

**AOR 2007 « Recherche et greffe »
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Projet	Thème
AMEDEE Joelle	Ingénierie du tissu osseux: utilisation de progénitures endothéliales et ostéogéniques d'origine mésenchymateuse pour la reconstruction d'un os vascularisé	6
BAUD Laurent	Identification des calpaïnes comme marqueurs biologiques et cibles thérapeutiques dans la néphropathie chronique du transplant	4
BEN SOUSSAN Patrick	Etude psychodynamique chez les donneurs apparentés de l'influence de l'âge des receveurs atteints d'hémopathies malignes : représentations et impacts psychologiques du don et de la greffe allogénique	1
BORG Christophe	Etude de l'implication de CX3CR1 dans l'initiation des réactions du greffon contre l'hôte: Développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou sur la sélection des greffons pour favoriser la tolérance des allogreffes	3
BROUARD Sophie	SMILE, un nouveau biomarqueurs du devenir du greffon	3
CHARREAU Béatrice	Développement d'un cross match endothélial post-greffe, spécifique du couple donneur-receveur, chez des patients transplantés rénaux	3
CORPECHOT Christophe	Etude génotypique et pronostique des patients transplantés pour cirrhose biliaire et cholangite sclérosante primitives (TRANSCOLL)	5
EMILIE Dominique	Cellules dendritiques tolérigènes en transplantation: un nouveau modèle de souris transgéniques pour la compréhension de la tolérance au greffon.	3
FERRERA René	Mise au point d'un système original de préservation par perfusion pulsatile hydrothermique des greffons avant transplantation	2
HUBERT Thomas	Etude prospective de la corrélation entre la réponse insulinique aigue et l'isolement des îlots de Langherans chez le donneur en mort encéphalique	2
LEGEMBRE Patrick	Etude du signal de mort déclenché par l'Acide Mycophénolique - vers un dosage du MME	4
LEMARCHAND Patricia	Thérapie cellulaire cardiaque par injection intra-myocardique de cellules souches mésenchymateuses : études pré-cliniques	2
MEDDAHI- PELLE Anne	Dispositif pour le transport et la conservation de vaisseaux	2
ROBINET Eric	Amélioration de la reconstitution immunitaire post allogreffe hématopoïétique sans induction de Gvh par injection de cellules T cultivées	3
TOUBERT Antoine	Thymus et fonctions régulatrices de cellules hématopoïétiques chez l'homme	3
VAN MEERJWIJK Joost	Induction de la tolérance aux allogreffes avec des lymphocytes T régulateurs	3
VANDEWALLE Alain	Dysrégulation phagocytaire en réponse à l'activation des récepteurs Toll-like et des protéines Nod chez les patients transplantés rénaux	3

VINCENTELLI André	Création d'une prothèse valvulaire cardiaque autologue par ingénierie tissulaire	6
------------------------------	--	---

THEMES DE RECHERCHE : ORGANES, TISSUS, CELLULES

- 1) Etudes en sciences humaines, économiques et sociales, ainsi qu'en santé publique portant notamment sur les réflexions éthiques que font surgir les enjeux nouveaux des activités de prélèvement et de greffe;**
- 2) Amélioration des prélèvements, évaluation et amélioration de la sécurité et de la qualité des greffons, modalités de conservation ;**
- 3) Immunologie, en priorité ce qui concerne la reconstitution immunitaire et la tolérance ;**
- 4) Pharmacologie et greffe;**
- 5) Santé publique, épidémiologie, insuffisance terminale d'organes, besoin et offre de soins ;**
- 6) Ingénierie cellulaire et tissulaire comme alternative à l'allogreffe**

Ingénierie du tissu osseux: utilisation de progéniteurs endothéliaux et ostéogéniques d'origine mésenchymateuse pour la reconstruction d'un os vascularisé

AMEDEE Joëlle - INSERM U577 ADR Bordeaux "Biomatériaux et réparation tissulaire", Université Bordeaux 2

Résumé :

L'objectif de ce projet est de mettre en place une méthode de reconstruction osseuse en privilégiant à la fois la formation osseuse et la revascularisation du tissu néoformé. Les acteurs cellulaires de cette reconstruction seront des cellules mésenchymateuses d'origine humaine, orientées vers le lignage endothélial et ostéoblastique et qui seront co-cultivées dans des microsphères d'alginate élaborées par extrusion ou par laser.

Le pouvoir ostéoinducteur de ces unités hybrides sera évalué chez la souris nude en site non osseux et leur capacité de reconstruction osseuse sera mesurée après implantation en site osseux dans un modèle de microlésions réalisées au niveau de l'épiphyse fémorale. Les techniques d'investigations de la néoformation osseuse seront d'une part des techniques invasives par histologie standard (histomorphométrie) et des techniques non invasives (tomographie aux rayons X à haute résolution, imagerie par résonance magnétique). La vascularisation sera évaluée par des techniques d'immunomarquage spécifique du lignage endothélial et par tomographie aux rayons X après injection d'un agent de contraste.

Ce programme de recherche permettra de valider une nouvelle technique d'encapsulation cellulaire par traitement laser et de proposer une nouvelle stratégie de thérapie cellulaire associée à la science des biomatériaux pour améliorer leur biointégration et leur vascularisation.

Publication :

Grellier M, Granja PL, Fricain J-C, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials*. juill 2009;30(19):3271-8.

