplantés.

## Résultats

Galvani, S., M. Trayssac, N. Auge, J.-C. Thiers, D. Calise, H.-W. Krell, F. Sallusto, et al. 2011. « A Key Role for Matrix Metalloproteinases and Neutral Sphingomyelinase-2 in Transplant Vasculopathy Triggered by Anti-HLA Antibody ». *Circulation* 124 (24): 2725-34.

Poster

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

## Role of MMPs and nSMase in transplant vasculopathy induced by HLA class I antibodies

Trayssac M<sup>1</sup>, Galvani S<sup>1</sup>, Augé N<sup>1</sup>, Calise D<sup>2</sup>, Sallusto F<sup>3</sup>, Krell HW<sup>4</sup>, Kamar N<sup>3</sup>, Rostaing L<sup>3</sup>, Thomsen M<sup>1</sup>, Nègre-Salvayre A<sup>1</sup>, Salvayre R<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM/ UPS UMR U1048 / I2MC -Team "Atherosclerosis-Graft Arteriosclerosis" -, <sup>2</sup>Experimental Microsurgery, IFR150 Rangueil  
<sup>3</sup>Department of Multiorgan Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France, <sup>4</sup> Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

### Objectives

The role of human leucocyte antigens (HLA) class I antibodies in transplant vasculopathy has been described, pointing out a role for humoral response in chronic vascular rejection (CVR) (1).

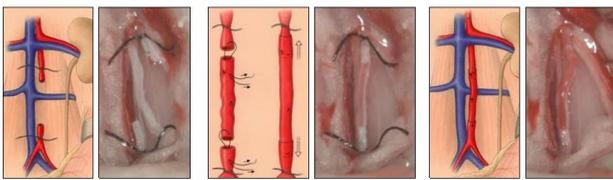
We recently developed an animal model for transplant vasculopathy consisting in immunodeficient SCID/beige mice grafted at the infrarenal aortic position with a human mesenteric artery and weekly injected with HLA class I antibodies. In a few weeks, these mice develop a significant neointimal hyperplasia in the grafted artery due to smooth muscle cell (SMC) proliferation (2).

The present work was carried out for deciphering the mechanism by which HLA class I promote SMC proliferation *in vitro* and *in vivo*. We focused our study on matrix metalloproteinases (MMPs) and neutral sphingomyelinase (nSMase) known to be involved in a proliferative signaling pathway (3).

### Methods

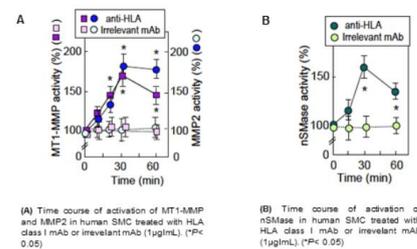
**In vitro**, we used human SMC CRL-1999. Activities were measured by enzymatic tests on culture medium or cell lysate. <sup>3</sup>H thymidine incorporation was used to quantify cell proliferation.

**In vivo**, the animal model consists in grafting human mesenteric artery at the infrarenal aortic position of SCID/beige mice. After transplantation, mice weekly receive intravenous injection of irrelevant or HLA class I antibodies. Six weeks later, mice were sacrificed and human graft was analysed by histomorphological studies.

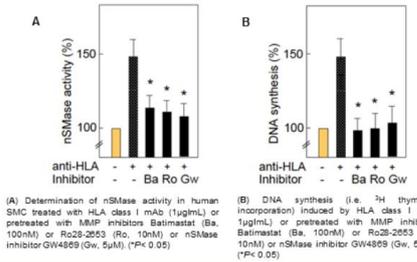


### Results

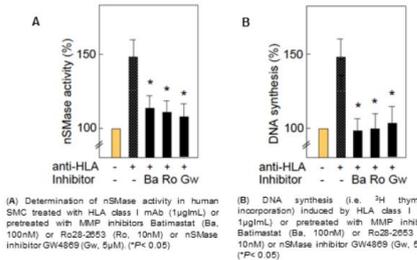
#### Results – I. HLA class I antibodies trigger activation of MT1-MMP, MMP2 and nSMase in human SMC



#### Results – II. The proliferative effect of HLA class I antibodies in human SMC is inhibited by MMPs and nSMase inhibitors



#### Results – II. The proliferative effect of HLA class I antibodies in human SMC is inhibited by MMPs and nSMase inhibitors



**Conclusion:** The reported data show that HLA class I antibodies induce SMC proliferation *in vitro* and *in vivo*. The proliferative effect of HLA class I antibodies involved the activation of MMPs and nSMase. Pharmacological inhibitors of MMPs and nSMase prevent mice from intimal hyperplasia induced by HLA class I antibodies. These results highlight a crucial role for MMPs and nSMase in SMC proliferation and transplant vasculopathy elicited by humoral immune response and opens new possibilities for the treatment of chronic vascular rejection.

References :  
1/ Wehner et al, *Circ Res*. 2007; 100:191-203  
2/ Galvani et al, *Am J Transplant*. 2009; 9:2607-2614  
3/ Augé et al, *Circulation*. 2004; 110 : 571-578

Année: 2010

## Molecular characterization of T cell engagement : towards an immunotherapy of transplantations

EZINE Sophie - INSERM- ADR Paris V

[Retour tableau](#)

### Résumé

Notre projet propose de développer des stratégies pour accélérer la reconstitution immunitaire et augmenter la génération de cellules T naïves après greffe de moelle osseuse. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue une thérapie de choix dans les cas de lymphopénie (aplasie médullaire, déficits immunitaires et leucémies). Cependant la reconstitution du système lymphoïde est très lente et les infections sévères et fatales fréquentes. La grande hétérogénéité des CSH greffées est en partie responsable de ces résultats. Une stratégie possible serait d'isoler des CSH "spécialisées vers la lignée T" pour restaurer un système immunitaire compétent rapidement.

Objectifs principaux : L'approche que nous avons choisie est d'accélérer la différenciation des CSH vers la voie lymphoïde T : définir les facteurs impliqués dans l'engagement vers la lignée T et caractériser les événements précoces de la colonisation thymique. L'engagement vers une lignée nécessite la stabilisation d'un programme de différenciation. L'identification de ces stades et l'engagement des cellules précurseurs nécessite le développement de méthodologies d'analyse au niveau d'une seule cellule. Au cours d'une étude antérieure réalisée à l'échelle unicellulaire, nous avons défini les facteurs présents dans les CSH et absents dans la lignée des progéniteurs lymphoïdes. Dans ce programme, nous proposons : 1) D'élargir cette étude à d'autres gènes en utilisant la même méthode (RT-PCR sur cellule unique). Ces gènes représenteront des facteurs pour lesquels nous ne disposons pas d'anticorps ; 2) de définir les conditions, in vitro, qui induisent les CSH à activer l'expression des gènes spécifiques aux progéniteurs lymphoïdes ; 3) L'accélération du compartiment des cellules T naïves passe par une colonisation thymique. Cette étape semblerait être très réduite, voire nulle, après greffes de CSH. C'est dans ce but que l'identification de ces récepteurs de migration est d'importance.

Résultats attendus : L'ensemble de ce programme vise à définir comment les gènes impliqués dans la lignée T vont s'installer et être régulés au cours du développement des CSH. Cette stratégie va permettre d'identifier les acteurs impliqués pour manipuler la différenciation de la voie lymphoïde T. Dans tous les cas cette étude permettra de définir la cascade moléculaire entre les CSH et les progéniteurs lymphoïdes.

Méthodologie : Ce projet est basé sur l'analyse moléculaire de populations rares et faiblement représentées dans le système hématopoïétique. L'étude sur cellule unique par RT-PCR représente la meilleure stratégie pour répondre à des questions majeures et encore non résolues. La justification de l'établissement d'un multiplex pour une étude sur cellule unique : au cours du processus de différenciation, certains gènes sont activés et d'autres éteints ; en plus des différences qualitatives, il existe aussi des différences quantitatives dans l'expression de certains gènes, plutôt qu'une extinction (ou expression) complète. De plus, plusieurs gènes sont impliqués dans ces événements. Cette étape nécessite plusieurs phases : le design des primers, des tests d'efficacité des PCR et de compétition. L'ensemble de ce programme précède les travaux précliniques.

La stratégie que nous utilisons peut être appliquée à tous les cas où les populations d'intérêt sont rares et les études fonctionnelles in vivo difficiles. Elle pourra aussi servir de diagnostic dans certaines pathologies.

### Résultats

Boudil, Amine, Lamia Skhiri, Serge Candéias, Valérie Pasqualetto, Agnaïs Legrand, Marie Bedora-Faure, Laetitia Gautreau-Rolland, Benedita Rocha, et Sophie Ezine. 2013. « Single-Cell Analysis of Thymocyte

Differentiation: Identification of Transcription Factor Interactions and a Major Stochastic Component in  $\hat{I}^2$ -Lineage Commitment ». Édité par Guangwei Liu. PLoS ONE 8 (10): e73098.

[Retour tableau](#)

**Année: 2010**

## Evaluation de l'empreinte parentale dans la lignée ES de singe Rhésus LYON-ES1 et après différenciation en précurseurs neuronaux et cellules neuronales in vitro ou in vivo

**LEFEVRE Annick** - INSERM U846, Institut Cellule Souche et Cerveau

[Retour tableau](#)

### Résumé

La thérapie régénératrice par cellules souches représente un espoir pour les nombreux patients atteints de maladies et de lésions dégénératives. La maladie de Parkinson se prête particulièrement bien à la stratégie d'implantation de cellules souches, et en raison du vieillissement de la population mondiale, l'importance de cette maladie comme problème de santé publique devrait s'accroître. L'utilisation de neurones dopaminergiques générés à partir de cellules ES apparaît comme une thérapie séduisante ; en effet, les cellules ES semblent avoir un avantage décisif par rapport aux autres types de cellules souches, en particulier adultes, du fait de leur plus grande plasticité. Les protocoles d'obtention des cellules ES et de leur différenciation font une large place à la culture in vitro, et la question essentielle, avant toute application clinique, est de savoir si l'épigénome des cellules est préservé au cours de tout ce processus. On sait en particulier que l'empreinte parentale est très sensible aux conditions de culture. Or, des altérations de l'empreinte parentale sont associées à de nombreux cancers chez l'homme. L'empreinte parentale des cellules ES est-elle susceptible d'être altérée par les cultures in vitro intensives (culture et repiquages successifs), leur différenciation en précurseurs neuronaux in vitro, le stress que constitue une greffe dans le cerveau et l'adaptation à un nouvel environnement ... ? L'unité Inserm U846 a développé un modèle de singe Rhésus parkinsonien permettant de tester la validité et l'efficacité thérapeutique d'une stratégie de remplacement cellulaire utilisant les cellules ES. F Wianny et C Dehay ont dérivé une nouvelle lignée de cellules ES chez le singe Rhésus, la lignée LYON-ES1 capable de se différencier en précurseurs neuronaux in vitro qui peuvent être greffés dans le cerveau de singe Rhésus traité au MPTP.

Notre projet est d'évaluer l'impact de différents processus, culture in vitro, sur supports artificiels, différenciation in vitro ou in vivo après greffe dans le cerveau de précurseurs neuronaux, sur la qualité de l'empreinte parentale des cellules ES et de leurs dérivés différenciés. Pour cela, nous analyserons le profil de méthylation de 2 centres d'empreinte témoins, l'un soumis à empreinte maternelle, snrpn, l'autre soumis à empreinte paternelle, H19/Igf2, et l'expression monoallélique des gènes qu'ils contrôlent (snrpn, H19 et Igf2). Cette étude devrait permettre de définir les meilleures conditions de culture, de différenciation et de greffe des cellules ES et de leurs dérivés différenciés pour que leur épigénome soit préservé dans l'hypothèse d'une application clinique sécurisée. Les enseignements que nous tirerons de nos expériences avec la lignée ES de primate seront précieux pour passer à l'étude d'autres types de cellules souches, adultes en particulier qui doivent subir un remodelage épigénétique important pour revenir à un état indifférencié.

### Résultats

Wianny, Florence, Thierry Blachère, Murielle Godet, Rémi Guillermas, Véronique Cortay, Pierre-Yves Bourillot, Annick Lefèvre, Pierre Savatier, et Colette Dehay. 2016. « Epigenetic status of H19/IGF2 and SNRPN imprinted genes in aborted and successfully derived embryonic stem cell lines in non-human primates ». Stem Cell Research 16 (3): 557-67.

[Retour tableau](#)

Année: 2011

## Etude de l'effet bystander des lymphocytes T régulateurs : mécanismes d'action et application thérapeutique

COHEN José - INSERM DRParis 12

[Retour tableau](#)

### Résumé

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogénique est l'une des approches thérapeutiques principales pour la reconstitution hématopoïétique de patients atteints d'aplasie médullaire, de déficits immunitaires ou de leucémies. Dans ce dernier cas, l'efficacité de la greffe de CSH allogénique repose à la fois sur la myéloablation induite par le conditionnement et sur le transfert de lymphocytes T (LyT) du donneur présents au sein du greffon qui exercent (i) un effet anti-leucémique ou graft versus leukemia (GVL), (ii) une facilitation de la prise de greffe et (iii) contribuent à la reconstitution immunitaire du patient. Toutefois, cette action bénéfique des LyT est contrebalancée par le risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH), principale cause de décès post-greffe. Cette GVH est liée à la reconnaissance par les LyT du donneur, d'antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité présentés par les cellules du receveur.

En 1995, le groupe de Shimon Sakaguchi au Japon a identifié les LyT CD4+CD25+ immunosuppresseurs (Treg) dans le champ de l'autoimmunité. Nos travaux pionniers ont permis de montrer que l'élimination des Treg naturellement présents dans le greffon médullaire aggrave fortement la GVH, alors qu'au contraire, lorsque le greffon contient un grand nombre de Treg la GVH est contrôlée a fortiori si ces derniers sont spécifiques des alloantigènes du receveur. La purification et l'expansion des Treg chez l'homme restent aujourd'hui encore très complexes du fait notamment de l'absence d'un marqueur exclusif des Treg. Le corollaire est que l'utilisation clinique d'une population de Treg spécifiques d'alloantigènes n'est pas à ce jour possible dans des conditions de bonnes pratiques de thérapie cellulaire sans prendre le risque de générer en même temps des LyT fortement inducteurs de la GVH.

