

**AOR 2006 « Recherche et greffe »
Résumés résultats publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Thème
ASHTON-CHESS Joanna	Caractérisation de nouveaux biomarqueurs sanguins du rejet chronique chez des patients ayant reçu une greffe rénale.	4
AZZARONE Bruno	Rôle de l'interleukine-15 dans les mécanismes du rejet d'allogreffe rénale.	4
BROUARD Sophie	Identification de marqueur(s)protéique(s) sérique(s) du rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale.	4
BRUNIQUEL Denis	Induction de la tolérance contre la GVH aigüe chez l'homme après une greffe de cellules souches hématopoïétiques.	4
COHEN Jacques H.M.	Dépôt érythrocytaire du fragment C4d du Complément. Mécanismes et régulation. Intérêt diagnostique du rejet humoral en transplantation.	4
CUSSENOT Olivier	Développement d'un nouveau type de vélocimètre doppler laser, basé sur l'interférométrie optique, pour le monitoring de la perfusion de greffons rénaux.	3
ELJAAFARI Assia	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.	4
FARGE-BANCEL Dominique	Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques versus Cyclophosphamide IV mensuel dans la sclérodémie systémique sévère.	4
FERRERA René	Méthodes originales de protection du greffon cardiaque après ischémie froide : la basse pression de reperfusion et le postconditionnement.	3
FLORENS Jean- Pierre	Efficacité et valeur économique des registres de donneurs de cellules souches hématopoïétiques dans un contexte international.	6
HERTIG Alexandre	Impact pronostic de la transition épithélio-mésenchymateuse du greffon rénal à long terme.	6
IVANOVIC Zoran	Préservation fonctionnelle des cellules CD34+ à 4°C en hypoxie et hypercapnie	3
JANIN Anne	Apoptose endothéliale au cours des GVH: Mécanismes de lésion et réparation vasculaire, implications physiopathologiques.	4
LE MAUFF Brigitte	Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique.	4
MARQUET Pierre	Etude épidémiologique de faisabilité d'un registre pharmaco-clinique chez les patients greffés rénaux.	6
MARQUETTE Charles-Hugo	Remplacement trachéal par greffon aortique cryopréservé	5
RONCO Pierre	Glomérulonéphrite extramembraneuse après transplantation de rein ou de cellules hématopoïétiques: Identification des antigènes cibles.	4
SOULILLOU Jean- Paul	Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des Lymphocytes B dans le sang de patients greffés rénaux présentant des signes histologiques de rejet chronique.	4
TARTE Karin	Traitement préventif de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte par des cellules souches mésenchymateuses. Etude immunologique.	4
THABUT Gabriel	Etude PILOT: Preserving in Lung Transplantation	3

TOURNAY Virginie	Etude comparée franco-américaine du contrôle qualité des produits de cellules humaines : Vers une amélioration du procédé d'obtention des PTC.	1
WEILL Bernard	Utilisation du mangafodipir pour la prévention des lésions d'ischémie-reperfusion chaude des greffons hépatiques.	2

THEMES DE RECHERCHE : ORGANES, TISSUS, CELLULES

- 1) Sciences humaines et sociales, prélèvement et greffe ;
- 2) Amélioration des prélèvements ;
- 3) Évaluation et amélioration de la sécurité et de la qualité des greffons, en particulier pour ce qui concerne les modalités de conservation ;
- 4) Immunologie des greffes ;
- 5) Pharmacologie et greffe ;
- 6) Recherche clinique, santé publique, épidémiologie, insuffisances terminales d'organes, besoins et offres de soins.

Caractérisation de nouveaux biomarqueurs sanguins du rejet chronique chez des patients ayant reçu une greffe rénale

ASHTON CHESS Joanna - Association ITERT

Résumé :

Bien que les immunosuppresseurs aient considérablement amélioré la survie des greffons et diminué le risque de rejet des greffes, ils n'ont que peu d'influence sur la cause principale de la perte de greffon à long terme : le rejet chronique (RC). L'identification de marqueurs diagnostiques dans le sang conduira à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le rejet chronique et permettra le développement de nouvelles stratégies de traitement plus efficaces. Ces marqueurs auront également un potentiel pronostique et permettront un dépistage plus précoce du RC. Cette détection précoce permettra une intervention avant l'apparition de lésions irréversibles, et par conséquent, une amélioration de la survie à long terme. Notre équipe a déjà réalisé deux études en parallèle par la technique de puce à ADN afin d'analyser le profil transcriptionnel du sang de patients transplantés rénaux présentant soit un RC soit une intolérance opérationnelle. Le but du projet présenté ici est d'identifier des marqueurs sanguins potentiellement diagnostiques ou pronostiques et de caractériser, dans le sang périphérique et le greffon, le lien entre ces molécules très spécifiques et le processus du RC. Nos objectifs spécifiques sont de corréliser l'expression de ces molécules dans le sang et la fonction rénale, d'évaluer leur capacité à prédire le RC (expression dans des biopsies et dans le sang avant et après dégradation de la fonction rénale), d'analyser *in vitro* leur fonction biologique et d'analyser *in vivo* leur fonction biologique et leur potentiel comme cible thérapeutique dans des modèles de transplantations chez le rat. A long terme, notre but est 1/ de traduire ces résultats à une application clinique, 2/ de développer un nouvel agent thérapeutique pour le traitement du RC. Ce but sera favorisé par l'association étroite entre INSERM U643 et le département de Néphrologie clinique au sein de l'Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation.

Publication :

Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, Foucher Y, Gwinner W, et al. Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection. *JASN*. 6 janv 2008;19(6):1116-27.

Rôle de l'interleukine 15 dans les mécanismes du rejet d'allogreffe rénale

AZZARONE Bruno - INSERM ADR Paris XI

Résumé :

L'IL-15 secrétée par les cellules épithéliales rénales participe au déclenchement du rejet d'allogreffe et est considérée comme une cible thérapeutique prioritaire. Cependant, son rôle semble être limité à l'expansion et la survie des lymphocytes allospécifiques CD8+/CD103+ qui infiltrent le greffon. Nous proposons donc un modèle alternatif impliquant une participation directe de l'IL-15 sous sa forme membranaire, et de la chaîne IL-15R α soluble agissant comme ligand de l'IL-15mb aux mécanismes de rejet d'allogreffe et plus particulièrement au processus de transdifférentiation épithélio-mésenchymateuse. La réalisation du projet s'articule selon les étapes suivantes : **1°** démontrer *in vivo* l'acquisition d'IL-15 membranaire, **2°** identifier *in vitro* les partenaires moléculaires responsables de l'ancrage de l'IL-15 à la membrane des cellules épithéliales, **3°** caractériser les mécanismes responsables de la sécrétion de l'IL-15R α soluble ; **4°** établir si l'IL-15 membranaire peut activer par rétro signalisation de voies de signalisation () impliquées dans processus de transition épithélio-mésenchymateuse, **5°** analyser si l'IL-15mb peut participer à l'activation de la transdifférentiation épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales rénales. La connaissance des molécules d'ancrage de l'IL-15 à la membrane permettra d'identifier des nouvelles cibles moléculaires pour inhiber son expression. L'identification de mécanismes qui activent la sécrétion de l'IL-15R α soluble aideront à contrôler ce processus et à empêcher l'activation de l'IL15mb. Enfin, l'identification des voies de signalisation activées par la signalisation rétrograde dépendante de l'IL15mb aidera à acquérir des nouvelles cibles moléculaires afin d'interférer dans les fonctions de cette cytokine.