Identification des calpaïnes comme marqueurs biologiques et cibles thérapeutiques dans la néphropathie chronique du transplant

BAUD Laurent - INSERM U 702, Hôpital Tenon

Résumé :

La néphropathie chronique du transplant (*chronic allograft nephropathy* ou CAN) est une cause majeure de perte du transplant rénal. Cette atteinte rénale est caractérisée par une fibrose, qui résulte principalement de l'ischémie puis de la reperfusion du transplant, de la toxicité des immunosuppresseurs et d'épisodes de rejet incorrectement traités. Différentes stratégies ont été développées pour mettre en évidence et limiter l'impact de la néphropathie chronique du transplant, mais jusqu'à ce jour sans réelle efficacité. Dans le projet qui est soumis, nous proposons de considérer les calpaïnes comme une nouvelle cible dans ces stratégies diagnostiques et thérapeutiques. En effet, ces protéases à cystéine intracellulaires, activées par le calcium et inhibées par la calpastatine, sont impliquées dans la nécrose de l'épithélium tubulaire au cours de l'insuffisance rénale aiguë ischémique et potentiellement dans les mécanismes moléculaires de rejet et de fibrose. Pour tester notre hypothèse, nous bénéficierons de la disponibilité d'échantillons d'urine et de biopsies rénales collectés dans une cohorte de patients transplantés rénaux ainsi que d'un modèle original de souris transgéniques qui sur-expriment la calpastatine et qui expriment donc une activité calpaïne limitée. En utilisant ces outils, nous voulons déterminer (1) si l'activité calpaïne est un marqueur fiable de la néphropathie chronique du transplant et (2) si l'inhibition de l'activité calpaïne limite les lésions d'ischémie et reperfusion, de rejet cellulaire avec mise en jeu de la calcineurine et de fibrose favorisée par la transformation épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales tubulaires, prévenant ainsi le développement de la néphropathie chronique du transplant.

Publication :

Letavernier E, Dansou B, Lochner M, Perez J, Bellocq A, Lindenmeyer MT, et al. Critical role of the calpain/calpastatin balance in acute allograft rejection. *European Journal of Immunology*. févr 2011;41(2):473-84.

Brevet :

PELLE MA, ABED A, Letourneur D, BAUDOT A. Cryoconservation de cellules, tissus et organes [Internet]. WO2013107797 A1, 2013 [cité 16 févr 2017]. Disponible sur: <http://www.google.fr/patents/WO2013107797A1>

Etude psychodynamique chez les donneurs apparentés de l'influence de l'âge des receveurs atteints d'hémopathies malignes : représentations et impacts psychologiques du don et de la greffe allogénique

BEN SOUSSAN Patrick - Unité de Psycho-Oncologie, Institut Paoli Calmettes, Marseille

Résumé :

En matière de greffes allogéniques, les avancées relatives aux conditionnements myéloablatifs à toxicité réduite, beaucoup moins iatrogènes, ont permis à des patients âgés de 70 ans et plus de bénéficier de telles thérapeutiques. On peut donc augurer d'une augmentation notable, dans les années à venir de ce type de greffes qu'elles soient géno, phénoïdiques ou de sang de cordon. Dans le cas présent ce sont les donneurs familiaux compatibles qui feront l'objet de notre étude. En effet, cette recherche-action longitudinale, prévue sur 2 ans, monocentrique veut aboutir à promouvoir une procédure spécifique et adaptée de prise en charge des donneurs. On s'intéressera plus particulièrement dans leurs aspects qualitatifs et psychodynamiques :

- à la dynamique en jeu dans la fratrie
- aux représentations et impacts du don
- aux significations et expérience subjective avant et après le don Et dans leurs aspects quantitatifs :

- à la qualité de vie et l'anxiété des donneurs, liées au don et à l'évolution du receveur post-greffe

La durée de cette recherche, s'étalant sur 2 ans, nous permettra, au travers d'un suivi au long cours des donneurs apparentés, d'aborder la question de la temporalité, qui est au cœur de la problématique des parcours thérapeutiques des patients en cancérologie. Pour les donneurs cette temporalité de l'étude nous permettra de repérer les évolutions quant au vécu et représentations des sujets

Nos hypothèses sont :

- 1) L'âge du receveur aura un impact significatif sur les représentations liées au don, à la greffe et ses suites chez les donneurs.
- 2) L'anxiété liée au don et à l'évolution de la greffe chez le sujet malade sera d'autant plus marquée dans le groupe de donneurs pour les sujets âgés.

Résultats attendus :

- 1) Meilleure connaissance des processus qualitatifs et psychodynamiques des enjeux dans les fratries. Cette amélioration dans la compréhension de ces processus aidera les médecins dans la prise en charge des donneurs apparentés, mais également et par répercussion des receveurs.
- 2) Meilleure prise en charge psychologique au long cours des donneurs par la formalisation d'un protocole spécifique et adapté

Etude de l'implication de CX3CR1 dans l'initiation des réactions du greffon contre l'hôte: Développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou sur la sélection des greffons pour favoriser la tolérance des allogreffes

BORG Christophe - EFS Bourgogne/Franche Comté

Résumé :