Ce projet propose une nouvelle procédure de sélection et d'expansion de Treg spécifiques d'antigènes non allogéniques pour contrôler la GVH. Il consiste à s'appuyer sur les propriétés immunosuppressives de proximité ou « bystander » des Treg dans la greffe de CSH, propriétés que nous avons récemment mis en évidence dans le cadre de l'appel d'offre 2008 de l'Agence de la Biomédecine. Ce projet repose sur deux objectifs principaux.

1. Définir les procédures ex vivo de génération de ces Treg spécifiques et décrypter les mécanismes mis en jeu dans l'exercice de leur effet bystander au cours du contrôle de la GVH chez la souris.
2. Procéder au transfert de cette procédure de la souris à l'homme.

A termes, nous envisageons le développement d'un essai clinique dans des greffes à haut risques de GVH (partiellement compatibles à partir de donneurs sur fichier).

### Résultats

Martin, Gaëlle H., Sylvie Grégoire, Dan A. Landau, Caroline Pilon, Yenkel Grinberg-Bleyer, Frédéric Charlotte, Jean-Pierre Mège, Lucienne Chatenoud, Benoît L. Salomon, et José L. Cohen. 2013. « In Vivo

Activation of Transferred Regulatory T Cells Specific for Third-Party Exogenous Antigen Controls GVH Disease in Mice: Immunomodulation ». *European Journal of Immunology* 43 (9): 2263-72.

Pérol, Louis, Gaëlle H. Martin, Sébastien Maury, José L. Cohen, et Eliane Piaggio. 2014. « Potential Limitations of IL-2 Administration for the Treatment of Experimental Acute Graft-versus-Host Disease ». *Immunology Letters* 162 (2): 173-84.

[Retour tableau](#)

Année: 2011

## Nouveaux biomarqueurs non invasifs de néphrotoxicité de la ciclosporine : approche transcriptomique appliquée à la clinique

RONDEAU Eric - Hôpital Tenon

[Retour tableau](#)

### Résumé

Introduction : La ciclosporine A (CsA) a réduit l'incidence des rejets en transplantation rénale. Cependant, elle participe aux lésions histologiques (fibrose interstitielle et atrophie tubulaire, FI/AT) aboutissant à la dysfonction chronique d'allogreffe. Le mécanisme de la toxicité chronique de la CsA est inconnu. In vitro, une toxicité directe sur cellules tubulaires est observée. In vivo, un mécanisme initialement vasculaire est suspecté, car la CsA entraîne une vasculopathie, et des lésions de FI/AT réparties «en bande», évoquant un territoire vasculaire. Les marqueurs de transition épithéliomésenchymateuse (TEM) sont associés aux maladies fibrosantes rénales et sont pronostiques de la progression de la FI/AT chez le greffé rénal (montré par notre groupe et récemment confirmé par une équipe indépendante). Nous avons montré chez le rat que la CsA est un facteur étiologique indépendant de la TEM tubulaire, qui précède l'apparition de la fibrose, et que la toxicité de la CsA détectée à ce stade est réversible à l'arrêt du traitement.

Objectifs :

- 1) Etablir la signature moléculaire in vivo de la toxicité tubulaire de la CsA.
- 2) Comprendre le rôle des modifications transcriptionnelles dans la néphrotoxicité de la CsA.
- 3) Mettre au point un test non invasif sensible et spécifique de la néphrotoxicité de la CsA.

Résultats attendus :

- 1) Identifier les modifications transcriptionnelles tubulaires induites par la CsA in vivo.
- 2) Etudier l'effet protecteur ou délétère des gènes dérégulés par la CsA, in vivo et in vitro.
- 3) Améliorer la prise en charge des patients en dépistant la toxicité de la CsA à un stade réversible.

Méthodologie :

- 1) Etude du transcriptome tubulaire rénal par puces à ADN complémentaire de tubules proximaux obtenus par microdissection-capture laser de rats traités ou non par CsA. Identification des gènes dont l'expression est modulée par la CsA. Comparaison avec les données publiées du transcriptome de la CsA dans les cellules tubulaires in vitro et du transcriptome d'autres néphropathies fibrosantes.
- 2) Traitement par CsA d'animaux invalidés pour les gènes sélectionnés à l'étape 1. Utilisation de cultures cellulaires pour étudier les gènes pour lesquels les animaux ne sont pas disponibles. Etude in vitro des voies de signalisations intra et intercellulaires impliquées dans la toxicité de la CsA (apoptose, nécrose et TEM en cytométrie de flux).
- 3) Identification par puces à ADN du transcriptome urinaire de patients atteints de néphrotoxicité de la CsA (greffés hépatiques ayant une insuffisance rénale de novo). Sélection de gènes candidats par croisement des données du transcriptome tubulaire de la ciclosporine et urinaire des patients greffés hépatique. Evaluation du dosage urinaire de ces ARN pour le diagnostic de TEM du greffon rénal chez des patients greffés stables traités ou non par CsA. Sélection de marqueurs spécifiques de la néphrotoxicité de la CsA.

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

## Nouveaux biomarqueurs non invasifs de néphrotoxicité de la ciclosporine : approche transcriptomique appliquée à la clinique

Rondeau Eric

Inserm UMR\_S1155, Maladies rénales rares et communes, Remodelage de la matrice et réparation tissulaire, Hôpital Tenon, Paris, France; Université de la Sorbonne, UPMC, Paris, France; Urgences Néphrologiques et transplantation rénale APHP, Hôpital Tenon, Paris, France

**Introduction** La ciclosporine A (CsA) a réduit l'incidence des rejets en transplantation rénale. Cependant, elle participe aux lésions histologiques (fibrose interstitielle et atrophie tubulaire, FI/AT) aboutissant à la dysfonction chronique d'allogreffe. Le mécanisme de la toxicité chronique de la CsA est inconnu. In vitro, une toxicité directe sur cellules tubulaires est observée. In vivo, un mécanisme initialement vasculaire est suspecté, car la CsA entraîne une vasculopathie, et des lésions de FI/AT réparties «en bande», évoquant un territoire vasculaire. Les marqueurs de transition épithéliomésenchymateuse (TEM) sont associés aux maladies fibrosantes rénales et sont pronostiques de la progression de la FI/AT chez le greffé rénal (montré par notre groupe et récemment confirmé par une équipe indépendante). Nous avons montré chez le rat que la CsA est un facteur étiologique indépendant de la TEM tubulaire, qui précède l'apparition de la fibrose, et que la toxicité de la CsA détectée à ce stade est réversible à l'arrêt du traitement.

**Objectifs :**

- 1) Etablir la signature moléculaire in vivo de la toxicité tubulaire de la CsA.
- 2) Comprendre le rôle des modifications transcriptionnelles dans la néphrotoxicité de la CsA.
- 3) Mettre au point un test non invasif sensible et spécifique de la néphrotoxicité de la CsA.

**Méthodes**

1. Etude du transcriptome tubulaire rénal par puces à ADN complémentaire de tubules proximaux obtenus par microdissection-capture laser de rats traités ou non par CsA. Identification des gènes dont l'expression est modulée par la CsA. Comparaison avec les données publiées du transcriptome de la CsA dans les cellules tubulaires in vitro et du transcriptome d'autres néphropathies fibrosantes.
2. Traitement par CsA d'animaux invalidés pour les gènes sélectionnés à l'étape 1. Utilisation de cultures cellulaires pour étudier les gènes pour lesquels les animaux ne sont pas disponibles. Etude in vitro des voies de signalisations intra et inter-cellulaires impliquées dans la toxicité de la CsA (apoptose, nécrose et TEM en cytométrie de flux).
3. Identification par puces à ADN du transcriptome urinaire de patients atteints de néphrotoxicité de la CsA (greffés hépatiques ayant une insuffisance rénale de novo). Sélection de gènes candidats par croisement des données du transcriptome tubulaire de la ciclosporine et urinaire des patients greffés hépatique. Evaluation du dosage urinaire de ces ARN pour le diagnostic de TEM du greffon rénal chez des patients greffés stables traités ou non par CsA. Sélection de marqueurs spécifiques de la néphrotoxicité de la CsA.

**Résultats**

Identification des voies du stress induite par la CsA dans les tubules:

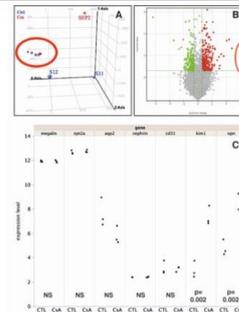


Microdissection laser des tubules

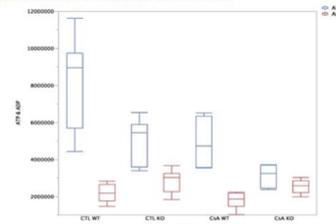
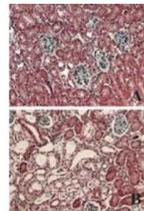
Extraction, RT des ARN et amplification

Analyse statistique

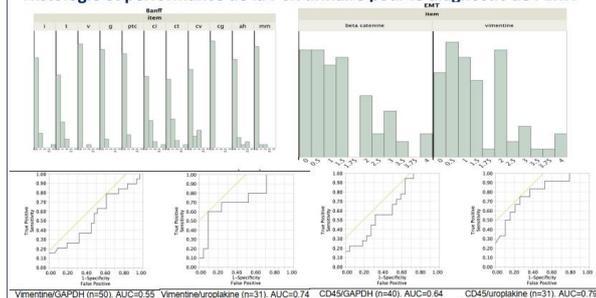
KEGG Pathway	Genes count	Odds Ratio	p-value	Discovery Rate
Ribosome	66	47	$6.97 \times 10^{-11}$	$1.44 \times 10^{-11}$
Protein processing in endoplasmic reticulum	140	10	$2.86 \times 10^{-10}$	$2.96 \times 10^{-10}$
Protein export	21	46	$7.29 \times 10^{-10}$	$5.03 \times 10^{-10}$
Peroxisome	68	8	$2.2 \times 10^{-10}$	$9.13 \times 10^{-10}$
Tempendic backbone synthesis	12	26	$4.12 \times 10^{-10}$	$1.22 \times 10^{-10}$



**Rôle protecteur de Nupr1 contre la toxicité de la CSA:**



**Histologie et performance de la PCR urinaire pour le diagnostic de l'EMT**



**Conclusions:** La CsA active les gènes dépendant d'ATF4, dont Nupr1 dans les tubules rénaux. Nupr1 est protecteur contre la toxicité de la CsA. L'ARN urinaire de CD45 avec normalisation par l'uroplakine est prédictif d l'EMT du greffon, mais la qualité souvent faible des échantillons urinaires en limite les applications

Année: 2012

## Rôle des sphingolipides et de MMP-2 dans le développement du rejet chronique vasculaire médié par l'alloréaction humorale

AUGE Nathalie - INSERM

[Retour tableau](#)

### Résumé

La vasculopathie de transplantation (VT) ou rejet chronique vasculaire (RCV) représente la principale cause de perte du greffon à long terme. C'est une cause de mortalité majeure chez les patients transplantés. La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) dans l'intima est impliquée dans le mécanisme de la VT, car elle induit progressivement une occlusion du vaisseau, aboutissant à une ischémie et à la perte du greffon. Il n'existe pas d'approches thérapeutiques permettant de limiter efficacement la prolifération des CMLs. L'immunité humorale jouerait un rôle important dans le développement de la VT, en particulier les anticorps anti HLA, car ils stimulent in vitro la migration et la prolifération des CMLs. Nos travaux récents montrent que les anticorps anti HLA stimulent une voie mitogène de stress qui active la migration et la prolifération des CMLs, et implique des enzymes du métabolisme des sphingolipides (sphingomyélinase neutre de type 2 ou nSMase2) et les métalloprotéases MMP-2 et MT1-MMP. Les inhibiteurs pharmacologiques de MMPs ou de nSMase2 inhibent de façon significative le développement de la VT dans un modèle animal de xéno greffe développé chez la souris SCID/beige greffée avec des artères mésentériques humaines et injectée avec des anticorps anti HLA.

### Objectifs et hypothèse de travail

La nSMase2 est la première étape de la voie des sphingolipides car elle hydrolyse la sphingomyéline et libère du céramide, ensuite métabolisé en sphingosine, puis en sphingosine 1phosphate (S1P), un facteur de prolifération et de survie cellulaire. Notre hypothèse est que la migration et la prolifération des CMLs sous l'effet des anticorps anti HLA dépend de la génération de S1P. Les sphingolipides pourraient par ailleurs réguler l'expression de MMP-2 dans la matrice extracellulaire, ce qui conditionnerait la migration et la prolifération cellulaire.

### Résultats attendus

- La S1P devrait être impliquée dans la prolifération des CMLs induites par les anticorps anti HLA. Les voies impliquées dans la génération de S1P (voie MMP/nSMase2, facteurs de croissance, stress oxydant), seront étudiés, de même que les récepteurs de S1P concernés, et les agents pharmacologiques permettant d'inhiber sélectivement cette voie
- Les sphingolipides réguleraient l'expression de MMP2 et de ses modulateurs (TIMPS, RECK, CD147), sous l'effet d'agents de stress, ce qui conditionnerait la prolifération des CMLs. L'effet mitogène des anticorps anti HLA devraient impliquer une uprégulation de l'expression de MMP2 et une inhibition de ses modulateurs, via les sphingolipides.

### Méthodologie

Ce projet utilise des approches in vitro sur CMLs humaines et in vivo un modèle animal de xéno greffe réalisé chez les souris SCID/beige immunodéficientes, qui permet de tester des agents pharmacologiques anti RCV.