Publications :

1. Giron-Michel J, Menard F, Negrini S, Devocelle A, Azzarone B, Besson C. EBV-associated mononucleosis does not induce long-term global deficit in T-cell responsiveness to IL-15. *Blood*. 2009;113(19):4541–4547.
2. Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y, Perier A, Giuliani M, Caignard A, et al. Human Renal Cancer Cells Express a Novel Membrane-Bound Interleukin-15 that Induces, in Response to the Soluble Interleukin-15 Receptor Chain, Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Research*. 3 févr 2009;69(4):1561-9.

Identification de marqueur(s) protéique(s) stérique(s) du rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale

BROUARD Sophie – Association ITERT

Résumé :

Actuellement, la survie d'un greffon dépend de l'administration d'immunosuppresseurs puissants, associés à des effets secondaires indésirables (néphrotoxicité, susceptibilité aux infections opportunistes, pathologies tumorales). De plus, si ces traitements au long court sont efficaces sur le rejet aigu, ils n'ont aucune incidence sur le rejet chronique à distance de la transplantation et qui reste donc aujourd'hui la cause majeure de la perte ou de la dégradation de la fonction du greffon à distance de la transplantation. L'origine du rejet chronique est multifactorielle, d'origine immunologique et non immunologique. Les facteurs et mécanismes déclenchant ce rejet chronique sont encore mal connus. Notre objectif est d'identifier des protéines présentes dans le sérum des seuls patients en rejet chronique et absent dans celui des patients tolérants ou de sujets présentant des signes d'insuffisance rénale. Ces protéines différenciellement exprimées entre les deux groupes de patients seront ensuite identifiées par séquençage et pourront servir de marqueurs prédictifs précoces de l'apparition d'un rejet chronique. L'objectif est ensuite de rechercher ces marqueurs biologiques sériques chez des patients sous immunosuppresseur et présentant une fonction stable de leur greffon afin de dépister précocement des signes de rejet chronique.

Publication :

Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, et al. Central Role of CD45RA⁺ Foxp3^{hi} Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *JASN*. 1 août 2015;26(8):1795-805.

Induction de la tolérance contre la GHV aigue chez l'homme après une greffe de cellules souches hématopoïétiques

BRUNIQUEL Denis - EFS Bretagne, Rennes

Résumé :

Une des complications majeures de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Il a été montré, dans des modèles murins, que des lymphocytes T régulateurs (LTR) interviennent dans le contrôle de la GVH. Le premier objectif de l'étude que nous proposons est de démontrer que la population de LTR définie par la co-expression des molécules CD4, CD25 et CTLA-4 est impliquée dans la protection du patient contre le développement de la GVH. D'ores et déjà, nous conduisons une analyse prospective par cytométrie du compartiment des LTR dans le greffon ainsi qu'au cours de la reconstitution hématopoïétique au cours des 30 premiers jours suivant l'allogreffe (PHRC 2003 + Subvention Agence de la biomédecine 2005). En complément nous nous proposons dans ce projet de déterminer l'origine de ces LTR, par chimérisme. Notre hypothèse est qu'en fonction de cette origine, le LTR provenant du donneur ou du receveur vont avoir des effets très différents sur l'induction de la tolérance du greffon après une greffe hématopoïétique allogénique. Aussi, nous nous attacherons à étudier la fonctionnalité de ces LTR dans les différents compartiments, le greffon d'une part et le sang périphérique post-greffe à J30 que ces LTR soient d'origine donneur ou receveur. L'état d'activation du LTR jouant probablement un rôle dans la protection contre la GVH, cette partie sera effectuée à l'aide d'un test fonctionnel mis au point dans le laboratoire. Cette étude permettra de corrélérer la présence des LTR, leurs origines et leur fonctionnalité à la protection contre la GVH. En fonction des résultats obtenus, l'utilisation de LTR du donneur ou du receveur comme outil thérapeutique pourrait être envisagée à l'avenir pour traiter la GVH.

Publications :

1. Noël G, Bruniquel D, Birebent B, DeGuibert S, Grosset J-M, Bernard M, et al. Patients suffering from acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation have functional CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cells. Clin Immunol. nov 2008;129(2):241-8.
2. Noël G, Bruniquel D, DeGuibert S, Birebent B, Grosset J-M, Bernard M, et al. Regulatory CD4+CD25hi T cells conserve their function and phenotype after granulocyte colony-stimulating factor treatment in human hematopoietic stem cell transplantation. Hum Immunol. juin 2008;69(6):329-37.

Dépôt érythrocytaire du fragment c4du complément. Mécanisme et régulation. Intérêt diagnostique du rejet humoral en transplantation

COHEN Jacques - Université de Reims

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.

Publication :

1. Haidar F, Kisserli A, Tabary T, McGregor B, Noel LH, Réveil B, et al. 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. juin 2012;12(6):1564-75.

Développement d'un nouveau type de vélocimètre doppler laser, basé sur l'interférométrie optique, pour le monitoring de la perfusion de greffons rénaux

CUSSENOT Olivier - AP-HP Hôpital Tenon

Résumé : L'objectif de ce projet est de développer un nouveau type de vélocimètre doppler laser (« Laser Doppler Flowmetry » : LDF) pour le monitoring des greffons rénaux, afin de quantifier en temps réel, la perfusion des reins lors du prélèvement et au décours des procédures de transplantation. Les avantages de ce système sur les moyens d'analyses écho-doppler actuels reposent sur l'utilisation d'une fibre optique comparable à celles utilisées dans les lasers thérapeutiques pour les traitements par voie endoscopique, alliant un très petit calibre (<0,8 mm), des matériaux biocompatibles stérilisables et à usage unique. La fibre optique peut être placée au contact de la surface du rein lors des procédures chirurgicales et laissée en place avec le système de drainage de la loge de transplantation pour un suivi continu en période post-opératoire. La LDF classique soulève cependant des difficultés, liées au fait que la mesure effectuée est très locale : cette méthode ne sonde qu'une très petite zone, de l'ordre du mm³, et ne renseigne pas sur la perfusion globale du tissu. Elle est donc sensible à toutes sortes d'hétérogénéités de surface. De plus, l'irrigation de cette petite zone explorée dépend fortement de la pression exercée par le capteur, source d'artefacts. Nous proposons de mettre en œuvre un procédé original, développé au Laboratoire de Physique des Lasers, capable d'effectuer des mesures LDF résolues dans le temps. Il sera ainsi possible, en sélectionnant la lumière correspondant à un temps de transit important dans le tissu, d'explorer le milieu beaucoup plus profondément (plusieurs cm³), s'affranchissant ainsi des inconvénients susmentionnés. Le développement technologique à réaliser et évaluer un prototype, qui devra être suffisamment compact et transportable et disposé sans difficulté au bloc opératoire ou au lit du patient. Les applications pratiques de ce système se placent aux différents temps des procédures de transplantation : évaluation de la perfusion des reins de cadavre avant le clampage aortique. Evaluation de la perfusion du rein lors des prélèvements de donneurs vivants par techniques laparoscopiques en fonction des variations de la pression intraabdominale. Evaluation continue (monitorage avec alerte) de la perfusion du greffon depuis la phase de déclampage vasculaire jusqu'au 3^{ème} ou 5^{ème} jour suivant l'intervention. Durant cette période les modifications de la perfusion du greffon, comparées, aux paramètres hémodynamiques et de reprise de la diurèse du receveur, permettent de dépister les troubles de perfusion des greffons. Evaluation indépendante des territoires de perfusion lors des transplantations de greffons avec artères multiples.