Le contrôle des interactions entre les cellules immunitaires initiant les réponses allogéniques est un enjeu majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques favorisant la tolérance des procédures de transplantation. Nous avons identifié la voie CX3CL1/CX3CR1 comme un élément important dans la genèse des réponses alloréactives et proposons un programme de recherche intégré ayant pour objectif (i) la description des mécanismes impliquant cette voie dans les réponses allogéniques, (ii) le développement d'outils thérapeutiques basés sur ces travaux. Plusieurs souspopulations de lymphocytes T CD4, CD8 et NK expriment le récepteur de la fractalkine CX3CR1. La fractalkine CX3CL1 est une chémokine particulière dont l'expression peut être membranaire et dont le spectre des activités biologiques est large. CX3CL1 est impliquée dans des processus de chimiotactisme, d'adhérence, d'orientation des réponses immunitaires vers un profil TH1. De plus, CX3CL1 est produite par des cellules impliquées de manière majeure dans l'initiation des réponses inflammatoires et immunitaires, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales activées. Ainsi, de récents travaux confirment l'influence de CX3CL1 dans le développement de maladies inflammatoires et dans l'athérosclérose. Nous souhaitons définir le rôle de CX3CL1/CX3CR1 dans l'initiation des GvH aiguës. Ainsi, nous étudierons si des lymphocytes allogéniques déficient en CX3CR1 peuvent induire une réaction du greffon contre l'hôte aigue, dans des modèles murins d'allogreffe de cellules hématopoïétiques. Nous déterminerons quels sont les mécanismes initiateurs de la GvH qui dépendent de CX3CR1 (maturation des cellules dendritiques, prolifération des lymphocytes T CD4 et augmentation des fonctions auxiliaires TH1 ou augmentation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8). Dans un second temps, nous analyserons les polymorphismes de CX3CR1 dans une cohorte de donneurs de cellules hématopoïétiques utilisées pour des allogreffes. Nous déterminerons s'il existe une liaison entre les polymorphismes défavorables à l'association CX3CL1/CX3CR1 et l'incidence des GvH après allogreffe de cellules hématopoïétiques. Ces données seront reproduites dans un autre modèle ou cette analyse génétique pourrait avoir un intérêt thérapeutique : la transplantation rénale. Nous envisagerons le développement de plusieurs approches thérapeutiques en s'appuyant sur les compétences de notre centre d'investigation clinique en biothérapie et des réseaux nationaux, particulièrement :

- Un protocole de sélection des greffons allogéniques basé sur l'analyse des polymorphismes de CX3CR1 (service d'hématologie du CHU de Besançon, SFGM).
- Un protocole en transplantation rénale modulant l'intensité de l'immunosuppression en fonction des polymorphismes de CX3CR1, portés par le receveur.
- Nous produirons également des anticorps monoclonaux contre CX3CL1 et CX3CR1 dont nous évaluerons la bioactivité et l'intérêt thérapeutique en collaboration avec la société Diaclone.

SMILE, un nouveau biomarqueur du devenir du greffon

BROUARD Sophie - INSERM U 643, CHU Nantes

Résumé :

Depuis 4 ans, nous avons constitué un matériel biologique unique en Europe (PBMC, urines, biopsies), stocké à DIVAT Biocollection INSERM (#02G0555), comportant des malades spontanément « opérationnellement tolérants ». Il s'agit de sujets très rares (15 cas identifiés dans la Communauté Européenne) qui, principalement pour des raisons de non complianc, ont totalement interrompu leurs immunosuppresseurs et dont la fonction du greffon reste normale et inchangée depuis 6 ± 3 années (Roussey-Kesler, Giral et al. 2006) (Ashton-Chess, Brouard et al. 2006). Ces sujets ne présentent pas de déficit immunitaire particulier (pas d'augmentation de maladies opportunistes). Le matériel de cette cohorte unique cote celui de sujets sains, de greffés stables sous immunosuppression ou présentant un rejet chronique histologiquement défini (Banff). Différents travaux conduits sur cette population ont porté sur le répertoire lymphocytaire T, le phénotype des lymphocytes T CD4, CD8, des lymphocytes B et le profil transcriptionnel des cellules mononuclées sanguines. Cette dernière étude, conduite en collaboration avec l'Université de Stanford, a utilisé des puces à cDNA comportant 12 400 gènes (S. Brouard et al., soumis). Elle a permis d'identifier 2083 gènes différentiellement exprimés dont une collection de 49 gènes statistiquement associés à l'état de tolérance opérationnelle et au rejet chronique (*Provisional Patent Application Serial No. 60/571,471 filed May 14, 2004 and Provisional Patent Application Serial No. 60/538,439 filed on January 21, 2004*). L'ensemble des 49 gènes ont été testés par RT-PCR quantitative sur des patients indépendants et 8 gènes les plus significativement différentiellement exprimés entre les deux cohortes de patients, opérationnellement tolérants et patients en rejet chronique, ont été retenus.

Notre objectif est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans les processus de tolérance et de rejet chronique. Sur ces bases, nous avons retenu un gène dont la fonction est, à ce jour, inconnue. SMILE (TMTC3) est un tétratricopeptide transmembranaire surexprimé de façon significative dans le sang des patients tolérants leur greffon rénal par rapport aux patients en rejet chronique. Le but de cette étude est de définir la relation entre l'expression de la protéine SMILE et l'état clinique des patients greffés rénaux, afin de valider SMILE en tant que bio-marqueur sanguin du risque immunologique de rejet en transplantation (faible risque : tolérance, haut risque : rejet chronique).

Les points suivants seront développés dans notre projet : 1) Identification des cellules responsables de la sur-expression de SMILE chez les patients transplantés rénaux tolérant leur greffon rénal, 2) Etude de la fonction et de la régulation du gène SMILE dans la tolérance. Le fait que SMILE soit surexprimé dans le sang des patients tolérant leur greffon suggère que ce gène puisse être impliqué dans des phénomènes de régulation. Cette hypothèse sera étudiée in vitro chez l'homme et in vivo dans un modèle d'induction de tolérance chez le rat ; Interaction de SMILE avec d'autres protéines in vitro, down-régulation de SMILE et fonction cellulaire in vitro (siRNA), sur-régulation de SMILE et fonction in vivo (AAV8) dans un modèle de greffe allogénique chez l'animal, 3) Phénotype des animaux déficients pour la molécule SMILE (Souris SMILE-KO) et des rats transgéniques surexprimant SMILE.