## Résultats

Trayssac, M., S. Galvani, N. Augé, R. Sabbadini, D. Calise, E. Mucher, F. Sallusto, M. Thomsen, R. Salvayre, et A. Nègre-Salvayre. 2015. « Role of Sphingosine-1-Phosphate in Transplant Vasculopathy Evoked by Anti-HLA Antibody ». *American Journal of Transplantation* 15 (8): 2050-61.

Poster



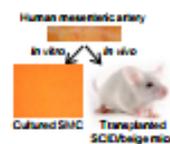
**ROLE OF S1P IN ANTIBODY-INDUCED TRANSPLANT VASCULOPATHY**

Trayssac M<sup>1</sup>, Galvani S<sup>1</sup>, Auge N<sup>1</sup>, Calise D<sup>2</sup>, Mucher E<sup>1</sup>, Sabbadini R<sup>3</sup>, Sallusto F<sup>4</sup>, Thomsen M<sup>1</sup>, Salvayre R<sup>1</sup>, Nègre-Salvayre A<sup>1</sup>

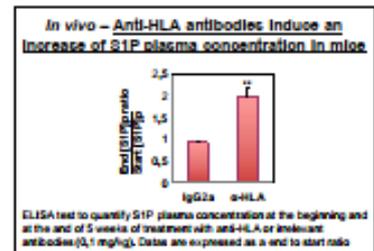
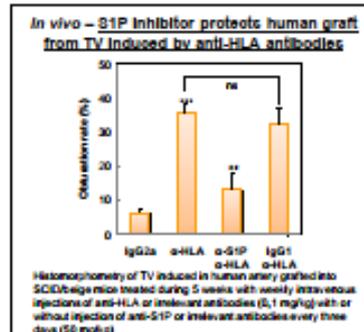
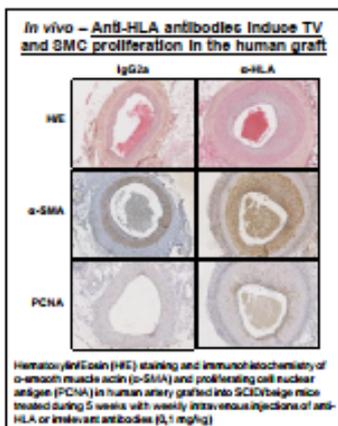
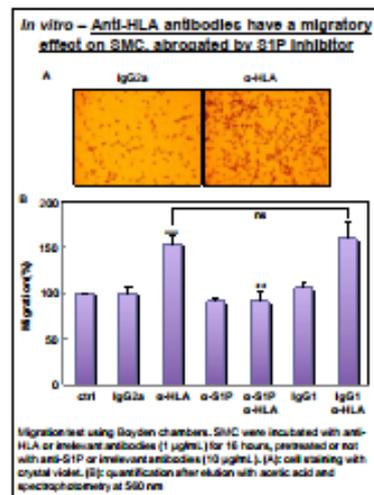
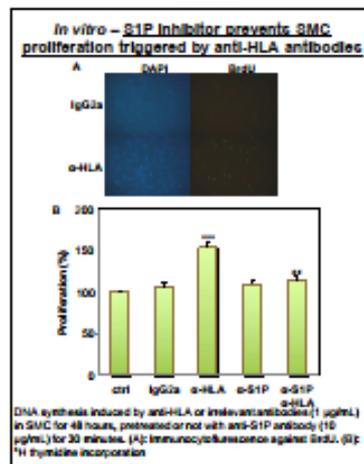
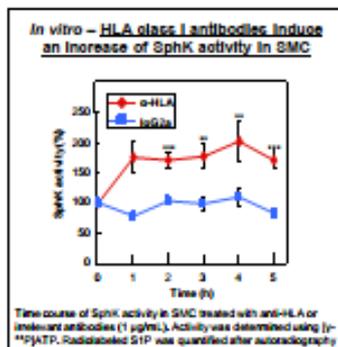
<sup>1</sup>INSERM UPS UMR U1048 / I2MC - Team "Atherosclerosis-Graft Arteriosclerosis", <sup>2</sup>Experimental Microsurgery, IFR150 Rangueil, <sup>3</sup>Lpath Inc., San Diego, California, United States of America, <sup>4</sup>Department of Multivisceral Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France

**Introduction** – Chronic rejection is the major long-term complication for transplant patients. This pathology is characterized by transplant vasculopathy (TV) implying proliferation and migration of smooth muscle cells (SMC) in the vascular network of the grafted organ. Humoral response of the recipient directed against HLA class I molecules of the donor plays a role in the pathogenesis of TV (1). Recently, we showed that TV triggered by anti-HLA antibodies involves the sphingolipid pathway (2). The objective of this present work is to investigate the role of a bioactive sphingolipid: sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is synthesized by sphingosine kinases (SphK) and is well-known to own proliferative and migratory properties but its involvement in antibody-induced TV remains still undiscovered.

**Methods** – *In vitro*, we used human mesenteric SMC stimulated with anti-HLA or IgG2a irrelevant antibodies, pre-treated or not with anti-S1P antibodies (Sphingomab, LT 1002) or irrelevant IgG1 antibodies. SMC proliferation was quantified by <sup>3</sup>H thymidine and BrdU incorporation. SMC migration was measured by Boyden's chamber assay. *In vivo*, we used xenotransplantation model of human mesenteric artery into immunodeficient SCID/beige mice at the infra-renal aortic position. After 5 weeks of treatment with weekly intravenous injections of anti-HLA or IgG2a irrelevant and co-administration with anti-S1P or IgG1 irrelevant every three days, we carried out histological studies of the human graft. We performed ELISA test to quantify S1P plasmatic concentration.



**Results**



**Conclusion** - The reported data show that, *In vitro*, anti-HLA antibodies induce S1P synthesis through an increase of SphK activity in SMC. S1P takes part in proliferative and migratory effects of anti-HLA antibodies on SMC. Furthermore, *In vivo*, HLA class I antibodies trigger TV and SMC proliferation in the human graft and an increase of S1P plasma concentration. Treatment with S1P inhibitor prevents the graft from TV induced by anti-HLA antibodies. These results highlight a crucial role for S1P in TV elicited by humoral immune response and may help for the future direction for anti-rejection therapy.

Année: 2012

## Facteurs immunologiques associés à la persistance du virus de l'hépatite E chez les transplantés d'organes

CHAMPAGNE Eric - Inserm ADR Midi-Pyrénées, Limousin

[Retour tableau](#)

### Résumé

Les infections par le virus de l'hépatite E sont un problème de santé émergent chez les patients transplantés d'organes sous traitement immunosuppresseur, évoluant fréquemment vers une hépatite chronique dans laquelle une altération de l'immunité cellulaire est déterminante. Des données récentes indiquent que la ribavirine utilisée comme médicament antiviral permet souvent le contrôle de l'infection par un mécanisme dans lequel une activité immunomodulatrice est suspectée. Chez certains patients ce traitement ne permet pas l'élimination du virus. Par ailleurs la cyclosporine et le tacrolimus, des immunosuppresseurs utilisés pour contrôler le rejet de greffe, semblent affecter différemment le cours de l'infection.

Objectifs : nous souhaitons identifier les composantes de l'immunité cellulaire impliquées dans la clairance virale après la phase aiguë de l'infection par HEV chez les patients immunodéprimés. Nous étudierons les mécanismes immunologiques liés à l'action de la ribavirine.

Méthodologie : Le projet s'appuie sur des une collection d'échantillons de patients suivis au niveau du Service de Transplantation du CHU de Toulouse (18 patients transplantés avec infection aiguë dont 13 évoluant vers une forme chronique, 36 transplantés contrôles et 18 patients traités par ribavirine et suivis pendant au moins 6 mois). Ils incluent des cellules sanguines (phase aiguë et phase de traitement) et des biopsies hépatiques (une centaine au total), associées à des données virologiques (charge virale). Les sous-populations lymphocytaires et leur évolution seront explorées par cytométrie en flux sur des échantillons sanguins. Les cellules de l'immunité conventionnelle (T-CD4, T-CD8) et non-conventionnelle (T- $\gamma\delta$ , cellules NK et NKT, Treg) seront analysées et caractérisées pour leurs marqueurs d'activation, mémoires ou régulateurs. Les marqueurs des lymphocytes dans le foie seront analysés sur des biopsies hépatiques par immunohistochimie et/ou hybridation in situ. Nous nous efforcerons d'isoler les cellules sanguines réactives contre des antigènes viraux ou cellulaires et de préciser leur spécificité antigénique et leurs fonctions effectrices ou modulatrices par des expériences in vitro de restimulation contre des peptides viraux synthétiques ou des hépatocytes infectés. Le répertoire du TCR des lymphocytes T périphériques et celui des cellules infiltrant les lésions hépatiques sera analysé en s'appuyant sur les techniques d'immunoscope et/ou de microdissection par capture laser (LCM). Nous rechercherons particulièrement la présence de clones lymphocytaires dominants et suivrons leur évolution au cours de la maladie et du traitement.

Résultats attendus : ce travail permettra d'identifier les populations lymphocytaires (cellules conventionnelles ou non) déterminantes pour l'élimination du virus chez les patients transplantés et de préciser les effets sur ces cellules des traitements antiviraux et immunosuppresseurs mis en œuvre afin d'adapter leur utilisation.

### Résultats

Abravanel, Florence, Hugo Barragué, Gaëlle Dörr, Karine Sauné, Jean-Marie Péron, Laurent Alric, Nassim Kamar, Jacques Izopet, et Eric Champagne. 2016. « Conventional and Innate Lymphocytes Response at the Acute Phase of HEV Infection in Transplanted Patients ». The Journal of Infection 72 (6): 723-30.

[Retour tableau](#)



**Année: 2012**

## Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon

**CHARREAU Béatrice** - Association ITERT, CHU de Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

La dysfonction des cellules endothéliales associée à l'inflammation et l'artériosclérose du greffon sont des processus majeurs impliqués dans la pathogénèse du rejet de greffe. Nos travaux récents proposent un rôle important pour une protéine adaptatrice, Lnk (SH2B3), dans le rétrocontrôle des voies de signalisation associées à l'inflammation et la migration des cellules endothéliales. Ce projet poursuivra la caractérisation biochimique et fonctionnelle de la molécule LNK dans les cellules endothéliales humaine. Nous poursuivrons la caractérisation du panel de molécules inflammatoires inhibées par l'expression de Lnk dans l'endothélium. Nous analyserons le polymorphisme génétique de Lnk au sein d'une cohorte de greffes rénales pour lesquels nous avons des cellules endothéliales et de l'ADN du donneur afin d'évaluer son impact sur l'expression et l'activité de cette protéine dans les cellules endothéliales du greffon. Nous définirons également le rôle de Lnk dans les mécanismes de la prolifération et la différenciation (transition endothéliale/mésenchymateuse) cellulaire, processus impliqués dans l'initiation et la progression de la fibrose. Nous utiliserons un adénovirus recombinant pour Lnk pour valider, par transfert de gène in vivo, l'effet anti-inflammatoire de Lnk dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat. Enfin, la production d'un rat transgénique à expression ciblée dans l'endothélium sera une étape importante pour la validation du rôle régulateur et protecteur de l'adaptateur Lnk pour l'endothélium du greffon et son impact pour la prévention de l'inflammation et de l'artériosclérose du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque. Cette étude devrait définir si Lnk peut être une cible moléculaire pour une approche thérapeutique visant une inhibition ciblée de l'inflammation et de l'artériosclérose en transplantation.

**Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon**

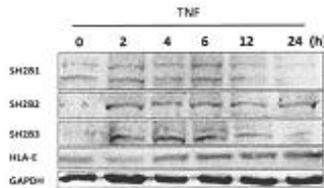
Sylvain Pagie, Claire Toquet, Nathalie Gérard et Béatrice Charreau

Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR\_S1064, Equipe 5, European Center for Transplantation Science and Immunotherapy, LabEx Transplantex, Labex IGO, CHU de Nantes, Université de Nantes, France.

Objectifs de l'étude

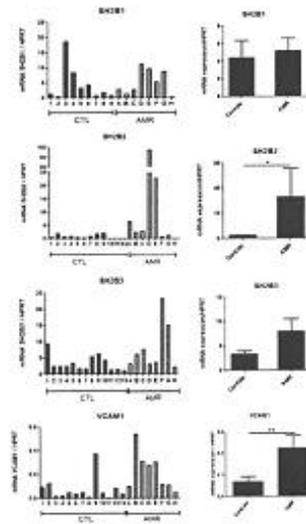
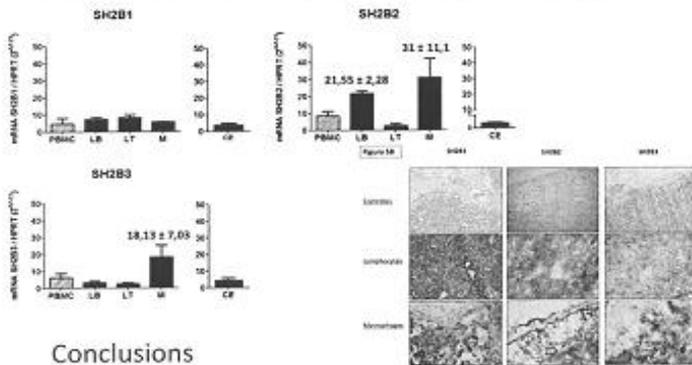
Les lésions causées aux cellules endothéliales (CE) du greffon par les anticorps dirigés contre le donneur (DSA) et l'activation du complément jouent un rôle important dans la vasculopathie d'allogreffe et le rejet à médiation humorale (AMR). L'objectif de ce projet était l'étude de l'expression des protéines adaptatrices de la famille SrcHomology2B (SH2B1, SH2B2 et SH2B3) dans le tissu cardiaque et les sous-populations leucocytaires, et leur régulation au cours du rejet humoral aigu, dans des biopsies de greffons cardiaques

Principaux résultats



seuls SH2B2 et SH2B3 sont régulés lors de l'activation endothéliale en réponse à l'inflammation avec cependant des cinétiques différentes

SH2B1 semble ubiquitaire. SH2B2 présente une expression restreinte aux cardiomyocytes et aux cellules musculaires lisses (CML) dans le coeur et une expression forte dans les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Dans le coeur, SH2B3 est localisé dans CML et majoritairement exprimé par les monocytes/macrophages. L'expression endothéliale de SH2B3 restreinte aux vaisseaux de gros calibre.