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 composite

EL JAAFARI Assia - Université Claude Bernard Lyon 1

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.

Publication :

Eljaafari A, Li Y-P, Miossec P. IFN- γ , as Secreted during an Alloresponse, Induces Differentiation of Monocytes into Tolerogenic Dendritic Cells, Resulting in FoxP3+ Regulatory T Cell Promotion. *J Immunol.* 9 janv 2009;183(5):2932-45.

Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques versus cyclophosphamide 4 mensuel dans la sclérodémie systémique sévère

FARGE-BANCEL Dominique - AP-HP Hôpital Saint-Louis

Résumé :

Afin d'analyser l'efficacité et la toxicité du traitement par autogreffe de moelle au cours de la sclérodémie systémique sévère et les mécanismes des réponses observées après traitement, nous proposons l'étude suivante :

1° Poursuivre la participation du Groupe français, initié depuis 2001 dans le cadre d'un financement résiduel du PHRC 1997 (crédit AOM 97030), à l'étude européenne multicentrique « ASTIS » : Autologous Stem Cell Transplantation International Scleroderma Trial en proposant l'inclusion de 20 malades supplémentaires recrutés et traités sur l'ensemble de la France (y compris les DOM-TOM) en 3 ans dans le cadre de l'essai européen ASTIS, étude contrôlée de phase III prospective randomisée et multicentrique européennes qui devra inclure 100 patients dans chaque bras :

- Pour comparer l'efficacité et la toxicité : * d'une intensification thérapeutique (bras étudié) à forte dose après mobilisation des cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSHP) par du cyclophosphamide intraveineux ($2g \times 2/m^2$) et du filgrastim $10\mu/kg/jour$ suivi d'une sélection positive CD34+ puis d'un conditionnement 6 semaines plus tard par cyclophosphamide i.v. (200mg/kg dose totale) et globulines antithymocytaires de lapin (7.5mg/kg) suivi de l'autogreffe des CHSP prélevées, * au traitement de référence (bas contrôle) reposant sur 12 bolus mensuels de cyclophosphamide i.v. ($750mg/m^2$)

- et dont le critère principal de jugement est la durée de survie sans évènement, définie par le temps entre le jour de la randomisation et le décès ou l'apparition d'une défaillance viscérale : cardiaque, pulmonaire, ou rénale majeure persistante, sur une période d'étude deux ans.

2° Evaluer si la réponse clinique observée chez les patients traités (autogreffe et cyclo i.v.) est corrélée à l'analyse de la reconstitution immunologique et de la réponse histologique par deux études ancillaires conduites à l'échelon français qui analyseront plus spécifiquement : 2a) les déterminants immunologiques de la réponse observée par l'étude de la reconstitution immunitaire par immunomarquage. 2b) si la réponse clinique observée est corrélée à des modifications des signaux profibrosants liés au TGF β au niveau des lésions cutanées, par étude des biopsies cutanées prélevées dans les zones cliniquement atteintes avant le début du traitement et 6 mois après la période où l'amélioration clinique devient appréciable.

Méthodes originales de protection du greffon cardiaque après ischémie froide: la basse pression de reperfusion et le post-conditionnement

FERRERA René - INSERM ADR 5

Résumé :

Problématique et objectif : Le manque crucial d'organes est responsable de la première cause de mortalité en transplantation cardiaque. Un certain nombre de greffons humains sont malheureusement perdus car lésés avant la transplantation. En effet, à partir du stade de mort cérébrale jusqu'à la reperfusion, en passant par les différentes phases de cardioplégie, prélèvement et transport hypothermique, les greffons cardiaques (mais il en est de même pour le rein, le poumon ou le foie) subissent des altérations en particulier ischémiques. La question que nous nous posons est la suivante : **Est-il possible d'agir sur la protection du cœur non pas avant l'ischémie (comme dans le cas du préconditionnement) mais après, à l'initiation de la reperfusion ?**

Notre objectif est donc d'évaluer expérimentalement et, pour la première fois après ischémie froide, la faisabilité de 2 méthodes de protections : **le post-conditionnement (POST)** et **la basse pression de reperfusion (BPR)**. Ces méthodes (validées récemment pour leur efficacité après ischémie chaude) à seront donc appliquées après cardioplégie et ischémie froide prolongée.

Etapes du projet : **Phase 1** : Etude expérimentale du POST et la BPR. Evaluations fonctionnelles et mesures de la nécrose des cœurs soumis à 8 et 12 heures d'ischémie froide. **Phase 2** : recherche des mécanismes moléculaires soutenant cette protection au niveau de la mitochondrie (analyse des radicaux libres, du pore de transition...). **Phase 3** : confirmation des résultats des phases 1 et 2, par l'étude sur cœurs entiers battant, des mécanismes de protection (méthode originale de mesure par sonde optique fluorescente des paramètres électrophysiologies et métaboliques du cœur).

Intérêt scientifique et clinique : La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de la protection à la reperfusion est fondamentale. De plus, il peut s'opérer un changement conceptuel dans la prise en charge des organes ischémiques : l'ischémie ne serait pas ou peu délétère, c'est à **la première minute de reperfusion** que tout se jouerait ! A terme l'application de ces procédures à la clinique humaine permettrait de prolonger le temps de conservation du cœur (mais peut-être aussi des autres organes) au-delà des 4-6 heures habituelles. Ces procédures de protection permettraient ainsi de sortir du cadre actuel de l'urgence tout en assurant un transport sûr de longues distances, au moins à l'échelle européenne.

Publication :

Bopassa JC, Nemlin C, Sebbag L, Rodriguez C, Ovize M, Ferrera R. Optimal Time Duration for Low-Pressure Controlled Reperfusion to Efficiently Protect Ischemic Rat Heart. Transplantation Proceedings. oct 2007;39(8):2615-6.

Efficacité et valeur économique des registres de donneurs de cellules souches hématopoïétiques dans un contexte international

FLORENS Jean-Pierre - CNRS Midi Pyrénées

Résumé :

Développer un outil d'aide à la décision basé sur un modèle mathématique permettant : i) d'examiner l'impact du choix de la précision du typage des donneurs de CSH sur l'efficacité des registres ; ii) d'insérer le registre national dans un ensemble de registres nationaux interconnectés (en incluant l'aide au développement d'un registre dans un pays afin en particulier d'accroître les chances de trouver un donneur pour des patients des minorités françaises) ; iii) d'analyser l'optimisation conjointe du registre de donneurs de QCSH et de la banque de sang placentaire, en relation avec les possibilités de compatibilité partielle.