Publication :

Racapé M, Duong Van Huyen J-P, Danger R, Giral M, Bleicher F, Foucher Y, et al. The Involvement of SMILE/TMTC3 in Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Câmara NOS*, éditeur. PLoS ONE. 16 mai 2011;6(5):e19321.

SMILE, A NEW MOLECULE INVOLVED IN OPERATIONAL TOLERANCE IN TRANSPLANTATION?

Maud Racapé¹, Jean-Paul Duong Van Huyen², Richard Danger¹, Magali Giral¹, Françoise Bleicher³, Annaïck Pallier¹, Joanna Ashton-Chess¹, Emilie Dugast¹, Ségolène Pettré¹, Béatrice Charreau¹, Jean-Paul Soulliou¹ and Sophie Brouard¹

¹INSERM U643-ITERT, Nantes, France, ²INSERM UMRS 765, Paris, France, ³Faculté d'Odontologie, Lyon, France .
maud.racape@univ-nantes.fr Publication Number: P-780

Background: Chronic injury is poorly influenced by immunosuppression treatments in kidney transplantation. Thus there is a concerted effort in the transplant community to find procedures to induce or to detect immune tolerance in patients under chronic immunosuppression in the hope to obviate the need for life-long exposure to these drugs.

Aim: Our team has studied several biomarkers in order to define set of genes differentially expressed in operationally tolerant patients compared with other group of patients. We have identified by microarrays a molecular signature associated with operational tolerance state in drug-free patients with stable graft function. Among the molecules composing this signature, SMILE is overexpressed in the blood of operationally tolerant patients compared to patients undergoing a chronic antibody mediated rejection. Function of this molecule is yet to be determined. The structure of SMILE suggests that this molecule is involved in protein-protein interactions since SMILE exhibits tetratricopeptide repeats. In this study, we investigate the expression of SMILE by different group of transplant patients and its function in cell biology.

Materials and Methods, Results:

We first studied SMILE mRNA expression, by qRT-PCR, in PBMCs of operationally tolerant patients (TOL), healthy volunteers (HV), stable patients (STA) and patients undergoing chronic antibody mediated rejection (AMR). We thus confirmed the microarray data, showing that SMILE is increased in the blood of operationally tolerant patients (Figure 1). Because biopsies of operationally tolerant patients are not available, we looked at SMILE transcripts in normal kidney biopsies of non transplant (HV) or transplant patients (STA) displaying a normal histology and in pathological biopsies from patients undergoing chronic AMR (AMR). We showed that SMILE transcripts are down-regulated in biopsies from patients with chronic AMR (Figure 2).

As the function of SMILE is still unknown, we aim to identify potential partners using the yeast double hybrid technique. Several interesting ligands were identified, and among them a protein disulfide isomerase family A member 3. The PDIA3 protein is involved in the loading peptide complex on MHC class I and in the folding of glycoproteins by disulfide bond formations in the endoplasmic reticulum. PDIA3 was shown to be overexpressed by the endoplasmic reticulum undergoing stress environment. We analyzed the response to endoplasmic reticulum stress of HeLa cells in which SMILE expression was knock-down by siRNA. Bortezomib was used to induce an endoplasmic reticulum stress by blocking the proteasome and inducing accumulation of unfolded proteins in endoplasmic reticulum. HeLa cells in which SMILE expression was previously knock-down or not were cultured with Bortezomib for 24 hours and cell survival was analyzed 7 days later (Figure 3). Cell survival was impaired when SMILE expression was knock-down.

RESULTS

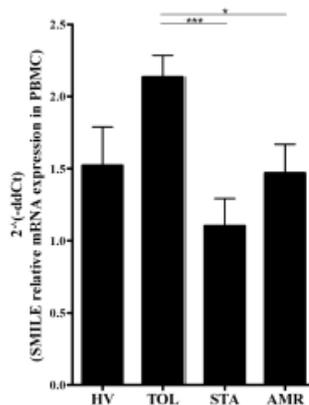


Figure 1. SMILE mRNAs are overexpressed in PBMCs from operationally tolerant patients. Expression of SMILE mRNAs was studied by qRT-PCR in PBMCs from different individuals: healthy volunteers (HV), operationally tolerant patients (TOL), stable patients (STA) and patients undergoing chronic AMR (AMR). (* p=0,037; *** p=0,001; Mann-Whitney tests)

Figure 2. SMILE mRNAs are down-regulated in renal biopsies from AMR patients. Expression of SMILE mRNAs was analyzed in renal biopsies from non transplant patients (HV with normal renal biopsies), from renal transplant patients (STA, with normal renal biopsies) and from chronic rejection patients (AMR). (* p=0,0125; Mann-Whitney test)

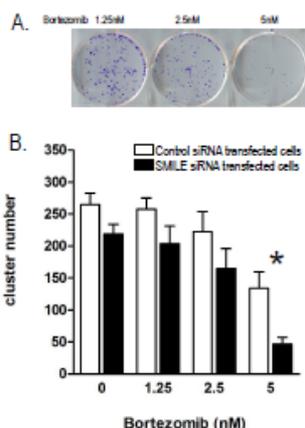
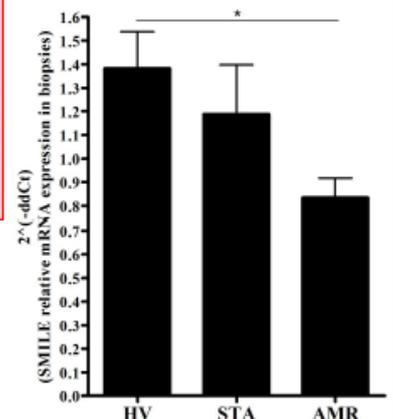


Figure 3. SMILE is involved in the endoplasmic reticulum stress response.