Au cours du rejet humoral, SH2B2 et SH2B3 sont augmentés de façon globale dans les greffons mais avec des variations individuelles suggérant une régulation mutuellement exclusive des SH2B.

Conclusions

Pour conclure, nous avons décrit au cours de ce projet, une régulation de l'expression des molécules SH2B2 et SH2B3, et une absence de régulation de SH2B1, lors de l'activation endothéliale et notamment lors du rejet humoral aigu. Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers à montrer une implication des protéines adaptatrices SH2B dans les mécanismes d'AMR induite par des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.

Contact: Dr. Béatrice Charreau; INSERM UMR-S1064, Nantes, France; Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Année: 2013

## Contrôle immunitaire de la réponse anti-CMV et alloréactivité croisée ciblant les cellules endothéliales du greffon : définition et analyse d'un nouveau facteur de risque

CHARREAU Béatrice - Université de Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

L'infection à CMV constitue un facteur de risque important chez les patients transplantés sous régime immunosuppresseur. Bien que cette infection soit associée à une diminution de la survie du greffon, les mécanismes impliqués demeurent mal connus. Parallèlement au rôle, primordial et connu de longue date, de la réponse lymphocytaire T $\alpha\beta$ CD8 dans le contrôle de l'infection à CMV, la contribution d'une sous-population de TCD8 alloréactifs non conventionnels reconnaissant des peptides communs au CMV et à certaines molécules HLA de classe I et restreints par HLA-E est une notion émergente. Nos travaux les plus récents portent sur la description et caractérisation d'une population lymphocytaire T CD8+ alloréactive, restreinte par HLA-E, reconnaissant des peptides du CMV et du HLA-I et capable d'induire in vitro la lyse des cellules endothéliales issues de donneurs. Dans un contexte de transplantation d'organes vascularisés, HLA-E est exprimée essentiellement par les cellules endothéliales du greffon qui constituent donc une cible allogénique privilégiée des lymphocytes T  $\alpha\beta$ CD8+ cytotoxiques induits par l'infection à CMV. Ce projet propose de rechercher la présence de cette population cellulaire que nous avons identifiée dans une cohorte de patients transplantés, d'analyser la fonction de ces cellules in vitro et de définir l'impact de cette alloréactivité croisée sur la fonction du greffon. L'objectif principal est d'établir la preuve de concept qu'un test cellulaire identifiant une population de T CD8+ dirigé contre un set de peptides communs au CMV et certains HLA de classe I et présentés par HLA-E pourrait prédire le devenir du greffon. Les objectifs spécifiques sont (1) la mise au point d'un test de détection sensible et spécifique, des populations TCD8 HLA-E restreintes dirigées contre le CMV dans le sang total par cytométrie multiparamétrique, et (2) l'étude rétrospective et cinétique post-greffe d'une cohorte de patients transplantés rénaux portant sur la détection de(s) population(s) TCD8+ HLA-E restreintes dirigées contre le CMV et des allopeptides. Si nous montrons dans ce projet que la présence de cette population cellulaire est associée à un risque accru de développer des lésions vasculaires et une dysfonction chronique du greffon, un test diagnostique sera développé. L'aspect novateur et appliqué du projet est soutenu par un dépôt de brevet (INSERM, Numéro de dépôt : EP12305823.2, Date de dépôt : 10 juillet 2012). Notre projet pourrait identifier un nouveau mécanisme impliquant le CMV dans le rejet de greffe et définir un nouveau facteur de risque pour le devenir du greffon lié à l'infection à CMV du receveur et au génotype du donneur.

### Résultats

Jouand, Nicolas, Céline Bressollette-Bodin, Nathalie Gérard, Magali Giral, Pierrick Guérif, Audrey Rodallec, Romain Oger, et al. 2018. « HCMV Triggers Frequent and Persistent UL40-Specific Unconventional HLA-E-Restricted CD8 T-Cell Responses with Potential Autologous and Allogeneic Peptide Recognition ». PLOS Pathogens 14 (4): e1007041.

# Appel d'offres

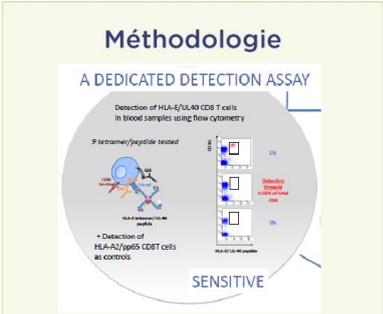
## CONTROLE IMMUN DE LA REPONSE ANTI-HCMV ET ALLOREACTIVITE CROISEE CIBLANT LES CELLULES ENDOTHELIALES DU GREFFON: DEFINITION ET ANALYSE D'UN NOUVEAU FACTEUR DE RISQUE

Jouand N<sup>1,3</sup>, Giral M<sup>1</sup>, Bressollette C<sup>1</sup>, Gérard N<sup>1</sup>, Cesbron A<sup>2</sup>, Gervois N<sup>3\*</sup>, Charreau B<sup>1\*</sup>.

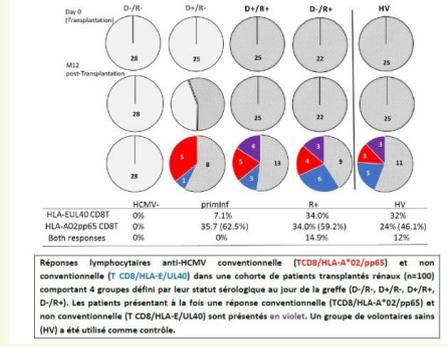
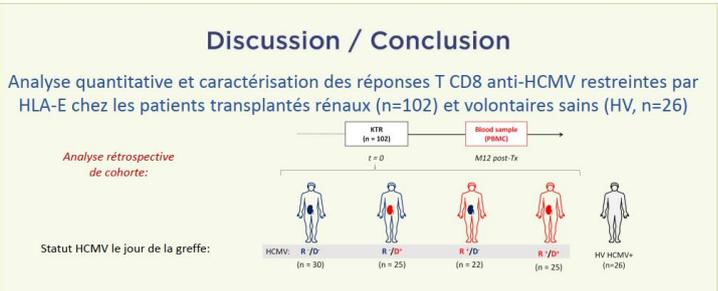
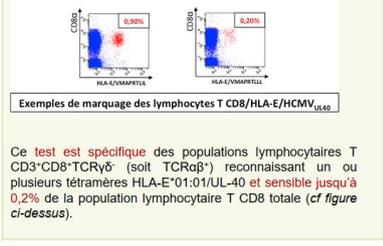
<sup>1</sup>Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Fr.  
<sup>2</sup>Institut de Transplantation-Urologie-Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Fr.  
<sup>3</sup>EFS, Pays de la Loire, Nantes, Fr.  
<sup>\*</sup>CRCNA, Nantes, Fr.

### Objectifs

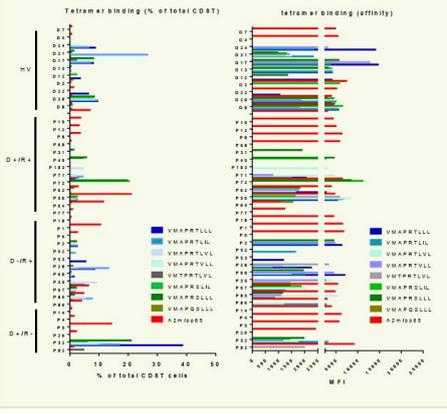
L'objectif principal était d'établir la preuve de concept qu'un test cellulaire identifiant une population de T CD8 dirigés contre un set de peptides communs au HCMV et certains HLA de classe I et présentés par HLA-E pourrait prédire le devenir du greffon. Les objectifs spécifiques sont (1) la mise au point d'un test de détection sensible et spécifique, des populations TCD8 HLA-E restreintes dirigées contre le HCMV dans le sang total par cytométrie multiparamétrique. et (2) l'étude rétrospective et cinétique post-greffe d'une cohorte de patients transplantés rénaux portant sur la détection de(s) population(s) TCD8+ HLA-E restreintes dirigées contre le HCMV et des alloptides.



Au cours de ce projet (Travaux de thèse de Nicolas Jouand 2014/2016) nous avons mis au point et validé un test de détection sensible et spécifique des lymphocytes T CD8/HLA-E/HCMV/UL40 dans le sang total des patients transplantés rénaux. Ce test nous a permis la mise en évidence de ces lymphocytes non conventionnels dans deux cohortes de patients transplantés rénaux et d'identifier les premiers paramètres cliniques et biologiques caractérisant la présence de ces cellules chez les transplantés. Ce test de détection a permis la preuve de concept de l'existence de cette réponse non conventionnelle et de son lien avec une infection à HCMV.



Nos résultats démontrent que : 1) l'infection à HCMV du receveur est indispensable pour le développement de lymphocytes T dirigés contre les complexes HLA-E/UL40, et qu'en conséquence 2), la présence de cette population lymphocytaire T n'est pas due au contexte de transplantation allogénique. En effet, ces lymphocytes T sont retrouvés chez environ 30% des receveurs HCMV<sup>+</sup> (D+/R+ ; D-/R+). Leur émergence apparaît également dans le groupe (D+/R-) mais exclusivement chez les patients receveurs ayant développé une primo-infection après la transplantation. Le pourcentage de lymphocytes T CD8/HLA-E/HCMV<sub>UL40</sub> est souvent élevé (pouvant atteindre jusqu'à 40% des lymphocytes T CD8 totaux). Cette réponse est variée, puisqu'elle a été identifiée avec 6 des 8 tétramères HLA-E/UL40 testés. Bien que légèrement inférieure en terme de fréquence chez les patients par rapport à celle d'une réponse T conventionnelle (HLA-A\*02 restreinte) contre le peptide immunodominant pp65 (environ 50% des receveurs HCMV<sup>+</sup>), elle peut être associée ou non à cette dernière.



En conclusion, nos travaux détectent et quantifient pour la première fois les réponses T CD8 restreintes par la molécule HLA-E induites lors d'infections à HCMV chez des patients transplantés. La fonction de cette population lymphocytaire induite par le HCMV pour le contrôle de l'infection virale est inconnue. Nous posons l'hypothèse que les cellules T CD8/HLA-E/HCMV<sub>UL40</sub> pourraient influencer le devenir du greffon par la reconnaissance croisée et la lyse des cellules allogéniques du greffon rénal et en particulier des cellules endothéliales exprimant fortement HLA-E à leur surface dans un contexte inflammatoire comme nous l'avons démontré précédemment (Coupert et al. Blood 2007).

Année: 2013

## Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B au cours du rejet chronique humoral d'allogreffe

HILLION Sophie - Université de Brest

[Retour tableau](#)

### Résumé

La transplantation est le traitement de choix pour remplacer un organe ou un tissu dont le fonctionnement est définitivement altéré. En transplantation humaine, l'induction d'une tolérance à une allogreffe est donc devenue l'objectif majeur. Les rejets hyperaigus et aigus sont des phénomènes bien contrôlés par les immunosuppresseurs, mais à ce jour, il n'existe aucun médicament permettant de contrôler efficacement le rejet chronique humoral (RHC). Bien que les lymphocytes T (LT) peuvent être considérés comme des acteurs clés de la reconnaissance allogénique aboutissant à la destruction du greffon, les LB (effecteurs de la réponse humorale) pourraient jouer un rôle sous-estimé et mal connu dans la réponse allogénique. Il semble désormais acquis que les LB jouent un rôle central dans le développement et le contrôle de l'immunité. Les LB peuvent agir par exemple comme cellules présentatrices d'antigène dans l'activation des LT CD4 et T CD8. Il a même été proposé récemment l'existence d'une catégorie de cellules B régulatrices productrices d'IL10 qui pourraient, à l'instar des cellules T régulatrices CD4+CD25+, réguler les différents phénomènes immuns et auto immuns. Enfin, de récents arguments tendent à montrer le rôle crucial des LB dans l'induction des phénomènes de tolérance au niveau des LT périphériques ouvrant ainsi une nouvelle voie de recherche dans l'étude de la réponse allogénique.

Notre objectif est d'étudier phénotypiquement et fonctionnellement les LB des patients transplantés rénaux ayant développé un rejet humoral chronique mais aussi chez ceux ne présentant que des anticorps anti-greffon sans signes histologiques de rejet. Après une étude préliminaire monocentrique, nous souhaitons étendre notre analyse à une étude multicentrique dans le cadre du réseau René Spiesser.

L'analyse phénotypique fine multi-paramétrique sera réalisée par cytofluorométrie (12 paramètres) chez les différents groupes de patients afin d'étudier la distribution des diverses populations de LB matures circulants. A cette analyse descriptive sera associée une analyse fonctionnelle de l'activité régulatrice des LB à l'aide d'un modèle de coculture cherchant à évaluer le potentiel régulateur des LB sur la fonction T (prolifération, production de cytokines TH1...). Nous avons d'ores et déjà montré que cette activité régulatrice pouvait s'avérer déficiente au cours du RHC. Aussi dans un 3e temps, après confirmation de ces résultats, nous chercherons à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces fonctions immuno-régulatrices.

Par cette évaluation de la fonction des LB au cours de la physiopathologie du RHC nous espérons mettre en évidence un nouvel outil diagnostique et/ou pronostic mais également permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques mieux adaptés au traitement du RHC.

### Résultats

Nouël, Alexandre, Isabelle Ségalen, Christophe Jamin, Laurent Doucet, Sophie Caillard, Yves Renaudineau, Jacques-Olivier Pers, Yannick Le Meur, et Sophie Hillion. 2014. « B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection ». *Kidney International* 85 (3): 590-99.