Résultats attendus : une amélioration de l'efficacité des registres correspondant à un typage HLA précis, une optimisation du système en cas d'interconnexion efficace des registres et une utilisation alternative réaliste de la banque de sang de cordon.

Méthodologie : on utilise le calcul économie pour modéliser l'organisation de la filière du don de CSH en vue de greffes. On propose une mesure d'efficacité d'un registre de donneurs volontaires. Le modèle montre que certains éléments clé du fonctionnement d'un registre peuvent être évalués à partir d'arguments statistiques (nombre et distribution de types HLA en France), d'autres peuvent évoluer en fonction de la politique de l'Agence de la biomédecine et d'autres enfin relèvent d'une évaluation plus complexe liée au bénéfice attendu d'une greffe.

Impact pronostic de la transition épithélio-mésenchymateuse du greffon rénal à long terme

HERTIG Alexandre - INSERM ADR Paris VI

Résumé :

La néphropathie chronique d'allogreffe (NCA) est une fibrose du greffon rénal qui aboutit progressivement à sa perte de fonction. C'est aujourd'hui la première cause de retour en dialyse chez les transplantés. Parmi les mécanismes de fibrogénèse en jeu, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules épithéliales tubulaires pourrait jouer un rôle déterminant. La TEM est caractérisée par la perte des marqueurs épithéliaux (comme la E-cadhérine), et par l'acquisition de l'expression de marqueurs mésenchymateux : vimentine, protéine S100A4, et alpha actine du muscle lisse. Ainsi les cellules tubulaires en réponse à une agression immunologique ou ischémique, par exemple, peuvent contribuer à la synthèse de collagène au sein du tube rénal ou même dans l'interstitium après avoir migré hors de la structure tubulaire. Nos résultats préliminaires suggèrent que la TEM est un phénomène fréquent, et précoce en transplantation rénale : ainsi, près de 40 % des greffons montrent des signes de TEM dès le troisième mois de la greffe, sur des biopsies-protocole réalisées en dehors de toute altération de fonction rénale. **Objectif** : Nous souhaitons déterminer sur une cohorte de patients suivis dans plusieurs centres, la valeur pronostique à moyen terme de la présence au troisième mois de la greffe de marqueurs de TEM. **Méthodologie** : Pour cela, nous proposons d'exploiter les biopsies-protocoles à 3 mois de plusieurs centres de transplantation rénale en France, en quantifiant par immunohistochimie les deux marqueurs suivants : la translocation intra-cytoplasmique de la beta-caténine, et l'expression *de novo* de la vimentine. L'expression de ces marqueurs validés de TEM sera mesurée à l'aide d'un score semi-quantitatif. Ce score de TEM à trois mois sera ensuite corrélé aux marqueurs cliniques et biologiques de routine à 1 et 2 ans, et, pour les centres dont c'est la pratique, au score histologique de fibrose établi selon la classification de Banff sur les biopsies-protocole plus tardives (1 et 2 ans). **Résultats attendus et perspectives** : Nous pensons que la présence de TEM à 3 mois aura un impact sur la fonction rénale à 1 ou 2 ans, parce qu'elle présente probablement un mécanisme actif et majeur de fibrogénèse, et donc de NCA. Trois perspectives se dessinent. D'une part, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la NCA. D'autre part, si la présence de TEM à trois mois a bel et bien un impact défavorable sur la fonction rénale à terme, l'identification de facteurs de risque de TEM du greffon (rejet aigu, toxicité de certains immunosuppresseurs, etc.) aiderait à déterminer des mesures interventionnelles précoces susceptibles d'améliorer le pronostic de la transplantation rénale. Enfin, d'importants progrès ont été obtenus dans des modèles animaux de néphropathie fibrosante avec des agents capables de s'opposer spécifiquement et efficacement aux phénomènes de TEM (BMP7, HGF, KCP...), ce qui laisse envisager dans le futur un traitement curatif moderne de la fibrose rénale, qui pourrait s'appliquer au transplanté et améliorer la survie des greffons.

Publication :

Hertig A, Anglicheau D, Verine J, Pallet N, Touzot M, Ancel P-Y, et al. Early Epithelial Phenotypic Changes Predict Graft Fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology. 11 juin 2008;19(8):1584-91.

Préservation fonctionnelle des cellules CD34+ à 4°C en hypoxie et hypercapnie

IVANOVIC Zoran - EFS Aquitain limousin

Résumé :

Le projet présenté ici a pour objectif d'améliorer la conservation des cellules CD34+ à + 4°C sans congélation. L'originalité de notre approche consiste à associer les effets d'une basse concentration en oxygène (O₂ ; hypoxie) avec une concentration élevée de dioxyde de carbone (CO₂, hypercapnie), pour préserver ces cellules à basse température. Nos travaux préliminaires ayant donné des résultats positifs, nous proposons maintenant d'explorer les effets de plusieurs concentrations de CO₂ et d'O₂. Afin de trouver des valeurs optimales pour conserver les progénitures clonogéniques et les cellules souches hématopoïétiques en milieu liquide pendant une ou deux semaines, voire plus longtemps, **nos objectifs immédiats seront :**

d'explorer le maintien des cellules CD34+ et des progéniteurs hématopoïétiques à des concentrations de CO₂ de 0.25, 5 et 7 %, croisées avec des concentrations d'O₂ de 0.5, 3.5 et 20 % ; d'étudier l'effet sur la conservation d'un ajout d'IL-3 (laboratoire de Z. Ivanovic) et de VEGF (laboratoire de V. Praloran) ; de choisir les meilleures conditions et de vérifier le maintien des cellules souches hématopoïétiques par une greffe en série aux souris NOD/SCID ; de prolonger la conservation à 10 et 14 jours. Ceci est le préalable à la poursuite de ces travaux avec **deux objectifs futurs** : 1/ développement de techniques de conservations des cellules CD34+ sans congélation, potentiellement applicables à d'autres types de cellules utilisables en thérapie cellulaire. 2/ sélection d'un petit nombre de conditions permettant une étude des modifications du métabolisme cellulaire responsables de l'adaptation à l'hypothermie des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.

Résultats attendus : Nos résultats préliminaires ont confirmé notre hypothèse que l'hypoxie associée à une hypercapnie modérée préserve mieux les cellules CD34+ primitives à + 4 °C (en hypothermie). La probabilité d'amélioration de cette technique par la recherche des concentrations optimales d'O₂ et de CO₂ est forte. Ce travail devrait permettre de définir des conditions de conservation des cellules CD34+ sans congélation, au-delà d'une semaine, ce qui est impossible aujourd'hui. Si c'est le cas, les retombées pratiques de ce travail seront importantes. D'un point de vue fondamental, ces conditions de conservation permettront d'étudier les mécanismes de cette adaptation spécifique des cellules souches à l'hypothermie.