A. Principle of the clonogenic assay. Cells were transfected with siRNA, and plated at 500 cells per well in a 6 well-plate. Then these 500 cells were treated with Bortezomib during 24h, the drug was removed and the cells were cultured for seven days. Finally, clusters were colored and the growth of the clones was evaluated by a count of the cluster number.

B. When cells are not treated (0), the number of clusters is decreasing when cells are transfected with the SMILE siRNA compared with the cells transfected with the control siRNA. We observed a synergistic effect of the Bortezomib treatment and of the lack of SMILE on the decrease cluster number. These results suggests a decrease survival potential of the cells in a long-term culture when SMILE is lacking. (* p<0,05; t test)

CONCLUSION :

Taking together, our results suggest that SMILE plays a role in the control of the reticulum endoplasmic stress given :

- the putative interaction between SMILE and PDIA3
- the increased sensitivity of HeLa cells transfected with SMILE siRNA to the toxic effect of the proteasome inhibitor Bortezomib.

The physiological relevance of SMILE over-expression in TOL patient remains to be identified. Functional analysis are undergoing in an experimental model of kidney allograft in a fully allogeneic mismatched rat model. In this model, SMILE was found to be overexpressed in the kidney graft of tolerant recipients (XI TTS Basic Science Symposium, I ESOT Basic Science Meeting, Brussels). Studying SMILE function may help to reveal a new pathway of regulation of allo-immune response.

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

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.

Publications :

1. Canet E, Devallière J, Gérard N, Karam G, Giral M, Charreau B, et al. Profiling Posttransplant Circulating Antibodies in Kidney Transplantation Using Donor Endothelial Cells: Transplantation. févr 2012;93(3):257-64.
2. Guitton C, Cottureau A, Gerard N, Quillard T, Chauveau A, Devalliere J, et al. 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*. 1 avr 2011;300(4):C833-42.
3. Guitton C, Gérard N, Quillard T, Charreau B. Circulating Endothelial Cell Protein C Receptor: Endothelial Regulation and Cumulative Impact of Gender and A3 Haplotype. *Journal of Vascular Research*. 2011;48(4):336-46.
4. Guitton C, Gérard N, Sébille V, Bretonnière C, Zambon O, Villers D, et al. Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive Care Medicine*. juin 2011;37(6):950-6.

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 (Biocoll DIVAT INSERM)
2. Traitement des CE par des cytokines pour une expression optimale des molécules du HLA et autres antigènes membranaires

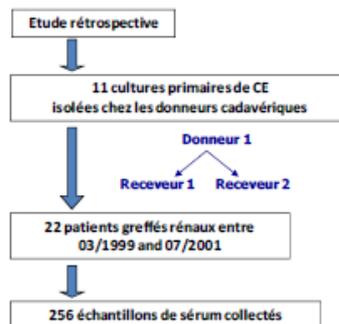


3. Réalisation du cross match endothélial (ECXM) par incubation des sérums post-greffe du receveur avec les cellules endothéliales du donneur

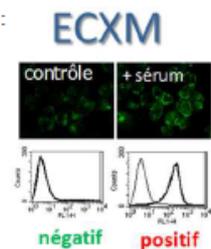


4. Analyse rétrospective des anticorps post-greffe d'une cohorte de transplantés pour lesquels des cultures de cellules endothéliales du donneur étaient disponibles.

Design de l'étude

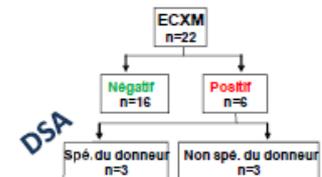
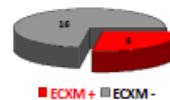


Exemple de détection d'anticorps post-greffe réagissant avec les cellules endothéliales et détectés par ECXM:



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 ± 44.2 $\mu\text{mol/L}$) et protéinurie (0.13 ± 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

Etude génotypique et pronostique des patients transplantés pour cirrhose biliaire et cholangite sclérosante primitives (TRANSCOLL)

CORPECHOT Christophe - Service d'Hépatologie

Centre de référence des maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires

Fédération d'Hépatogastroentérologie, Hôpital Saint-Antoine

Résumé :

Rationnel : 1) La sévérité et le pronostic des deux principales maladies cholestatiques chroniques de l'adulte, la cirrhose biliaire primitive (CBP) et de la cholangite sclérosante primitive (CSP), pourraient dépendre du polymorphisme génétique des transporteurs biliaires et de leurs facteurs de transcription (PHRC AOR03022, même équipe). 2) L'incidence des récurrences de CBP et de CSP après transplantation hépatique (TH), leurs facteurs prédictifs et leur pronostic sont mal connus. Leurs règles de prise en charge diagnostique et thérapeutique restent à établir. **Objectifs** : Constituer une cohorte nationale de patients transplantés pour CBP et CSP avec 2 objectifs principaux : 1) évaluer chez ces patients la fréquence des polymorphismes d'intérêt (MDR1rs2214102, SCP2rs7528565, MRP2rs2756109, FXRcng174-45298, PXRrs3732356) afin de confirmer leur association aux formes graves de maladies cholestatiques et valider leur valeur pronostique; 2) déterminer l'incidence des récurrences de la CBP et de la CSP après TH, identifier leurs facteurs prédictifs, évaluer leur pronostic, établir les règles de prise en charge spécifique propres à ce type de patients. **Méthodes** : Etude nationale multicentrique faisant participer les 21 centres français de TH adulte. Centralisation des prélèvements sanguins dans le laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Saint-Antoine. Etude génotypique par séquençage direct portant sur une population prédite de 200 patients greffés pour CBP et à peu près autant de patients greffés pour CSP. Groupes témoins constitués de 200 patients atteints de CBP et autant de patients atteints de CSP non greffés et sans maladie sévère ou évolutive (données déjà disponibles). Recueil des données cliniques au sein des centres participants. Etude des récurrences après TH à l'aide d'un suivi de cohorte rétrospectif/prospectif avec groupe contrôle. Durée de l'étude : 24 mois. **Résultats attendus et perspectives** : Meilleure prise en charge des patients atteints de CBP ou de CSP du fait de l'identification des facteurs de risque génétiques. Développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées en fonction des polymorphismes identifiés (agonistes de FXR et de PXR). Meilleure prise en charge des patients transplantés pour CBP ou CSP. Développement de voies de recherche physiopathologique utilisant la récurrence après greffe comme modèle d'étude des stades précoces de la maladie.