[Retour tableau](#)

Année: 2013

## Information aux futurs receveurs sur les risques liés aux dons : Evaluation des préférences des patients et des professionnels

VIDAL-TRECAN Gwenaëlle & Yvon CALMUS - Paris Descartes

[Retour tableau](#)

### Résumé

Actuellement, en France, les médecins ne doivent demander une autorisation écrite aux futurs receveurs que pour une greffe d'organe d'un sujet porteur de virus des hépatites B ou C. Aucune réglementation particulière (lois de bioéthique, Agence de la Biomédecine, jurisprudence) n'oblige explicitement à informer les futurs receveurs d'autres risques associés au don d'organe, à la technique de prélèvement ou aux conditions de préservation et demander un consentement explicite chez les patients prouvant le reçu des informations. Il nous semble donc qu'il existe une discordance entre la connaissance accumulée sur ces risques, et l'information potentiellement proposée aux receveurs. Cette discordance suggère que le sujet est délicat, et qu'il doit faire l'objet d'une analyse précise avant d'être exposé au public et aux décideurs.

De nombreux facteurs de risques mettant en jeu la sécurité immédiate, à moyen et long terme du receveur sont bien établis et définissent ce qu'on appelle les greffons marginaux : A) risque de dysfonctionnement du greffon : a) « Expanded Criteria Donor » ou critères élargis de don (âge élevé, hypertension), b) donneur à cœur arrêté, c) durées d'ischémie froide ou chaude prolongées, d) organe partagé (pour le foie), B) risque de transmission de maladies : a) infectieuse dont facteurs comportementaux, b) cancéreuses.

Peu d'études ont porté sur l'information à donner aux futurs receveurs. Un article américain de 2008 (1) a tenté de lancer la réflexion sur la responsabilité des équipes face à ces informations. Les auteurs plaident pour une information de façon spécifique, informant le receveur qu'il peut refuser un greffon à risque, ou l'accepter pour accélérer l'accès au greffon et réduire le risque de mortalité en liste d'attente lorsqu'il s'agit d'un greffon vital. Trois attitudes sont, en fait, possibles : (a) Ne pas donner d'information particulière au receveur : l'équité peut conduire à estimer qu'il n'y a pas de raison de diriger un greffon de bonne qualité vers un patient plutôt que vers un autre, (b) Proposer un groupe d'information « paquet » sur l'ensemble des risques potentiels tel que proposé par les auteurs américains et demander au patient un accord global, (c) Informer le patient des risques individuels potentiels des greffons et l'autoriser à accepter ou à refuser le greffon pour chaque risque identifié. Nous nous proposons trois études principales : (1) dans le but d'approcher le type d'information donnée et confirmer nos motifs de recherche, nous réaliserons (a) une enquête chez les médecins habilités à inscrire les patients sur la liste nationale d'attente (LNA) pour évaluer les informations proposées aux patients et décrire la situation actuelle et (b) un groupe de discussion ou « focus group » pour évaluer les opinions des médecins impliqués dans la transplantation sur le type des informations à proposer aux patients ; (2) en deuxième étape, nous évaluerons les autres sources d'information pour les patients que les professionnels de santé (les sites internet et les associations de transplantés) par une enquête chez les patients et les présidents des associations ; et (3) nous essayerons d'évaluer les opinions des patients sur la LNA, lors d'un bilan pré transplantation hépatique, rénale, cardiaque ou pulmonaire et des patients déjà greffés à l'aide d'auto-questionnaires appropriés, reposant sur des scénarios prédéfinis par la technique de choix discrets.

### Résultats

Kamran, Sara, Yvon Calmus, Marie Pascale Pomey, et Gwenaëlle Vidal-Trécan. 2015. « What Kind of Information About Marginal Donors Is Available Through Sources Other Than Health Care Professionals

for Patients on the Waiting List for Organ Transplantation? » Interactive Journal of Medical Research 4 (3): e15.

Kamran, Sara, Filomena Conti, Marie-Pascale Pomey, Gabriel Baron, Yvon Calmus, et Gwenaëlle Vidal-Trecan. 2017. « Patients' Preferences in Transplantation from Marginal Donors: Results of a Discrete Choice Experiment ». Transplant International, février, n/a-n/a.

[Retour tableau](#)

Année: 2014

## Tregs CD8+ spécifiques du donneur en allo-transplantation: d'un modèle animal à une application clinique?

**GUILLONEAU Carole** - INSERM, CHU Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

Objectifs :

La transplantation de rein est une thérapie essentielle dans le cadre de patients gravement atteints d'insuffisance rénale chronique. Cependant, le rejet de greffe, médié par l'activation du système immunitaire, est un frein à cette transplantation et oblige les patients à suivre un traitement lourd et provoquant de nombreux effets secondaires. Néanmoins, le système immunitaire contient également des cellules qui lorsqu'elles sont activées inhibent les cellules effectrices qui vont détruire le greffon. Il existe plusieurs types de ces cellules et le projet actuel porte sur l'analyse d'une de ces sous-populations qui est parmi les moins étudiées : les lymphocytes T régulateurs CD8+.

Les Tregs CD8+ ont été associés dans la littérature avec moins d'épisodes de rejet et même induction de la tolérance, l'absence ou la réduction de l'immunosuppression des receveurs d'une allogreffe du foie et d'intestin, de coeur et de reins. Ce projet propose d'utiliser nos connaissances de cette population en clinique avec l'utilisation des Tregs CD8+ comme thérapie cellulaire et l'utilisation de leurs marqueurs spécifiques et/ou de leurs propriétés pour la prédiction de l'évolution de la transplantation et du patient.

Méthodologie :

1) Propriétés des Tregs CD8+CD45RClow chez des volontaires sains vs patients transplantés : identification de marqueurs d'évolution des greffons.

Nous avons accès à une grande cohorte de patients transplantés présentant des évolutions différentielles de leurs greffons rénaux (DIVAT-cohorte) couplée à une biocollection (DIVAT-Biocoll). Nous allons analyser avec de nouveaux marqueurs le phénotype de la population CD8+CD45RClow pour mieux définir les Tregs parmi cette population et comparer le phénotype, le profil des cytokines, la capacité suppressive et cytotoxique, ainsi que le répertoire TCR des cellules Tregs CD8+CD45RClow chez des volontaires sains vs. des patients transplantés avant et après activation allogénique.

2) Expansion ex vivo des Tregs CD8+CD45RClow humaines et acquisition d'allo-spécificité : mise en place d'un protocole clinique.

Nous allons tester différentes conditions de culture (+/-CD40lg, # stimulation et cytokines) et évaluer l'amplification, le phénotype, la capacité de suppression et le répertoire des Tregs humaines allo-stimulées CD8+CD45RClow.

3) Evaluation préclinique du potentiel des Treg CD8+CD45RClow.

En collaboration avec une plate-forme de rongeurs humanisés, nous allons utiliser un modèle de souris humanisé NSG. Ces souris seront transplantées avec des greffes de peau humaine et recevront des cellules humaines T CD4+CD25- effectrices allogéniques (ou des PBMC totaux) +/- des Tregs CD8+CD45RClow naturels ou expandues et allospécifiques ou non. Les greffes seront analysées pour la présence de signes histopathologiques de lésions tissulaires.

Résultats attendus :

De façon générale, ce projet permettra de décrire une nouvelle population de cellules Tregs CD8+ et abordera leur rôle en transplantation humaine. Concrètement, nous espérons que ce projet permettra d'améliorer le pronostic et le diagnostic des patients avant et après transplantation d'organe et l'établissement de nouvelles stratégies d'induction de tolérance.

## Résultats

Brevet : GUILLONNEAU C, ANEGON I, BEZIE S. Nouvelle sous-population de lymphocytes t régulateurs cd8 + cd45rclo et utilisations de ceux-ci. WO2017042170 A1, 2017.

[Retour tableau](#)

Année: 2014

## Le Récepteur Minéralocorticoïde Vasculaire : Acteur au cours de l'Ischémie Reperfusion et Cible Thérapeutique en Transplantation Rénale

JAISSER Frederic - INSERM

[Retour tableau](#)

### Résumé

Objectifs :

L'objectif est d'apporter un rationnel fort pour de futurs essais cliniques permettant le repositionnement des antagonistes du récepteur minéralocorticoïde (RM) à la phase aigüe de la transplantation rénale pour lutter contre les effets délétères immédiats et à long-terme de l'ischémie-reperfusion (IR) du greffon rénal (en particulier en cas de greffons obtenus à partir de donneurs limites) en utilisant :

1) Une approche mécanistique : Etudier l'implication du RM vasculaire, endothélial et musculaire lisse par une approche génétique utilisant des modèles murins transgéniques, invalidés sélectivement pour le RM dans le tissu endothélial (Modèle MRKO-Endothélial) et musculaire lisse (Modèle MRKO-VSM) dans l'IR. Cette approche sélective permettra de préciser le rôle du MR vasculaire dans chacun de ces types cellulaires dans la protection pharmacologique observée.

2) Une approche pharmacologique préclinique : Etudier les effets et la sécurité d'emploi du blocage pharmacologique du RM par l'acide canrénoïque, métabolite actif de la spironolactone – médicament déjà utilisé chez l'homme dans d'autres indications - dans un modèle préclinique, très proche de la transplantation humaine : le modèle d'autogreffe rénale chez le cochon (le financement demandé ne couvre que cet aspect).

Résultats attendus :

1) mettre en évidence le rôle joué par le RM vasculaire dans la physiopathologie de l'IR rénale. Cette approche améliorera notre compréhension des mécanismes mis en jeu au cours de l'IR rénale.

2) Définir si l'effet bénéfique du blocage du RM préalablement observé chez les rongeurs est transposable dans un modèle préclinique d'auto-transplantation rénale chez le cochon, en améliorant la reprise fonctionnelle et en diminuant les lésions à court et à moyen terme.

Méthodologie :

1) une IR sera réalisée par clampage bilatéral (25 min) des pédicules rénaux chez des souris mâles C57Black6 invalidées pour le gène du RM soit dans l'endothélium soit dans le muscle lisse vasculaire.

Les explorations réalisées à court terme (24h) ou long terme (4 semaines) après IR permettront d'étudier la fonction rénale par la mesure de l'urée et de la créatinine plasmatiques et urinaires (cages à métabolisme), le flux sanguin dans l'artère rénale (à l'aide d'une sonde Transonic), les lésions histologiques (vacuolisation et nécrose tubulaires, fibrose), l'expression moléculaire (ARN et protéine) de marqueurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, marqueurs de polarisation des macrophages), de lésions rénales (tels que la lipocaline 2, KIM-1 et klotho), du stress oxydant et de la fibrose du parenchyme.

2) Chez des cochons de 45kg environ, le rein droit sera prélevé à J-1, perfusé et conservé dans un liquide de conservation de type UW à 4°C et autogreffé à J0. Dans le groupe traité par acide canrénoïque (Soludactone®), les animaux recevront une dose de 7 mg/kg en IV trois heures avant la néphrectomie, puis à J1 (5 min après la reperfusion) J2 et J3 de la greffe, et le liquide de perfusion et de conservation sera additionné de Soludactone® 1 mg/l. Des échantillons sanguins et urinaires seront collectés tout au long de l'expérience pour analyses biochimiques et analyse de la fonction rénale et des marqueurs moléculaires de lésion rénale (voir ci-dessus). Des biopsies systématiques du greffon seront pratiquées à

J7, J14, J30 et J90 afin d'évaluer les lésions histologiques et d'effectuer des analyses moléculaires des marqueurs de lésion rénale, d'inflammation, de stress oxydant et de fibrose.

### **Résultats**

Barrera-Chimal, Jonatan, Gwennan André-Grégoire, Aurelie Nguyen dinh Cat, Sebastian M. Lechner, Jérôme Cau, Sonia Prince, Peter Kolkhof, et al. 2017. « Benefit of Mineralocorticoid Receptor Antagonism in AKI: Role of Vascular Smooth Muscle Rac1 ». Journal of the American Society of Nephrology 28 (4): 1216-26.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

## Jonctions communicantes et connexines, nouvelles cibles de l'immunité humorale dans la vasculopathie de transplantation

AUGE Nathalie - U1048, I2MC CHU Rangueil, Toulouse

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Rationnel

La vasculopathie de transplantation (VT) est la première cause de décès à long terme des patients transplantés. Cette pathologie se caractérise par le développement d'une hyperplasie intimale dans le vaisseau du greffon, dû à la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) d'où un épaississement néo-intimal concentrique, conduisant à une ischémie et à la perte fonctionnelle de l'organe greffé. La réponse immunitaire humorale (anticorps anti-HLA), joue un rôle dans la prolifération des CML, cependant les mécanismes impliqués dans ces événements sont mal identifiés. Nos travaux récents ont mis en évidence une implication de la voie des sphingolipides (sphingomyélinase neutre de type 2, nSMase2, et sphingosine 1-phosphate, S1P), dans le développement de la VT. La régulation de cette voie par les anticorps anti-HLA n'est pas connue.

#### Objectif

Notre objectif est d'étudier le rôle des jonctions communicantes (jonction-gap) sur le développement de la VT, et les liens avec les sphingolipides. Les jonctions-gap et surtout la connexine 43 (Cx43) pourraient par ailleurs intervenir dans les communications entre cellules endothéliales (CE) et CML, qui contribuent à la VT.

#### Déroulement du projet et Résultats attendus

Nous étudierons l'expression de Cx43 dans les CML et les CE humaines, et son activation par W6/32. Les liens de Cx43 avec la voie des sphingolipides, (nSMase2, S1P) seront étudiés, tels que l'implication de nSMase2 et/ou S1P dans l'activation de Cx43, ou à l'inverse, l'effet d'inhibiteurs de Cx43 sur l'activation de nSMase2, la génération de S1P, la prolifération cellulaire, la transmission de signaux mitogènes, les interrelations CE/CML. Les résultats préliminaires montrent une implication de Cx43 en amont de nSMase2 et de la S1P.