Méthodologie : les cellules CD34+ provenant de sangs placentaires, isolées par tri immuno-magnétique (technologies Miltenyi et Stem Cells Technology) seront conservées à +4°C dans un mélange gazeux hypoxique/hypercanique (16 combinaisons de concentration CO₂/O₂ seront étudiées) ; le milieu de conservation Stem Alpha S3 sera utilisée soit sans cytokine (2 équipes participantes), soit avec IL-3 (équipe de Z. Ivanovic) ou VEGF (équipe de V. Praloran) ; les progéniteurs hématopoïétiques sont mis en évidence par culture en métylcellulose préfabriquée (Stem Alpha 1D). ; Les cellules souches hématopoïétiques seront étudiées par leur capacité de greffe « en série » (2 générations de receveurs) à des souris NOD/SCID. ; Le cycle cellulaire sera étudié par cytométrie en flux (K167/IP), l'évolution de l'apoptose (AnnV/IP) et la prolifération à 7, 10 et 14 jours (PKH26/PKH2) de ces cellules seront étudiées par cytométrie en flux.

Publication :

Jeanne M, Kovacevic-Filipovic M, Szyporta M, Vlaski M, Hermitte F, Lafarge X, et al. Low-oxygen and high-carbon-dioxide atmosphere improves the conservation of hematopoietic progenitors in hypothermia. *Transfusion*. août 2009;49(8):1738-46.

Apoptose endothéliale au cours des GVH : Mécanismes de lésion et réparation vasculaire, implication physiopathologiques

JANIN Anne - AP-HP Hôpital Saint Louis

Résumé :

La maladie du greffon contre l'hôte ou GVH est la complication majeure des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, mais elle a un effet bénéfique anti tumoral, greff versus lymphoma ou GVL. Nous avons montré dans un modèle murin que les cellules endothéliales de tous les organes y compris le cœur sont une cible précoce de la GVH et qu'elles sont détruites par un mécanisme d'apoptose induit par le FasL exprimé par les lymphocytes allogéniques. Ces lésions vasculaires étaient prévenues par l'injection d'inhibiteurs des caspases, ou de basic FGF (bFGF), un facteur de croissance, élément de survie des cellules endothéliales. L'existence de lésions vasculaires chez l'homme a été confirmée dans les GVH chroniques cutanées, et par notre étude montrant des lésions vasculaires corrélées à la sévérité des GVH aiguës digestives. Ces données sont importantes car seules des cellules épithéliales (foie, peau, intestin) étaient jusque là reconnues comme cibles de la GVH. Elles ouvrent un champ d'investigation nouveau que nous voulons explorer dans notre modèle murin et valider sur des prélèvements humains. Nos objectifs sont :

1/ Déterminer la cinétique d'apparition des lésions endothéliales et endocardiaques, leur degré de sévérité, leur impact sur les cellules de voisinage (épithélium, cellules myocardiques) et préciser la nature moléculaire des mécanismes effecteurs des GVH, et leur participation respective à l'induction de lésions endothéliales. En associant immunomarquage et ultrastructure, puis microdissection laser et analyses moléculaires, nous explorerons si les lésions induites par la GVH affectent uniquement l'endothélium quel que soit l'organe et/ou le type vasculaire, et si le seuil de déclenchement de l'apoptose varie selon le territoire vasculaire. Ces études seront réalisées en transférant des lymphocytes allogéniques de souris déficientes en effecteurs des voies de cytotoxicité (CD95L ou CD95) et en traitant les souris receveuses par inhibiteurs de caspases ou bFGF. 2/ Définir l'origine (donneur/receveur) de cellules impliquées dans la réparation endothéliale et caractériser la nature des cellules chimériques. Des travaux récents sur la plasticité des cellules souches ont établi que des cellules endothéliales chimériques sont présentes après greffes de cellules souches hématopoïétiques. Pour cette étude, la détection des cellules chimériques se fera en combinant marquage X et Y par la méthode de FISH, et double immunomarquage endothélial et lymphocytaire sur un modèle de greffe de moelle en utilisant des souris de sexe différent comme donneurs et receveurs. Ce projet scientifique fédère autour de la physiopathologie des GVH trois équipes distinctes aux objectifs et compétences complémentaires. La complémentarité entre équipes inclut au premier rang les thèmes de recherches mais aussi l'expertise scientifique et l'exploitation de matériel biologique. Les techniques innovantes qui sont indispensables à la réalisation du projet font l'objet d'un partenariat industriel déjà mis en place par l'équipe d'A. Janin. Les résultats attendus de ce programme multidisciplinaire sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des lésions de GVH, de déterminer et de comparer les sensibilités endothéliales à l'apoptose induite par les greffes dans différents organes, et d'apprécier l'impact des thérapies cellulaires dans la réparation vasculaire aussi bien dans le domaine onco-hématologique que cardiologique.

Publications :

1. Janin A, Murata H, Leboeuf C, Cayuela J-M, Gluckman E, Legres L, et al. Donor-derived oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 19 févr 2009;113(8):1834-40.
2. Murata H, Ratajczak P, Meignin V, Groussard O, Fournier M, Socié G, et al. Endothelial cell chimerism associated with graft rejection after human lung transplantation. *Transplantation*. 2008;85(1):150–154.
3. Ratajczak P, Janin A, De Latour RP, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K, et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood*. 2010;116(7):1165–1171.
4. Ratajczak P, Janin A, Peffault de Larour R, Koch L, Roche B, Munn D, et al. IDO in Human Gut Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. janv 2012;18(1):150-5.

Induction de tolérance par le blocage des signaux de costimulation cd28 et cd 40 chez le primate par vectorisation génétique

LE MAUFF Brigitte - Association ITERT

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.

Publication :

Angin M, Poirier N, Dilek N, Le Guiner C, Toromanoff A, Blancher A, et al. Gene transfer of human CD40Ig does not prevent rejection in a non-human primate kidney allotransplantation model. *Transplant Immunology*. déc 2012;27(4):139-45.

Etude épidémiologique de faisabilité d'un registre pharmaco-clinique chez les patients greffés rénaux

MARQUET Pierre – CHU Limoges

Résumé :

Les déterminants pharmaco-cliniques influençant la survie des greffons et transplantés rénaux nécessitent d'être mieux connus par un suivi à long terme. **Objectif principal** : Etudier la faisabilité d'un registre des transplantés rénaux et de valider l'emploi d'un carnet de suivi avec auto-questionnaires réguliers, en termes d'efficacité pour le recueil de données pharmaco-cliniques dans la transplantation rénale. **Objectifs secondaires** : (1) Valider des propriétés psychométriques de l'échelle française de qualité de vie pour les transplantés rénaux, (2) Etudier les relations entre qualité de vie / observance / effets indésirables, (3) Etudier les relations entre exposition aux immunosuppresseurs / effets indésirables / observance, (4) Etudier les relations entre les caractéristiques génétiques et efficacité / tolérance des immunosuppresseurs.

Etude de cohorte pilote multicentrique (Bordeaux, Limoges, Toulouse), nov. 2006 – oct. 2009 (3 ans), recrutement (500 patients) : 60 patients greffés depuis 6 mois à 10 ans, et tous nouveaux transplantés.

Recueil : données cliniques, consommations médicamenteuses, effets indésirables, observance, qualité de vie, exposition aux immunosuppresseurs et caractéristiques pharmacogénétiques.