Projet non débuté

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

EMILIE Dominique - INSERM U 764, Clamart

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.

Mise au point d'un système original de préservation par perfusion pulsatile hydrothermique des greffons avant transplantation

FERRERA René - INSERM U886, Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine Lyon Nord

Résumé :

Problématique

Deux problèmes majeurs et intimement liés, limitent toujours l'expansion des transplantations cardiaques :

- 1- la pénurie des greffons. Le manque crucial d'organe est responsable de la première cause de mortalité en transplantation cardiaque : ceux qui décèdent avant la transplantation faute de greffons, soit 10 à 20% des malades proposés selon les séries.
- 2- la limitation du temps de préservation hypothermique des greffons. La durée de préservation par immersion hypothermique du greffon cardiaque est extrêmement courte: 4-6 heures. Prolonger ce temps de conservation permettrait de transporter les greffons sur de longues distances, au moins à l'échelle européenne, augmentant ainsi le pool de donneurs potentiels, en laissant le temps pour évaluer la viabilité de l'organe, tout en sortant du cadre actuel de l'urgence.

Objectifs de l'étude

Notre équipe envisage de répondre aux 2 questions suivantes :

- Peut-on optimiser la protection du greffon cardiaque par l'utilisation d'une nouvelle méthode de perfusion pulsatile hypothermique et d'un soluté de conservation enrichi ?
- Les résistances vasculaires coronaires sont-elles de bons témoins de l'état de viabilité du greffon? Sont-elles bien corrélées avec d'autres indices de viabilité ?

Etapes du projet

- Réalisation d'un nouveau prototype optimisé pour le transport et l'évaluation des greffons cardiaques.
- Ce système original associé que notre soluté de perfusion sera ensuite testé sur un modèle in vitro de cœur isolé (modèle Langendorff) avant d'être validé par des transplantations cardiaques expérimentales.

Résultats attendus

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.
- D'utiliser des cœurs prélevés non battant en optimisant leur protection grâce à la perfusion pulsatile hypothermique, tout en les évaluant en temps réel pendant le transport.

Ces procédures de protection assureraient un transport sur de longues distances et permettraient d'augmenter le pool de greffons cardiaques.

Etude prospective de la corrélation entre la réponse insulinique aiguë et l'isolement des îlots de Langerhans chez le donneur en mort encéphalique

HUBERT Thomas - Inserm U859 Thérapie Cellulaire du Diabète, CHU de Lille

Résumé :

Contexte : La faible reproductibilité de l'isolement des îlots de Langerhans reste un facteur limitant majeur pour le développement clinique de l'allogreffe d'îlots. Même dans les centres les plus expérimentés, les résultats actuels de l'isolement permettent la réalisation d'une greffe dans moins d'un cas sur deux seulement. La sélection des donneurs, basée sur des critères cliniques non validés, ne permet pas d'améliorer significativement ces résultats. Résultats préliminaires: Nous avons démontré chez le porc que le déterminant majeur du rendement de l'isolement était la masse effective d'îlots présente dans le pancréas du donneur (Hubert Diabetologia 2005). Nous avons ensuite confirmé au cours d'une étude pilote réalisée chez 29 donneurs en état de mort encéphalique, qu'une réponse insulinique aiguë (RIA) à l'arginine (reflet in vivo de la masse d'îlots) inférieure à 55 µUI/mL prédisait l'échec de l'isolement dans 90 % des cas.

Objectif : Le but de ce projet est de valider l'intérêt clinique de la sélection des donneurs basée sur la mesure extemporanée de la RIA à l'aide d'un dosage extemporané de l'insuline.

Méthodes: La RIA sera évaluée chez 50 donneurs en état de mort encéphalique, chez lesquels un prélèvement pancréatique sera envisagé. Des prélèvements sanguins seront réalisés avant le début du prélèvement, avant puis 1, 3 et 5 minutes après une injection intraveineuse d'arginine. L'insulinémie sera mesurée par une méthode extemporanée (STAT-Insulin; résultats disponibles en 20 minutes). Les îlots seront isolés selon une technique validée (certification ISO 9001-2000) dans le cadre de notre programme de greffe clinique. La RIA mesurée chez le donneur sera corrélée avec les résultats quantitatifs (nombre d'îlots équivalents) et qualitatifs (pureté, viabilité, sécrétion d'insuline), le caractère libérable ou non de la préparation d'îlots et sa greffe effective.

Résultats attendus : Si cette étude valide les résultats de notre étude pilote, la mesure de la RIA pourrait constituer une méthode simple et rapide (20 minutes) pour optimiser la sélection des donneurs et accroître significativement (+ 50 %) la proportion des prélèvements débouchant effectivement sur une greffe d'îlots.