#### Méthodologie

Ce projet associe des travaux sur CML humaines stimulées par un anticorps anti-HLA (W6/32) et des inhibiteurs des connexines, pharmacologiques (carbenoxolone), peptides bloquants (gap26 spécifique de Cx43), siRNA ou cellules mutantes). In vivo, nous utiliserons le modèle de xéno greffe développé par l'équipe, qui permet d'étudier le rôle des Ac anti HLA dans la VT : Des souris SCID/beige sont greffées avec des artères mésentériques humaines, et injectées de façon répétée avec W6/32. Ces souris développent des lésions de VT en quelques semaines, et représentent un outil de choix pour étudier l'effet protecteur d'agents thérapeutiques inhibiteurs de la VT.

#### Conclusions

Ce projet original ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ciblant la voie des jonctions-gap et leur lien avec les sphingolipides, ceci dans le but à moyen terme, de bloquer le développement de lésions de VG et prévenir le rejet chronique de greffe chez les patients.

### Résultats

Lallemand, Tom, Myriam Rouahi, Audrey Swiader, Marie-Hélène Grazide, Nancy Geoffre, Paul Alayrac, Emeline Reczens, et al. 2018. « nSMase2 (Type 2-Neutral Sphingomyelinase) Deficiency or Inhibition by

GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in Apoe<sup>-/-</sup> Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (7): 1479-92.

Poster

Figure 2. Effet des inhibiteurs de connexines sur le développement de l'hyperplasie intimale induite par l'apoptose de W6/32 chez la souris SCID/beige greffée. Evaluation morphométrique de l'épaisseur néointimale des artères humaines greffées chez la souris SCID/beige traitées avec soit le PBS (contrôle) (n=6), soit avec W6/32 (n=7), W6/32 plus carbenoxolone (CBN) (n=6), W6/32 plus Gap26 (Gap) (n=6), W6/32 plus PBS (n=6), W6/32 plus Gap26 (n=6), W6/32 plus PBS (n=6), W6/32 plus Gap26 (n=6), W6/32 plus PBS (n=6), W6/32 plus Gap26 (n=6). L'hyperplasie intimale est évaluée par mesure néointimale comme suit



## Immunité humorale et hyperplasie intimale au cours du rejet de greffe: Rôle des connexines

Nelly Candela<sup>1,2</sup>, Nathalie Augé<sup>1</sup>, Nassim Kamar<sup>2</sup>, Robert Salvayre<sup>1</sup>, Anne Nègre-Salvayre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR 1048, I2MC Toulouse, France, <sup>2</sup>Département de Néphrologie et Transplantation d'organes, CHU de Toulouse, France



### Introduction

La vasculopathie du greffon (VG) est la première cause de décès à long terme des patients transplantés. Cette pathologie se caractérise par le développement d'une hyperplasie intimale dans le vaisseau du greffon, résultant de la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) d'où un épaississement néo-intimal concentrique, conduisant à une ischémie et à la perte fonctionnelle de l'organe greffé. La réponse immunitaire humorale (anticorps anti-HLA), joue un rôle dans la prolifération des CML, cependant les mécanismes impliqués dans ces événements sont mal identifiés. La prolifération des CML impliquerait la voie des sphingolipides (sphingomyélinase neutre de type 2, nSMase2, et sphingosine 1-phosphate), dans le développement de la VG (Galvani *et al*, 2011). La régulation de cette voie par les anticorps anti-HLA n'est pas connue. Nos travaux précédents ont montré que *in vitro*, la prolifération des CML induite par W6/32 serait inhibée par les inhibiteurs des jonctions communicantes (jonction-gap), *via* une inhibition de la génération de S1P.

### Résultats et Discussion

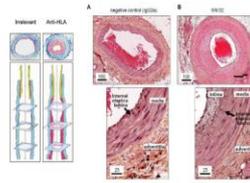


Figure 2: Effet de W6/32 sur le développement de l'hyperplasie intimale chez la souris greffée et traitée par W6/32 (Galvani *et al* (Circulation 2011)).

A gauche, reconstitution morphométrique de l'hyperplasie intimale. A droite, caractérisation de l'hyperplasie intimale après coloration H/E

### Objectifs

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet des inhibiteurs de connexines sur le développement de la VG *in vivo*, dans le modèle animal de xéno greffe c.a.d. des souris SCID/beige greffées avec des artères mésentériques humaines et injectées avec W6/32.

### Methodologies

#### Modèle de xéno greffe

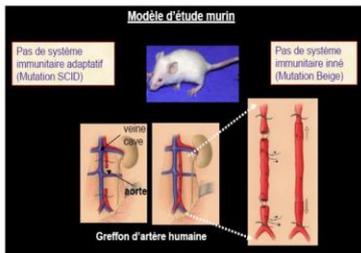


Figure 1: Greffe d'artère mésentérique humaine chez la souris SCID/ BEIGE (Yacoub-Youssef *et al.*, 2005)

#### Injection de W6/32 et inhibiteurs

Les souris greffées sont injectées 1 fois par semaine par voie IV avec W6/32 (1µg/ml), pendant 6 semaines. Les souris sont (ou non traitées avec deux inhibiteurs de connexines

- Carbenoxolone, inhibiteur de large spécificité (10 µg/kg) 2 injections/semaine
- Gap26 (1µg/kg) 1 injection/semaine

L'étude a été réalisée sur 32 souris, réparties sur 5 séries, comme suit:

- 8 souris + PBS
- 4 souris + CBN (carbenoxolone) seul
- 7 souris + W6/32 seul
- 5 souris + W6/32 + CBN
- 4 souris + Gap 26 (Gap) seul
- 4 souris + W6/32 + Gap 26

Après 6 semaines, les souris sont sacrifiées, et les segments artériels humains sont récupérés et fixés dans du paraformaldéhyde (4% dans du PBS), puis inclus en paraffine. Une partie des coupes est colorée pour quantifier l'épaississement (coloration hématoxyline/éosine, ou pour les analyses en immunofluorescence.

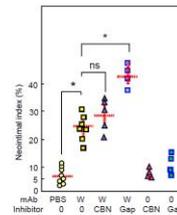


Figure 3: Effet des inhibiteurs de connexines sur l'hyperplasie intimale induite par W6/32

Evaluation morphométrique de l'épaisseur néointimale (mesure de l'index neointimal, Galvani *et al*, 2011).

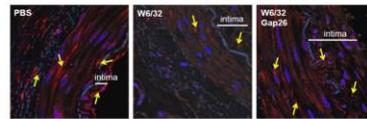


Figure 4: Immunofluorescence et microscopie confocale de Cx43 dans les greffons d'artères mésentériques humaines

De gauche à droite, souris contrôles (PBS), traitées par W6/32, et W6/32/Gap26. La barre blanche visualise l'épaississement intimal. Les flèches jaunes indiquent l'expression de Cx43. Images représentatives de 3 souris étudiées séparément

### Discussion et Perspectives

Les résultats montrent que l'inhibition des connexines et surtout de Cx43, potentialise l'hyperplasie intimale induite par W6/32 chez les souris greffées, ce qui suggère une communication dysfonctionnelle entre cellules endothéliales (CE) et musculaires lisses (CML), favorisant la prolifération des CML dans l'intima. Ces résultats ne valident pas l'hypothèse de départ, basée sur nos observations *in vitro*, montrant que l'inhibition de Cx43 bloque la prolifération des CML induite par W6/32, ce qui suggère une signalisation différente des connexines dans les CE et les CML.

Ces résultats soulignent l'importance des interactions entre W6/32 et l'endothélium dans le développement de la VG, et sur le rôle des modifications de la perméabilité endothéliale sous l'effet des anticorps anti-HLA, et leurs conséquences dans la VG.

### Références

- Chadjichristos *et al*, Circ.Res. 28:653;2008
- Galvani *et al*, Circulation. 124:2725, 2011
- Yacoub-Youssef H *et al*, Transplant Proc. 37:75; 2005

Année: 2015

## Suivi de la microarchitecture osseuse par tomographie périphérique quantitative de haute résolution chez le patient transplanté

**BACCHETTA Justine** - Inserm 1033 LYOS, prévention des maladies osseuses

Hôpital Edouard Herriot

Lyon

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Rationnel

Que ce soit une transplantation rénale avec les facteurs de risque osseux associés (ostéodystrophie rénale préexistante, malnutrition, inflammation chronique, hypogonadisme et protocoles d'immunosuppression souvent constitués en partie par des corticothérapies à fortes doses), ou une transplantation d'autre organe solide (avec une proportion substantielle de patients ostéoporotiques au moment de la greffe), le risque osseux dans la période post-greffe immédiate est notable. Le lien entre morbidité osseuse et cardiovasculaire est actuellement bien démontré. Le suivi osseux repose sur des outils biologiques, radiologiques et histologiques. L'ostéodensitométrie (DXA) est classiquement utilisée pour mesurer la masse osseuse, mais la tomographie périphérique quantitative de haute résolution (HR-pQCT) a l'avantage d'être une technique plus précise, permettant une étude tridimensionnelle de la microarchitecture trabéculaire et de la densité osseuse volumétrique compartimentale (totale, corticale, trabéculaire), tout en étant similaire à la DXA en terme d'irradiation (moins de 5  $\mu$ Sv). Le suivi général repose sur un suivi cardiaque (échographie cardiaque) et vasculaire (pression artérielle, doppler des troncs supra-aortiques) régulier.

#### Objectifs

L'objectif principal de TRANSOS, étude lyonnaise et stéphanoise, est d'évaluer l'évolution de la densité corticale au tibia entre baseline et 6 mois mesurés par HR-pQCT, avec secondairement une analyse de trajectoire des valeurs observées (baseline, 6 mois, 2 ans et 5 ans en fonction des financements obtenus), chez tous les patients de plus de 10 ans recevant une première greffe d'organe solide.

De plus, une collaboration internationale avec l'équipe du Professeur T Nickolas à l'université de Columbia (New York, USA), qui a un protocole similaire en cours, permettrait d'étudier l'impact des différents traitements immunosuppresseurs sur l'os après greffe, les protocoles de soins étant en effet différents entre les équipes françaises et américaines.

#### Résultats attendus

L'analyse des résultats permettra d'apporter un éclairage sur l'ostéo- et la vasculo-toxicité des différents immunosuppresseurs, et donc à terme d'adapter les protocoles d'immunosuppression en fonction des différents profils de patients. Comme les protocoles de recherche sont homogènes entre France et USA, cela permettrait à terme de proposer une méta-analyse des données individuelles, ce qui permettra vraiment d'améliorer nos connaissances sur le métabolisme osseux après greffe.

#### Méthodologie

TRANSOS est une cohorte prospective et longitudinale, des patients recevant une première greffe d'organe solide (rein, coeur, poumons, pancréas) au sein des CHU de Lyon et de Saint-Etienne, avec évaluation osseuse (DXA et HR-pQCT) et suivi biologique et cardiovasculaire classique.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

## Déterminer le rôle de CLEC-1 dans les cellules dendritiques humaines et la polarisation des LT CD4+ Th17

**CHIFFOLEAU Elise** - UMR/ITUN/Inserm U1064

CHU Hôtel Dieu Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

Nous proposons dans ce projet d'analyser la fonction de CLEC-1, un récepteur « lectin-like » de type C, que nous avons identifié comme étant sur-exprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. CLEC-1 appartient à la famille des gènes « lectin-like » codant pour des protéines ayant des fonctions importantes dans la réponse immune des cellules myéloïdes et pouvant posséder à la fois des ligands exogènes et endogènes. CLEC-1 est un récepteur orphelin qui avait été décrit précédemment comme étant exprimé par les cellules dendritiques (DCs) et endothéliales, cependant sa fonction n'avait pas été étudiée.

Nous avons publié que CLEC-1 est exprimé par les cellules myéloïdes dont les DCs chez le rat et est diminuée par des stimuli pro-inflammatoires et augmentée par les cellules T CD4+CD25+ régulatrices ou l'IL-10. D'autre part, nous avons montré que CLEC-1 modère la réponse secondaire Th17 des LT CD4+ en Réaction Lymphocytaire Mixte (MLR) chez le rat. Depuis, nous avons généré une protéine de fusion CLEC-1 Fc de rat et observé que bloquer l'interaction CLEC-1/CLEC-1L augmente la réponse proliférative des LT et la sécrétion d'IL-17. D'autre part, la génération de rat KO pour CLEC-1 a permis de confirmer ce rôle dans le contrôle de la réponse effectrice Th17. Chez l'Homme, nous observons que la protéine recombinante CLEC-1 humaine inhibe la prolifération des LT en MLR. D'autre part, la génération d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie humaine extra-cellulaire de CLEC-1 montre que CLEC-1 est exprimé à la surface des DC humaines dérivées des monocytes (moDCs) et est diminué par des stimuli pro-inflammatoires. De façon intéressante, les moDC cultivées en présence de la cytokine régulatrice IL-10 (DC10) et possédant des propriétés régulatrices expriment de plus fortes quantités de CLEC-1.

Notre projet présenté ici vise à étudier la fonction de CLEC-1 dans les DC humaines. Nous testerons l'effet agoniste de l'anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire de CLEC-1 (qui mimerait le ligand) sur l'activation, la maturation et la capacité des DCs humaines à moduler la réponse Th17. D'autre part, cet anticorps permettra d'étudier la voie de signalisation de CLEC-1 inconnue à ce jour en étudiant la phosphorylation de protéines. A l'inverse, nous utiliserons des siRNA pour inhiber l'expression de CLEC-1 dans les DC et DC-10 et analyserons l'effet sur leur capacité à différencier des cellules T CD4+ effectrices (en MLR).

Les réponses Th17 sont associées aux rejets en transplantation mais aussi aux inflammations chroniques ou aux maladies auto-immunes et sont également cruciales pour la défense envers les bactéries extracellulaires, les champignons et les parasites. Par conséquent, il existe un fort intérêt à identifier et à étudier des facteurs cellulaires tel que CLEC-1 pour limiter une inflammation de type Th17 excessive ou erronée. Nous disposons dans le laboratoire de la technologie et du savoir-faire pour développer ce projet sur 2 ans.

## Résultats

Chiffolleau, Elise. 2018. « C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets ». *Frontiers in Immunology* 9.