Cette étude va permettre de comparer des outils de recueil de données (carnet de suivi avec auto-questionnaires, entretien avec un pharmacologue, dossier clinique) et d'estimer l'acceptabilité de l'utilisation d'un carnet de suivi. L'échelle française de qualité de vie mise au point pourra être utilisée ultérieurement dans le cadre d'un registre ou dans des essais cliniques. Une meilleure connaissance par les cliniciens des facteurs – notamment pharmacologiques – influençant la survie du greffon seront déterminés et cela permettra de proposer dans l'avenir des stratégies thérapeutiques personnalisées. Un tel recueil de données pharmaco-épidémiologiques en transplantation rénale a pour vocation d'être poursuivi au-delà de cette période et d'être élargi à d'autres centres de transplantation.

Publications :

1. de Winter BC, Monchaud C, Prémaud A, Pison C, Kessler R, Reynaud-Gaubert M, et al. Bayesian estimation of mycophenolate mofetil in lung transplantation, using a population pharmacokinetic model developed in kidney and lung transplant recipients. *Clinical pharmacokinetics*. 2012;51(1):29–39.
2. Monchaud C, De Winter BC, Knoop C, Estenne M, Reynaud-Gaubert M, Pison C, et al. Population pharmacokinetic modelling and design of a Bayesian estimator for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in lung transplantation. *Clinical pharmacokinetics*. 2012;51(3):175–186.

Remplacement trachéal greffon aortique cryopréservé

MARQUETTE Charles-Hugo - Association RESPIR »

Résumé :

Les tumeurs étendues de la trachée et de la carène posent un énorme défi au chirurgien. Nombre de ces tumeurs ne sont pas résecables et font l'objet de traitements palliatifs. Aucune des tentatives de remplacement trachéal n'a débouché sur des applications cliniques à ce jour. Il a été récemment montré chez la brebis qu'une allogreffe aortique en position hétérotopique (en lieu et place de la trachée) conduisait à la formation d'une « néotrachée ». Le conduit respiratoire obtenu comportait après plusieurs mois un épithélium respiratoire et des anneaux cartilagineux suffisamment rigides pour permettre l'ablation de l'endoprothèse mise en place transitoirement pour s'opposer au collapsus de l'aorte transplantée. L'ensemble se produisant sans rejet, en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Nous avons reproduit chez le porc les résultats observés chez la brebis. Après avis favorable du Comité National d'Ethique, deux patients souffrant de tumeurs trachébronchiques étendues ont fait l'objet d'un remplacement trachéal au printemps 2005. Nous n'avons pas observé de rejet, de nécrose ou d'infection et sommes en droit d'espérer une évolution similaire à celle observée dans les modèles expérimentaux. Etudier si un greffon aortique cryopréservé a les mêmes capacités de vitalité, de non rejet et de transformation en une néotrachée qu'un greffon d'aorte fraîche dans un 2^{ème} temps nous envisageons d'étudier l'influence d'une radiothérapie pré ou post transplantation. **Moyens** : étude expérimentale prospective sur le porc avec allogreffons cryopréservés remplaçant un long segment de trachée intra ou extra-thoracique. **Résultats attendus** : confirmation de la viabilité des greffons cryopréservés, de leur transformation en une néotrachée, de la viabilité des greffons cryopréservés après radiothérapie post-opératoire, de la faisabilité du remplacement trachéal par allogreffe aortique après irradiation, de la transformation des greffons cryopréservés après radiothérapie pré ou post.

Phases de réalisation : 1/ préparation d'une banque de greffons cryopréservés (accomplie, presque réglé), 2/ fabrication et test in vivo de prothèses en silicones adaptées aux longs remplacements trachéaux chez le porc (accomplie), 3/ étude des greffons cryopréservés (1 an), partiellement réalisé, 4/ étude de l'influence de la radiothérapie sur les greffons cryopréservés (1an), fait l'objet de la présente demande.

Publications :

1. Makris D. Tracheal Replacement With Cryopreserved Allogenic Aorta. CHEST Journal. 1 janv 2010;137(1):60.
2. Wurtz A, Porte H, Conti M, Dusson C, Desbordes J, Copin M-C, et al. Surgical technique and results of tracheal and carinal replacement with aortic allografts for salivary gland-type carcinoma. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. août 2010;140(2):387-393.e2.

Glomérulonéphrite extramembraneuse après transplantation de rein ou de cellules hématopoïétiques: indentification des antigènes cibles

RONCO Pierre - INSERM ADR Paris VI

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 ».

Publications :

1. Debiec H, Ronco P. Fetomaternal Alloimmunization with Antenatal Glomerulopathies. Annals of the New York Academy of Sciences. 1 sept 2007;1110(1):559-66.
2. Ronco P, Debiec H. Podocyte Antigens and Glomerular Disease. Nephron Experimental Nephrology. 2007;107(2):e41-6.
3. Ronco P, Debiec H. Target antigens and nephritogenic antibodies in membranous nephropathy: of rats and men. Semin Immunopathol. 26 sept 2007;29(4):445-58.

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B dans le sang de patients greffés rénaux présentant des signes histologiques de rejet chronique

SOULILLOU Jean-Paul - Association ITERT

Résumé :

Nous avons montré que les patients rejetant une greffe de rein de façon chronique présentaient moins de LB que des patients tolérant spontanément leur greffon. Cette étude a pour objectif de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement ces LB chez les patients transplantés rénaux en rejet chronique. L'analyse de différentes sous populations de LB n'a pour l'instant jamais été réalisée dans le cadre de la transplantation mais a fait l'objet d'un grand nombre d'observations pertinentes, en particulier dans les maladies auto-immunes. Les différents stades de maturation des LB (Bm) seront caractérisés en association avec la présence de marqueurs de costimulation comme CD80, CD86 ou HLADR et aussi en association avec l'expression de marqueurs plus spécifiques aux LB définissant précisément leur état d'activation (CD21, CD5, CD27). La caractérisation des LB « régulateurs » sera effectuée grâce à l'expression de l'IL-10. Nous essaierons de dégager le profil de maturation des LB chez les patients atteints de rejet chronique en comparaison à des patients stables ou à des patients qui tolèrent spontanément leur greffe. Cette analyse phénotypique originale des LB sera accompagnée d'une analyse fonctionnelle cherchant à caractériser l'action des LB sur les autres cellules immunitaires par des expériences de culture mixte en présence de LT allogéniques issus du sang périphérique. La prolifération des cellules T sera analysée *in vitro* en présence de différentes catégories de LB (Bm et/ou B régulateurs) afin de dégager le rôle de certaines sous populations dans l'induction ou la suppression de la tolérance. Enfin, une analyse de l'effet des immunoglobulines présentes dans les sérums des patients sera effectuée. L'utilisation d'une technique particulière (Flow cytometry complement mediated cytotoxicity assay FCCA) permettra d'analyser l'effet potentiellement cytotoxique des immunoglobulines sur les différentes catégories de cellules immunitaires ainsi que sur l'activation ou la destruction des cellules endothéliales. La méthodologie sera la suivante : les études phénotypiques seront effectuées par une analyse 5 couleurs en cytofluorométrie grâce à l'utilisation d'un cytomètre LSRII (BD biosciences). En parallèle, différentes sous populations de LB (BD biosciences) et mis en culture en présence de LT allogéniques stimulés par un anti-CD3. La prolifération des LT sera mesurée au bout de trois jours. A chaque prélèvement les sérums seront récupérés afin d'entamer les études de cytotoxicité sur les PBMC du patient.