Publication :

Hubert T, Strecker G, Gmyr V, Arnalsteen L, Garrigue D, Ezzouaoui R, et al. Acute Insulin Response to Arginine in Deceased Donors Predicts the Outcome of Human Islet Isolation. American Journal of Transplantation. avr 2008;8(4):872-6.

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

LEGEMBRE Patrick - UMR CNRS 5164, Université Bordeaux-2

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 sérinethréonine 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.

Publications :

1. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Merville P, Mahfouf W, Bouchet S, et al. The Immunosuppressor Mycophenolic Acid Kills Activated Lymphocytes by Inducing a Nonclassical Actin-Dependent Necrotic Signal. *J Immunol.* 12 janv 2008;181(11):7630-8.
2. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Legembre P. An atypical necrotic signal induced by immunosuppressive and anti-viral agents. *Autophagy.* avr 2009;5(3):425-7.

Thérapie cellulaire cardiaque par injection intra-myocardique de cellules souches mésenchymateuses : études pré-cliniques

LEMARCHAND Patricia - Institut du thorax, INSERM U533, Nantes

Résumé :

L'augmentation d'incidence de l'insuffisance cardiaque ischémique est un défi majeur des années à venir. En dépit des progrès importants accomplis dans le domaine de la cardiologie interventionnelle et de la pharmacologie, de nombreux patients évoluent encore inexorablement vers l'insuffisance cardiaque. La possibilité de traiter l'insuffisance cardiaque en régénérant le tissu cardiaque et vasculaire offre une nouvelle perspective, ouverte par la thérapie cellulaire cardiaque. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches médullaires qui pourraient se différencier en cardiomyocytes ou en cellules endothéliales. Leur action peut également s'exercer grâce aux facteurs trophiques qu'elles sécrètent. Un seul essai clinique d'administration de CSM après infarctus du myocarde a été publié. Dans cet essai randomisé (placebo vs CSM intra-coronaire), les patients ayant reçus des CSM ont eu une amélioration de la fraction d'éjection et une diminution de la taille de l'infarctus au PET-scan, sans mortalité ou morbidité supplémentaires. Toutefois, de nombreuses questions restent posées : 1- l'optimisation des techniques de culture pour une utilisation intra-tissulaire cardiaque, 2- la démonstration de l'absence de risque de troubles du rythme cardiaques après injection des CSM *in vivo*, 3- la biodistribution des CSM après injection percutanée endocavitaire. Notre projet a pour but de déterminer les caractéristiques optimales des CSM afin de les utiliser comme source de cellules souches fiable, standardisée et sûre pour la thérapie cellulaire cardiaque. Pour cela nous étudierons les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des CSM de patients cardiaques potentiellement greffables. Nous évaluerons les risques de troubles du rythme liés au devenir des cellules implantées. Enfin, après avoir établi un protocole optimisé de culture et d'implantation des CSM, nous le validerons dans un modèle de gros animal. L'ensemble de ces études pré-cliniques nous permettra d'obtenir l'autorisation auprès des autorités de régulation et de réaliser des essais cliniques de phase I dans des conditions optimales (essai MESAMI en préparation).

Publication :

1. Forest VF, Tirouvanziam AM, Perigaud C, Fernandes S, Fusellier MS, Desfontis J-C, et al. Cell distribution after intracoronary bone marrow stem cell delivery in damaged and undamaged myocardium: implications for clinical trials. *Stem cell research & therapy*. 2010;1(1):4.

Dispositif pour le transport et la conservation de vaisseaux

MEDDAHI-PELLE Anne - INSERM U 698, CHU Bichat, PARIS

Résumé :

En chirurgie vasculaire, les meilleurs résultats de remplacement artériel sont obtenus avec du matériel autologue. En l'absence de greffon autologue disponible l'une des alternatives est l'allogreffe vasculaire provenant d'une banque de tissu. Bien que les techniques de conservation des greffons, en particulier de cryo-conservation, se soient améliorées, des modifications de la structure vasculaires peuvent être observées pouvant conduire à la rupture ou au rejet de la greffe après implantation. Nous avons récemment mis au point et breveté, un dispositif permettant la conservation et le transport à température ambiante de cellules se présentant sous forme d'un kit contenant un hydrogel biocompatible et les plaques de culture prête à l'emploi etensemencées avec la lignée cellulaire choisie. L'adjonction au milieu de culture d'une poudre ou d'une pastille d'hydrogel provoque le gonflement et la prise du gel, formant un bouchon semi-solide. Un excès de liquide ou une digestion enzymatique permet de dissocier ces gels, laissant un tapis cellulaire viable et fonctionnel.

Du fait de ces propriétés, il a semblé intéressant d'utiliser ces hydrogels dans les procédures de conservation de tissu. Les travaux et résultats préliminaires ont permis de mettre au point les procédures d'enrobage de divers tissus à conserver. La présence d'hydrogel au moment de la procédure de cryo-conservation pourrait contribuer à la préservation du tissu en abaissant le point critique et limiter la formation des cristaux de glace matriciel et cellulaire limitant ainsi les lésions et améliorant la survie du greffon à long terme. Ces résultats sont donc à confirmer et à développer pour cette application. Trois parties sont prévues: 1- synthèse et caractérisation d'hydrogels et détermination des caractéristiques physico-chimiques des hydrogels à basses températures. 2- l'évaluation anatomo-physiologique de segments aortiques enrobés dans l'hydrogel et cryocongelés 3- le greffon cryo-conservé en présence d'hydrogel sera implanté in vivo dans un modèle animal (rats) et le greffon sera évaluée à court et à moyen terme.