Robles, Maria Dolores Lopez, Annaick Pallier, Virginie Huchet, Laetitia Le Texier, Severine Remy, Cecile Braudeau, Laurence Delbos, et al. 2017. « Cell-Surface C-Type Lectin-like Receptor CLEC-1 Dampens Dendritic Cell Activation and Downstream Th17 Responses ». *Blood Advances* 1 (9): 557-68.

[Retour tableau](#)

Année: 2016

## Cellules Natural Killer et virus de l'hépatite E : complices ou rivaux dans la transplantation d'organes ?

**JABRANE-FERRAT Nabila** - Centre physiopathologie Toulouse Purpan, UMR1043 Inserm-UMR 4282, CNRS Univ Toulouse III, Chu Purpan

[Retour tableau](#)

### Résumé

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un petit virus à ARN simple brin de polarité positive. L'infection par VHE de génotype 3 est généralement résolutive chez le sujet immunocompétent mais peut être responsable d'hépatites chroniques chez les patients immunodéprimés.

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules de l'immunité innée capables de reconnaître des cellules infectées par des virus et de les éliminer. Les cellules NK interagissent avec différents acteurs de l'immunité tels que les cellules dendritiques afin d'amplifier la réponse immune sur le site de l'infection. Enfin, ces cellules sont capables de contrôler la réponse immunitaire adaptative.

Notre hypothèse est que des dérèglements de la fonction des cellules NK au cours de l'infection VHE chez des sujets transplantés d'organes sont à l'origine de l'évolution vers une infection chronique.

Notre projet se décline ainsi en 3 objectifs principaux i) caractérisation phénotypique des cellules immunitaires lors de l'infection VHE, ii) compréhension de l'impact de l'infection sur les fonctions effectrices des cellules NK et définition de la place de ces cellules dans la modulation de la réponse immune globale, iii) identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la réponse des cellules NK au cours de l'infection: rôle des variants des NCR et des miARN. L'identification d'une signature cellulaire et moléculaire qui régule les fonctions des cellules NK nous aidera à mieux caractériser la pathogenèse du VHE dans le cadre de la transplantation d'organe et pourrait ouvrir des perspectives quant à une modulation pharmacologique au bénéfice des patients.

[Retour tableau](#)

Année: 2017

## Immunité humorale et hyperplasie intimale au cours du rejet de greffe: Rôle des connexines et recherche de marqueurs

**AUGE Nathalie** - U1048, INSERM, équipe 10

CHU Rangueil, Toulouse

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Objectifs

La vasculopathie de transplantation (VT) est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients greffés. Cette pathologie se caractérise par le développement d'une hyperplasie intimale dans le vaisseau du greffon, due à une prolifération des cellules musculaires lisses (CML), une ischémie et une perte fonctionnelle de l'organe greffé. L'immunité humorale (anticorps anti-HLA) aggraverait la perte du greffon, en stimulant la prolifération des CML, via la génération de sphingosine 1-phosphate (S1P), impliquée dans la prolifération cellulaire. Nos résultats actuels montrent que l'effet mitogène des anticorps anti-HLA W6/32 sur les CML in vivo pourrait résulter d'une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (CE), et l'administration d'inhibiteur de connexines chez les souris SCID/beige greffées et injectées avec W6/32, aggraverait le développement de la VT

Par ailleurs, la sécrétion de S1P augmenterait dans le plasma de souris greffées et injectées avec W6/32, suggérant que S1P pourrait être à la fois une cible thérapeutique et un marqueur circulant de la VT.

Notre projet a deux objectifs:

- Caractériser la dysfonction endothéliale induite par W6/32, et le rôle de Cx43 dans la signalisation des anticorps anti-HLA
- Caractériser la S1P en tant que marqueur plasmatique d'évolution de la VT.

#### Déroulement du projet et Résultats attendus

Nous étudierons la dysfonction endothéliale induite par W6/32 (augmentation de perméabilité membranaire, diminution de la génération de NO) et l'effet de W6/32 sur l'expression et la phosphorylation de Cx43 dans les cellules endothéliales (CE). La signalisation de W6/32 sera étudiée sur la fonction endothéliale, la génération de S1P et la prolifération des CML. Nous étudierons le rôle de Cx43 dans la communication entre CE et CML et la production de S1P. Dans la deuxième partie du projet, nous évaluerons le taux de S1P plasmatique et d'anticorps anti-HLA dans le plasma de patients greffés, afin de déterminer l'intérêt de S1P en tant que marqueur du rejet

#### Méthodologie

Etudes de perméabilité membranaire des CE à l'aide de dextran fluorescent (PM 50 KDa) en chambre de Boyden), +/- les inhibiteurs de connexine (carbenoxolone, siRNA, peptides bloquants. Expression et activité de e-NOS (western-blot) et production de NO (sonde DAF2). Coculture CE/CML, et étude de la prolifération des CML en fonction des traitements des CE (marquage PCNA). Caractérisation des voies mitogènes (S1P) après inhibition de Cx43. Dosage de S1P plasmatique sur des cohortes de patients avant la greffe et en suivi (kit ELISA Echelon et plate-forme lipidomique).

Ce projet permettra de clarifier les interactions CE/CML le rôle des jonctions-gap et leur lien avec la S1P, afin de cibler ces voies sur un plan thérapeutique. La caractérisation de S1P plasmatique en tant que marqueur de rejet aurait un intérêt considérable pour le suivi des patients transplantés, pour lesquels il n'existe pas de moyen efficace de dépistage du rejet.

[Retour tableau](#)



Année: 2017

## Obtention et évaluation in vitro des anticorps humains monoclonaux neutralisant le polyomavirus BK

**McILROY Dorian** - EA 4271, UFR Pharmacie, Nantes

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Objectifs

Le polyomavirus BK (BKPyV) est responsable de néphropathies tubulo-interstitielles, particulièrement chez les patients transplantés de rein, et il est associé à la survenue de cystites hémorragiques chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement antiviral spécifique et efficace capable de contrôler ces réactivations. L'objectif de ce projet est d'isoler et de caractériser des anticorps monoclonaux humains dirigés contre le BKPyV capables de neutraliser un spectre large de génotypes viraux, y compris les variants retrouvés dans des isolats cliniques.

#### Résultats attendus

A l'aboutissement de ce projet, nous aurons isolé les premiers anticorps monoclonaux humains dirigés contre le BKPyV, et démontré l'efficacité antivirale de ceux-ci in vitro. Ces anticorps monoclonaux seront brevetables, avec une utilisation potentielle en tant qu'agent thérapeutique contre les néphropathies et les cystites hémorragiques à BKPyV.

#### Méthodologie

Des lymphocytes B exprimant des immunoglobulines spécifiques du BKPyV seront triés à partir des cellules mononucléées sanguines (PBMC) de receveurs de greffe de rein ayant présenté une réactivation du BKPyV caractérisée par 1) une virurie >107 copies/mL ou virurie + virémie, 2) une augmentation du titre neutralisant du sérum de plus d'un log10, et 3) la suppression durable de la réplication virale par la suite. Les PBMC de cinq patients remplissant ces critères, congelées au moment de la mise en place de la réponse humorale, sont déjà disponibles pour cette étude. Des particules pseudovirales (virus-like particles, VLP) conjuguées avec des fluorophores seront utilisées pour marquer des lymphocytes B mémoires, qui seront ensuite triés en cellules uniques par cytométrie en flux. Les gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines seront amplifiés par RT-PCR et clonés dans des vecteurs d'expression. Des cellules humaines HEK 293A seront co-transfectées avec un plasmide codant pour la chaîne lourde et un plasmide codant pour la chaîne légère correspondante. Les anticorps monoclonaux sécrétés par les cellules transfectées seront purifiés, puis nous évaluerons leur capacité à neutraliser l'ensemble des génotypes du BKPyV et un panel d'isolats cliniques dérivés de receveurs de greffe de rein présentant une réactivation prolongée du BKPyV. L'affinité des anticorps pour les antigènes de capsid des différents génotypes du BKPyV sera évaluée par résonance plasmonique de surface.

### Résultats

McIlroy, Dorian, Mario Hönemann, Ngoc-Khanh Nguyen, Paul Barbier, Cécile Peltier, Audrey Rodallec, Franck Halary, et al. 2020. « Persistent BK Polyomavirus Viruria Is Associated with Accumulation of VP1 Mutations and Neutralization Escape ». *Viruses* 12 (8): 824.

Nguyen, Ngoc-Khanh, Marie-Claire Devilder, Laetitia Gautreau-Rolland, Cynthia Fourgeux, Debajyoti Sinha, Jeremie Poschmann, Maryvonne Hourmant, Céline Bressollette-Bodin, Xavier Saulquin, et Dorian

McIlroy. 2023. « A Cluster of Broadly Neutralizing IgG against BK Polyomavirus in a Repertoire Dominated by IgM ». Life Science Alliance 6 (4): e202201567. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201567>.

1 demande de brevet en cours

[Retour tableau](#)

**Année: 2018**

## THERAPIE CELLULAIRE: Analyse des déterminants immunologiques de la réponse clinique observée après Traitement par Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) Allogéniques chez les patients atteints de Sclérodermie Systémique

**FARGE Dominique** - Unité de Médecine Interne UF04 : Maladies Auto-immunes et Pathologie Vasculaire,

Centre de référence des maladies auto-immunes systémiques rares d'Ile-de-France, Filière 'FAI2R' – Hôpital Saint-Louis

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Objectifs

Les objectifs initiaux du projet global déposé à l'appel d'offre recherche 2018 étaient :

- d'analyser les effets immuno-modulateurs et anti-fibrotiques de l'injection de cellules souches mésoenchymateuses allogéniques (allo-CSM) dérivées de la moelle osseuse (MO) (allo-CSM-MO) au plan systémique et cutané chez 12 patients atteints de Sclérodermie Systémique (SSc) traités dans l'essai français de phase I-II (NCT02213705, financement PHRC AOM 11-250).
- d'améliorer la compréhension des inter-relations entre capacité immunorégulatrice des allo-CSM-MO et réponse clinique observée, immunologique et cutanée chez les patients SSc avant, 1 et 3 mois après traitement.

La demande initiale de soutien dans le cadre de l'appel d'offres Recherche de l'ABM était de 40 000 €. La somme attribuée par l'ABM a été de 10 000€, nous ayant conduit à restreindre nos objectifs scientifiques à l'analyse des effets immuno-modulateurs des allo-CSM-MO au plan systémique.

#### Méthodologie

Le matériel analysé a été obtenu à partir d'échantillons issus d'une collection biologique déclarée aux autorités de santé compétentes dans le cadre de la recherche clinique NCT02213705.

Les effets immuno-modulateurs des allo-CSM-MO ont été étudiés par :

- l'analyse spécifique des sous-populations lymphocytaires dans le sang périphérique des patients prélevés avant, à 1 mois (M1) puis à 3 mois (M3) après injection d'allo-CSM-MO, réalisée par cytométrie

en flux sur cellules mononucléées de sang périphérique, puis complétées par des approches transcriptomiques et fonctionnelles sur des sous-populations d'intérêt pour leur effet immunosuppresseur.

- l'analyse de facteurs solubles impliqués dans la physiopathologie de la SSc, réalisée par Luminex sur des échantillons de plasma de patients SSc prélevés avant, à 3 mois puis à 6 mois après injection d'allo-CSM-MO

- la caractérisation fonctionnelle in vitro des propriétés immuno-suppressives réalisées sur les CSM-MO issus des différents donneurs de moelle osseuse.

La corrélation de l'ensemble des résultats de ces analyses avec la réponse clinique des patients a ensuite été testée.

Résultats obtenus :

L'injection d'allo-CSM-MO chez les patients SSc est associée à une augmentation du taux de lymphocytes T CD8pos (à M1) et de NK (à M1 et M3) ainsi qu'à l'induction de populations lymphocytaires immuno-suppressives, dont les propriétés transcriptionnelles et fonctionnelles ont été analysées par de nouvelles techniques quantitatives d'évaluation immunologique.

Les patients qui sont apparus répondeurs au plan clinique à 3 ou 6 mois après injection de CSM-MO présentaient un taux élevé de TGF- $\beta$  plasmatique. L'absence de réponse clinique est associée à une caractérisation in vitro des CSM-MO montrant une faible activité IDO, une faible production de CCL2 et une faible expression de HLA-DR.

En conclusion, le suivi immunologique des patients traités par allo-CSM-MO a été amélioré par l'analyse de différents aspects immunologiques essentiels à la compréhension des mécanismes d'action des CSM, et des fonctions immunosuppresseives associées au bénéfice clinique des CSM-MO ont été suggérées.

## Résultats

Farge, Dominique, Séverine Loisel, Pauline Lansiaux, et Karin Tarte. 2021. « Mesenchymal stromal cells for systemic sclerosis treatment ». *Autoimmunity Reviews* 20 (3): 102755. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102755>.

[Retour tableau](#)

**Année: 2018**

## Néphropathie à BK-virus : épuisement des lymphocytes T spécifiques du BK-virus et restauration fonctionnelle

**TAOUFIK YASSINE** - Université Paris Sud, UMR 1184, CEA, DSV/iMETI, Division d'Immuno-Virologie, IDMIT,

Inserm, U1184, Immunologie des infections virales et des maladies auto-immunes Equipe 2 : Mémoire lymphocytaire T normale et pathologique

[Retour tableau](#)

### Résumé

Au cours des dernières années, la néphropathie à BK-virus (BKv) est apparue comme une complication majeure en transplantation rénale, qui reste peu explorée. Affectant près de 10% des transplantés rénaux, elle est responsable d'une perte de greffon dans plus de 50% des cas et représente actuellement la première cause infectieuse de perte de greffons rénaux. Elle correspond classiquement à une réactivation du BKv à partir de l'épithélium urinaire, favorisée par une fonctionnalité altérée des lymphocytes T spécifiques du BKv du fait de l'immunosuppression thérapeutique.