Poster :

INHIBITORY PERIPHERAL B CELL PHENOTYPE IN LONG-TERM KIDNEY GRAFT RECIPIENTS

Annaick Pallier, Sophie Hillion, Nicolas Degauque, Magali Giral, Joanna Ashton-Chess, Christophe Braud, Richard Danger, Maud racapé, Cécile Braudeau, Jean-Paul Soullilou and S. Brouard. ITERT, INSERM U643, Nantes, France



Funded by
Agence de la
Biomédecine

INTRODUCTION

We previously showed that spontaneous operational tolerance, ie graft acceptance in an immunosuppression-free environment, after kidney transplantation could occur in some patients. There is, nevertheless, no reliable parameter to monitor such patients and to determine which of them may discontinue immunosuppression without a risk of rejection. In a previous study, we analysed the phenotype of the peripheral blood mononuclear cells from these operationally tolerant patients and we showed that they were characterized by a higher number of peripheral B cells compared with those from age-matched patients with sign of chronic rejection and patients with stable graft function. Whereas this result may provide important clues for reliable indicators of tolerance after transplantation, the contribution of the B cell subset to the tolerant state remains elusive. The aim of this study was to analyze the peripheral blood B cells using the Bm1-Bm5 classification system and associated markers in patients with operational tolerance, patients under immunosuppression, patients with chronic rejection and aged matched volunteers.

PATIENTS, MATERIAL AND METHODS

Study Cohorts: i) Immunosuppressive drug-free operationally tolerant recipients (TOL); with a stable kidney graft function (blood creatinemia < 150µmol/L and proteinuria <1g/24h) in the absence of immunosuppression for at least one year. ii) Patients with stable graft function (STA) under standard immunosuppression (Mycophenolate Mofetil and a calcineurin inhibitor) with a creatinemia < 150µM/L and proteinuria <1g/24h for at least 3 years. iii) Patients with deteriorating graft function under standard immunosuppression and biopsy proven chronic rejection (CR). **Materials and Methods:** Venous blood samples were collected in EDTA vacutainers and processed for analysis within 6 hours. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA was extracted using the TRIzol® method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed using commercially available primer and probe sets from Applied Biosystems (Foster City, CA). Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the 2-DDCt method (ABI PRISM 7900 user bulletin, PE Applied Biosystems, Foster City 2:11-24, 1997). Flow cytometry was performed on a BD LSRII analyzer with DIVA software (BD Biosciences, Mountain View, CA). The non-parametric Mann-Whitney test was used for comparison between two groups and the non-parametric Kruskal Wallis test was used for comparison of more than 2 groups. Differences were defined as statistically significant when $p < 0.05$ (*).

RESULTS

We have previously reported on operational tolerance, i.e. graft acceptance in an immunosuppression-free environment occurring after kidney transplantation. We reported that these patients are characterized by a higher number of blood B cells compared to patients with stable graft function or with chronic rejection. We also found a significant B cells footprint within the PBMC using microarray, and functional analysis identified key B cell molecules in these patients. Patients with operational tolerance had significantly more B cells than patients with stable graft function and patients with chronic rejection. Moreover, we observed a significant increase in activated, memory and early memory B cells (Bm2, EBm5, Bm5) affecting both the frequency and the absolute cell number in patients with operational tolerance (Fig. 1). The costimulatory-migratory molecules B7-1/CD86, B7-2/CD80, CD62L were up-regulated on B cells, and particularly on memory B cell populations of operationally tolerant patients. Interestingly, we found a profound decrease in the CD32a/CD32b ratio (Fig. 2a) and an increase in the molecule BANK (Fig. 3b), a negative modulator of CD40-mediated AkT activation, associated with an over-expression of BAFF-R, the specific receptor of BAFF in operational tolerance (Fig. 3).

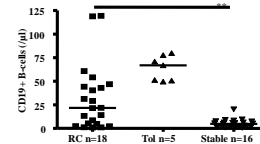


Fig. 1: significant increase in activated, memory and early memory B cells (Bm2, EBm5, Bm5) affecting both the frequency and the absolute cell number in patients with operational tolerance

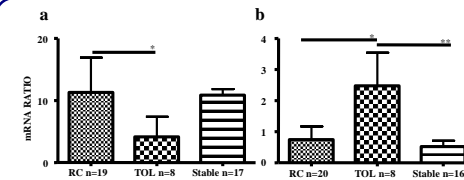


Fig. 2: decrease in the CD32a/CD32b ratio (a) and increase in the molecule BANK (b) in operationally tolerant patients

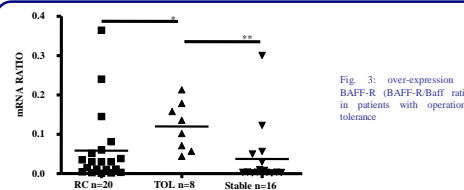


Fig. 3: over-expression of BAFF-R (BAFF-R/BAFF ratio) in patients with operational tolerance

CONCLUSION

These results suggest that patients with operational tolerance are characterized by a B cell profile suggestive of regulatory properties: 1) an over-expression of the Fc-g Receptor IIB-CD32b, an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif transducing an inhibitory signal upon interaction with the B cell receptor, 2) a significant upregulation of BAFF-R that could enhance the survival of these B-cells, and may explain why these patients have an increase in B-cells compared to other patients and 3) An increase in BANK, a negative modulator of CD40-mediated AkT activation, thereby preventing hyperactive B cell responses in the blood of operationally tolerant patients. Given that the contribution of B cells to the state of tolerance remains elusive, this study may provide important clues or reliable indicators of tolerance after transplantation.

Traitement préventif de la réaction aigue du greffon contre l'hôte par des cellules souches mésenchymateuses. Etude immunologique

TARTE Karin – EFS Bretagne

Résumé :

Le projet MESENCHYMMUNO a pour objectif d'assurer un suivi immunologique optimal du protocole clinique multicentrique randomisé intitulé *Traitement préventif de la réaction aigue du greffon contre l'hôte post allogreffe de cellules souches hématopoïétiques par des cellules souches mésenchymateuses*, qui inclura 74 patients sur

19 centres greffeurs français. Cet essai, placé sous l'égide de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) sera le premier utilisant à large échelle dans une étude en double aveugle les propriétés immunorégulatrices des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour prévenir la GVH, dans un contexte d'allogreffe à conditionnement myéloablatif. Les trois questions posées ici sont i) la persistance des CSM du donneur *in vivo*, qui sera évalué par quantification du chimérisme mésenchymateux par PCR sur cultures de CSM médullaires à J90 et J360 post-greffe ; ii) l'effet immunologique des CSM injectées et des CSM persistant *in vivo*, que nous étudierons par des expériences de co-cultures des CSM avec des lymphocytes T activés et par le dosage de l'activité d'IDO, une enzyme importante pour l'effet immunorégulateur des CSM ; iii) et l'impact des CSM sur la qualité de la reconstitution immunologique post-greffe par un phénotype des sous-populations T, B, dendritiques, NK et monocyttaire, une évaluation de la part relative de l'expansion périphérique et du thymus dans la reconstitution T (quantification des TREC) et une évaluation de la fonctionnalité lymphocytaire (étude de la prolifération T, dosage d'anticorps spécifiques). Les plateformes de Rennes, Grenoble et Besançon, impliquées dans l'immunologie des greffes, la compréhension de la biologie des CSM et l'étude du chimérisme se sont associées pour mener à bien ce travail et harmoniser mes différentes évaluations de façon fiable et coordonnée. Au final, le projet devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des CSM, d'évaluer les conséquences de leur injection au plan immunologique, d'analyser les paramètres influençant la réponse clinique au traitement et donc d'améliorer les conditions d'utilisation des CSM pour de futurs programmes thérapeutiques.