Nous avons caractérisé de manière prospective la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques du BKv chez des patients transplantés rénaux ayant différents niveaux de réactivations BKv (sans réactivation, virurie, virémie et néphropathie à BKv). Nos premiers résultats montrent une altération de la polyfonctionnalité des lymphocytes T spécifiques du BKv chez les patients avec néphropathie à BKv (sécrétions cytokiniques, prolifération et cytotoxicité). Nos données suggèrent un état d'épuisement des lymphocytes T spécifiques du BKv.

Dans ce projet, nous identifierons les lymphocytes T CD8 spécifiques du BKv par l'utilisation de pentamères restreint en HLA-A2 spécifiques du BKv. Sur cette population lymphocytaire préalablement identifiée, nous caractériserons le phénotype mémoire (cellules souches mémoires T, lymphocytes T centraux mémoires, effecteurs mémoires et effecteurs terminaux) et l'état d'épuisement lymphocytaire (expression des récepteurs inhibiteurs CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3, CD39 ainsi que celle des facteurs de transcription t-bet et EOMES). Nous modulerons ensuite in vitro cette réponse lymphocytaire T par l'administration d'anticorps neutralisants (anticorps neutralisants PD-1, TIGIT et TIM-3).

Ce travail permettra de mieux comprendre l'immunopathologie de la néphropathie à BKv en transplantation rénale, afin de proposer de nouvelles pistes diagnostiques et/ou pronostiques. L'absence de réponse lymphocytaire T spécifique du BKv pourrait être prédictive du niveau de contrôle viral et permettre ainsi de dépister les patients à risque de néphropathie à BKv.

Cette étude pourrait également aider au développement futur d'immunothérapies innovantes spécifiques du BKv pour le traitement de cette complication virale, actuellement sans thérapeutique spécifique.

[Retour tableau](#)

Année: 2020

## Innovations technologiques et greffe d'organes : enjeux réglementaires, éthiques et culturels (acronyme : ITEGOREC)

**GUCHET Xavier** - Connaissance, Organisation et Systèmes Techniques (COSTECH EA 2223)

Université de Technologie de Compiègne

Rue du Dr Schweitzer CS 60319

60203 COMPIEGNE CEDEX

[Retour tableau](#)

### Résumé

La pénurie de greffons est un problème de santé publique qui s'aggrave d'année en année. Pour y faire face, l'Agence de la biomédecine (Abm) préconise notamment, dans le Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus, d'élargir les prélèvements à des organes sous-optimaux (provenant de personnes âgés ou présentant des comorbidités). L'utilisation de ces greffons à critères élargis rend cependant nécessaire le développement de technologies, dites de perfusion, permettant d'en évaluer la qualité voire de les réhabiliter avant transplantation. L'Abm mettait aussi en avant, dans le Plan Greffe 2012-2016, la nécessité de promouvoir la recherche sur « les voies de remplacement des greffons par des organes ou des tissus reconstitués ».

Le projet pluridisciplinaire « Innovations technologiques et greffe d'organes : enjeux réglementaires, éthiques et culturels », au croisement des sciences humaines et de la philosophie, du droit, de l'ingénierie et de la clinique, propose d'examiner la filière greffe d'un point de vue rarement adopté par la littérature existante : celui des enjeux à la fois réglementaires, éthiques et culturels des dispositifs technologiques innovants qui viennent en appui ou en substitution à la greffe – machines de perfusion, organes (bio)artificiels et organoïdes.

Le don et la greffe d'organes ont fait l'objet de nombreux travaux, notamment sur les questions éthiques qu'ils posent. Toutefois, les dispositifs de perfusion et de suppléance d'organes sont de nature à faire évoluer ces questions, voire à en soulever de nouvelles qui, si elles ne sont pas clarifiées, risquent d'amener les patients au doute et à la méfiance.

Un premier objectif du projet est de mener une étude sur les cadres juridiques et réglementaires qui devront s'appliquer à ces dispositifs, en cours d'élaboration.

Une originalité du projet est de mettre l'accent sur les modes de régulation non juridiques (soft law) qui viennent en complément des normes juridiques (hard law). Un second objectif du projet est d'examiner les enjeux éthiques et culturels que soulèvent ces nouveaux dispositifs – touchant le prélèvement, les représentations du corps et de l'organe, les craintes liées à la marchandisation du corps et à l'amélioration de l'humain, l'impact de ces dispositifs sur la profession de chirurgien transplantateur.

Pour remplir ses objectifs, le projet adopte une démarche empirique (observations et entretiens) impliquant tous acteurs de la greffe – cliniciens, patients, ingénieurs, autorités de régulation. Il entend les amener à mieux maîtriser les enjeux éthiques, légaux et culturels des évolutions technologiques autour du greffon.

Les résultats du projet contribueront à renforcer l'expertise de l'Abm et des réseaux européens (European Society for Organ Transplantation, European Society for Artificial Organs, European Committee on Organ Transplantation de l'European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, Alliance for Organ Donation and Transplantation)

[Retour tableau](#)

Année: 2021

## Immunothérapie cellulaire gamma-delta anti-cytomegalovirus après transplantation d'organe : étude préclinique

COUZI Lionel - CNRS-UMR 5164 Immuno ConcEpT

Université de Bordeaux

[Retour tableau](#)

### Résumé

L'infection à Cytomégalovirus (CMV) est la plus fréquente des infections opportunistes après transplantation d'organe solide. Elle est associée à une morbidité et une mortalité significative ainsi qu'à plus de perte de greffon. La maladie à CMV survient chez 15-20% des receveurs D+R- et 5-10% des receveurs R+. Les traitements antiviraux actuels et en développement ont un effet suspensif sur la réplication virale et ne sont pas capables d'induire une réponse immunitaire spécifique du CMV, laquelle est indispensable pour contrôler le virus au long cours et éviter les récives. Il est donc nécessaire de développer des stratégies pour induire cette réponse immunitaires anti-CMV chez les transplantés d'organes. Compte tenu de leur rôle anti-CMV in vitro et in vivo, les cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg ont émergé comme un candidat prometteur de thérapie cellulaire anti-CMV.

Nous proposons ici une étude préclinique d'immunothérapie basée sur cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg pour traiter les infections à CMV réfractaires chez les receveurs de greffes d'organes solides. Grâce à une collaboration avec le laboratoire de Bruno Silva Santos (Instituto de Medicina Molecular, Lisbonne), nous sommes maintenant en mesure d'obtenir une expansion à grande échelle de cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg provenant de donneurs CMV+ et CMV-. Nous avons également montré que cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées pouvaient tuer les cellules infectées par le CMV et produire une grande quantité de IFN $\gamma$  lorsqu'elles étaient co-cultivées avec des fibroblastes, des macrophages ou des cellules endothéliales infectées.

Nos objectifs sont maintenant d'identifier :

1/ de nouvelles fonctions médiées par ces cellules amplifiées spécifiques du CMV. Pour atteindre cet objectif, nous prévoyons d'étudier de manière approfondie leur production de chimiokines et de cytokines en réponse à l'infection.

2/ les ligands reconnus spécifiquement par ces cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées. Nous allons d'abord procéder à un phénotypage extensif de ces cellules.

Nous utiliserons des anticorps monoclonaux bloquants ciblant les récepteurs identifiés lors du phénotypage extensif dans des expériences de co-culture associant des cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées et des cellules infectées par le CMV. En utilisant la technologie CRISP-Cas9, nous effectuerons également le knock-out des récepteurs potentiellement impliqués dans la reconnaissance des cellules infectées par le CMV par des cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées. Enfin, nous prévoyons également d'identifier les immunoevasines du CMV qui servent de médiateurs à l'échappement viral vis-à-vis de ces cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées, en utilisant un système d'infection avec des mutants de délétions du CMV.

En résumé, cette étude permettra d'identifier des antigènes et/ou des molécules activatrices induits par le CMV et impliqués dans l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg amplifiées. Cela permettra non seulement d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  et la reconnaissance des cellules cibles, mais aussi de fournir des cibles moléculaires pour l'immunothérapie. Grâce à cette étude préclinique, l'immunothérapie basée sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$

pourrait devenir une opportunité réaliste pour les patients D+R à haut risque d'infection ou présentant des infections réfractaires dans un avenir très proche.

[Retour tableau](#)

**Année: 2022**

## Pré-conditionnement des cellules stromales mésenchymateuses ex vivo avec alpha-tocophérol : accélération de la régénération osseuse ?

**IVANOVIC Zoran** - Département de Recherche

Etablissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine, CS21010, 33075 Bordeaux

[Retour tableau](#)

### Résumé

#### Objectifs

L'objectif de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle le traitement ex vivo des cellules stromales mésenchymateuses (CStroM) avec l'alpha-tocophérol (AT) peut améliorer leur participation à la régénération d'un défaut critique d'os. Cette hypothèse est établie sur la base des résultats que l'AT diminue la consommation de l'oxygène mitochondrial et par conséquent, maintient la primitivité des cellules souches mésenchymateuses et « pousse » la différenciation des progéniteurs engagés vers l'ostéogénèse. Ces effets sont obtenus sans activation de l'apoptose ni de la nécrose des cellules, c'est-à-dire sans effet toxique de l'AT.

#### Les résultats attendus

Nous espérons que les CStroM traitées avec l'AT montrent une meilleure capacité de régénération osseuse se traduisant par une résolution des défauts plus rapide et de meilleure qualité. Dans ce cas, nous allons tester, sur un modèle animal, la preuve de principe d'une procédure thérapeutique (accélération de la régénération osseuse) innovante. La mise au point d'un essai clinique sur grand animal représente une perspective directe de ce projet, ainsi que le développement d'un médicament de thérapie innovante (MTI) par la suite.

#### Méthodologie

La base de ce projet est le modèle de défaut critique de calvaria induit par une trépanation chez le rat. Ce modèle est utilisé et maîtrisé par le Laboratoire BioTis. La préparation des CStroM s'effectuera à partir de moelle osseuse de rat. Immédiatement après le « passage 0 », lors du premier passage ex vivo, les cellules seront traitées avec AT et combinées avec un hydrogel puis implantées dans le défaut de calvaria. Deux conditions, l'hydrogel non cellularisé et l'hydrogel cellularisé avec des CStroM non traitées avec AT, seront utilisés comme contrôles. L'analyse du processus et de l'efficacité de la régénération osseuse se fera grâce à des techniques d'imagerie et d'analyses histologiques, après le sacrifice des animaux.

[Retour tableau](#)

Année: 2022

## Immunisation par anticorps anti-HLA en transplantation d'organe : comprendre les épitopes allogéniques pour mieux les utiliser

TAUPIN Jean-Luc - INSERM U976 HIPI Equipe 3 IRSL

Et

Laboratoire d'immunologie et histocompatibilité

hôpital Saint-Louis,

1 avenue Claude Vellefaux

75475 Paris cedex 10

[Retour tableau](#)

### Résumé

Le système génétique HLA est le système de gènes le plus polymorphique chez l'homme et est la principale cible de la réponse allogénique contre le greffon en transplantation d'organe. Les anticorps anti-HLA du donneur ou DSA sont la principale cause de la perte des greffons, et parmi eux les cibles HLA-DQ sont les plus fréquemment impliquées, devant surtout HLA-A, B et DR. Un anticorps reconnaît un épitope, une zone rassemblant entre 10 et 24 acides aminés (AA) autour d'un polymorphisme reconnu comme allogénique et appelé éplet. L'attribution des greffons repose sur l'identité antigénique, un antigène HLA étant une série d'allèles structurellement proches car ne différant que par quelques AA entre eux. Environ 520 épélets ont été décrits ou déduits d'alignements in silico de séquences des allèles, mais ces épélets ne sont pas validés biologiquement pour la plupart et donc leur rôle allogénique réel est souvent peu connu. Un raisonnement en allèles ou en épélets serait donc plus en accord avec le mode de fonctionnement du lymphocyte B. Cependant, la notion d'épitope est plus complexe. Par exemple, notamment pour DQ, l'antigène est bicaténaire et les deux chaînes sont polymorphiques, créant des épélets et épitopes dépendant de la présence d'associations très particulières de ces chaînes. De plus, des indices montrent que l'affinité d'un DSA peut grandement varier entre des allèles du même antigène partageant le même éplet cible, suggérant l'implication de l'épitope dans son ensemble dans la reconnaissance. Une transplantation serait même possible dans certains cas malgré la présence de DSA contre l'éplet à des niveaux de force qui a priori entraîneraient un refus du greffon par l'équipe. Cette force traduit la combinaison de concentration et affinité du DSA, l'ensemble déterminant la capacité de l'anticorps à exercer un effet biologique, par exemple l'activation du complément (lorsque l'isotype est activateur). Nous proposons d'étudier les épélets et leurs épitopes associés, afin d'affiner nos connaissances sur l'alloréactivité humorale, pour mieux définir la compatibilité donneur/receveur et donc améliorer l'attribution des greffons et leur durée de vie. Nous poursuivrons les 3 objectifs spécifiques (OS) suivants :

OS1 : sélectionner les épélets les plus impliqués dans l'alloréactivité en greffe d'organe, à partir de l'analyse des groupes HLA étendus des receveurs et donneurs ainsi que des profils SAG Luminex du suivi post-greffe, sur l'ensemble de la cohorte du PHRC national ACORGHILA (16000 greffés)

OS2 : valider/invalider pour les épélets retenus à l'OS1, et en incluant des prototypes déjà identifiés au laboratoire (DQ alpha+beta QB2A5 et QB3A56) ou plus largement (43R/Q, Bw4, Bw6 et ses variants

incluant tout ou partie des allèles HLA-B et/ou Cw), à l'aide de cellules transfectées avec des allèles d'intérêt, n'exprimant qu'un seul HLA, dans des expériences d'adsorption/élution de sérums des patients du PHRC, suivi d'analyse des profils de réactivité en « single antigen » Luminex

OS3 : étudier par mutagenèse dirigée l'épitope localisé autour de l'éplet pour montrer l'importance de l'épitope et les limites possibles d'un raisonnement reposant uniquement sur l'éplet.

[Retour tableau](#)