Publication :

1. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549–1553.

Etude PILOT: preservation in lung transplantation

THABUT Gabriel - AP-HP Hôpital Bichat

Résumé :

La principale complication dans les suites immédiates de la transplantation pulmonaire est la survenue d'une dysfonction primaire du greffon, grevée d'une morbidité et d'une mortalité importantes. Le développement de nouveaux liquides de préservation devrait permettre une diminution de l'incidence de cette complication et une amélioration des résultats de la transplantation pulmonaire, en dépit d'arguments expérimentaux encourageants, le Perfadex® utilisé de plus en plus largement en transplantation pulmonaire n'a pas fait l'objet d'une évaluation rigoureuse. L'objectif principal de l'essai est d'évaluer si l'utilisation du Perfadex® permet de diminuer l'incidence de la dysfonction primaire du greffon chez les patients bénéficiant d'une transplantation pulmonaire, comparé au liquide de Celsior® actuellement utilisé. Il s'agit d'une étude prospective, multi-centrique, randomisée en double aveugle. Les critères d'inclusion sont les suivants : patient adulte, bénéficiant d'une transplantation mono ou bipulmonaire. Le traitement à l'étude est le Perfadex®, le traitement de référence est le Celsior®. La période d'inclusion est de deux ans, les patients seront suivis pendant 1 an. Durée totale de l'étude : 3 ans. Critère principal : survenue d'une dysfonction primaire du greffon dans les 3 premiers jours suivant la transplantation pulmonaire. Nombre de sujets : 55 patients dans chaque groupe soit 110 patients en tout. Analyse statistique : les pourcentages de survenue de dysfonction primaire du greffon seront comparés par le test chi-2. Résultats attendus : une réduction de 50 % en valeur réactive de l'incidence des dysfonctions primaires du greffon est attendue dans le groupe recevant le Perfadex® comparé à celui recevant du Celsior®.

Etude comparée franco-américaine du contrôle qualité des produits de cellules humaines : Amélioration du procédé d'obtention des PTC

TOURNAY Virginie - Association IREDAP

Résumé :

Le projet consiste à inventorier les différentes voies administratives innovantes qui permettent le passage de multiples usages informels utilisant des cellules humaines (entendus comme un ensemble de pratiques disparates confinés dans les laboratoires de recherche et hospitalier) à la constitution d'une pratique médicale unifiée que les experts et les acteurs administratifs désignent aujourd'hui par le terme générique de « thérapie cellulaire ». Plus particulièrement, nous porterons une attention soutenue aux formes de régulation liées aux contrôles de la qualité des produits de thérapie cellulaire. Développé (et en voie de standardisation) au sein de l'Afssaps, cet acte a pour effet de baliser, puis de normaliser le procédé même d'obtention des produits de thérapie cellulaire. Loin de se constituer indépendamment, la normalisation de ce procédé technique et l'élaboration des standards réglementaires qui s'y appliquent constituent, tout au moins en France, deux dimensions en étroite co-construction. L'étude envisagée dans le cadre de ce projet s'appuie sur une analyse comparée du fonctionnement de deux organismes d'Etat : l'un français (Afssaps) et l'autre américain (FDA) – chargés de réguler ces pratiques de santé. Un constat étonnant : pour chacun des terrains d'étude considérés, la constitution des usages médicaux de cellules humaines en objet médical régulé administrativement, fait intervenir différentes échelles de participation ainsi que des formes de contrôles bien distinctes. En suivant la genèse des guides de bonnes pratiques et les acteurs impliqués, il s'agit de prendre en compte les disparités contextuelles relatives aux entreprises de standardisation et de qualifier les effets tangibles qui découlent des efforts de normalisation institutionnels liés à l'activité de contrôle. Afin de mener à bien ce comparatif, l'opportunité d'un contrat post-doctoral à l'université McGill de Montréal facilitera la mise en évidence de la diversité des pratiques de l'administration américaine. Cette étude pourrait aider à mettre en place un contrôle qualité normalisé concernant les cellules embryonnaires à l'Agence de la biomédecine.

Publication :

Tournay V, Ott M-O, Bemme D, Routelous C. La United Kingdom Stem Cell Bank: Un petit espace stérile pour l'homme, un gigantesque espace multilatéral pour l'humanité. *Sociologie et sociétés*. 2010;42(2):291–312.

Utilisation du mangafodipir pour la prévention des lésions d'ischémie reperfusion chaude des greffons hépatiques

WEILL Bernard - Université René Descartes Paris 5

Résumé :

Objectifs : Les différents types de clampage vasculaire réalisés au cours de la chirurgie hépatique peuvent entraîner des lésions d'ischémie-reperfusion du parenchyme hépatique parfois sévères et susceptibles de mettre en jeu ultérieurement les fonctions de l'organe. Le clampage intermittent ou le préconditionnement peuvent être utilisés pour minimiser les lésions. Cependant, les dommages étant liés en grande partie à la production de formes réactives de l'oxygène (FRO), en particulier à l'anion superoxyde dont le taux dépasse les capacités de détoxification de la superoxyde dismutase (SOD), nous avons émis l'hypothèse qu'un agent anti-oxydant pourrait inhiber l'apparition des lésions. Nous testerons le mangafodipir, un mimétique chimique de la SOD dont nous avons déjà montré l'action protectrice vis-à-vis des hépatocytes au cours du stress oxydatif d'origine toxique ou viral. **Résultats attendus** : En cas d'efficacité du mangafodipir, la molécule pourrait être essayée en clinique pour améliorer la préservation des greffons hépatiques car il s'agit d'un produit de contraste utilisé pour les IRM hépatiques depuis plus de dix ans et dont la bonne tolérance est connue. **Méthodologie** : Le mangafodipir sera testé dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (IR) chaude, en comparaison avec le clampage intermittent et le préconditionnement. Les lésions d'IR seront évaluées histologiquement et fonctionnellement grâce au dosage des enzymes hépatiques et de la bilirubine. La production de FRO et les activités enzymatiques anti-oxydantes au sein du tissu hépatique, la fuite de cytochrome c mitochondrial ainsi que l'activité pro-apoptotique de la caspase-3 seront aussi évalués pour vérifier le mode d'action du mangafodipir.