Brevet :

1. PELLE MA, ABED A, Letourneur D, BAUDOT A. Cryoconservation de cellules, tissus et organes [Internet]. WO2013107797 A1, 2013 [cité 16 févr 2017]. Disponible sur: <http://www.google.fr/patents/WO2013107797A1>

Amélioration de la reconstitution immunitaire post allogreffe hématopoïétique sans induction de GVH par injection de cellules T cultivées

ROBINET Eric - EFS Bourgogne/Franche Comté

Résumé :

Plusieurs développements récents ont permis d'élargir les indications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : en réduisant la toxicité du conditionnement, les conditionnements non myéloablatifs ont permis d'appliquer l'allogreffe de CSH à des patients âgés ou de nouvelles pathologies. Les limitations dues aux à la disponibilité réduite de donneurs intra-familiaux ont été contournées par le développement des greffes haplo-identiques et surtout par l'utilisation du sang de cordon comme source de CSH alternative à la moelle ou aux cellules souches périphériques. Cependant, ces deux types de greffe sont associés à une moins bonne reconstitution immunitaire, conduisant à un risque infectieux accru. De plus, l'obtention d'une modulation efficace de l'alloréactivité après greffe de CSH allogéniques en fonction du risque de rejet de greffe, de réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et de rechute leucémique reste un objectif prioritaire pour les équipes de greffe. Dans cette optique, nous avons réalisé une étude de thérapie génique qui a démontré la possibilité de contrôler l'alloréactivité par transfert d'un gène de toxicité conditionnelle dans les cellules T du donneur, en présence d'une bonne reconstitution immunitaire. Cependant, nous avons montré que la culture *ex vivo* nécessaire au transfert de gène s'accompagnait d'une diminution d'alloréactivité des cellules génétiquement modifiées, se traduisant par une capacité diminuée, voire absente, à induire une GvH dans des modèles murins d'allogreffe de CSH. Nos résultats préliminaires montrent que ce phénomène ne s'accompagne pas d'une perte de l'effet bénéfique des cellules T sur la reconstitution. En effet, l'administration de cellules T du donneur cultivées *ex vivo* accélère la reconstitution immunitaire par les cellules T issues du greffon médullaire et non à une expansion périphérique des cellules T cultivées administrées lors de la greffe. Notre projet a deux objectifs :

(1) Appréhender les effets bénéfiques des cellules T cultivées *ex vivo* non alloréactives sur la reconstitution immunitaire et évaluer la faisabilité d'utiliser ces cellules comme approche originale de thérapie cellulaire destinée à améliorer la reconstitution immunitaire, notamment dans le cadre de greffes T-déplétées chez les patients âgés ou de greffes haplo-identiques ou de sang de cordon. Nous nous intéresserons ainsi aux origines (donneur, receveur, tierce partie), phénotypes (CD4 vs CD8, naïfs vs mémoires) et doses possibles des cellules T cultivées impliquées.

(2) Etudier les mécanismes impliqués, en posant deux hypothèses : (a) les effets bénéfiques des cellules cultivées sur la reconstitution immunitaire nécessitent une activation des cellules T administrées par reconnaissance des alloantigènes du receveur. Les mécanismes explorés porteront notamment sur l'implication d'une cytotoxicité anti-receveur ou la différenciation en cellules régulatrices. La simple mise en culture de cellules T allogéniques pourrait donc se révéler être une approche originale permettant de dissocier les effets néfastes des effets bénéfiques des cellules T alloréactives. (b) la culture *ex vivo* permet d'acquérir un potentiel d'amélioration de la reconstitution immunitaire indépendamment de l'alloréactivité anti-receveur des cellules cultivées. Les mécanismes explorés porteront sur l'implication de facteurs solubles (IL-7, IL-15 ou autres candidats, identifiés sur la base d'une analyse transcriptomique réalisée dans notre unité) ou de protéines Hedgehog dans la différenciation des cellules T.

Thymus et fonctions régulatrices de cellules hématopoïétiques chez l'homme

TOUBERT Antoine - INSERM U662, hôpital Saint-Louis

Résumé :

Objectifs : Le thymus joue un rôle crucial dans la reconstitution lymphocytaire T après allogreffe de cellules hématopoïétiques (CSH). Il peut être une cible de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) et sa fonction altérée au cours de la GVH aiguë et chronique. Par ailleurs, nous avons montré (Clave et al., *Blood*, 2005) l'influence de la fonction thymique du receveur avant greffe sur les événements suivant la greffe (survie, GVH, infections sévères). Ceci suggère que la fonction thymique est un paramètre important dans la qualité de la reconstitution immunitaire post-allogreffe. Le projet a pour objectif de:

- Corréler la fonction thymique pré et post greffe avec la reconstitution immunitaire des populations lymphocytaires T régulatrices (T_{reg}) CD4+CD25^{high} qui pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la GVH et sont produites dans le thymus pour les T_{reg} dits « naturels ».
- Préciser les mécanismes de l'atteinte thymique au cours de la GVH et son impact sur la production de lymphocytes T_{reg}.
- Corréler les paramètres précédents avec des données immunopathologiques concernant l'infiltrat lymphocytaire des lésions de GVH digestive.

Résultats attendus

- Une amélioration du suivi immunologique des patients après allogreffe de CSH par une meilleure compréhension des mécanismes de la reconstitution immunitaire T et du rôle de la fonction thymique.
- L'effet d'altérations persistantes de la fonction thymique sur le développement ultérieur d'une GVH chronique après une GVH aiguë sera en particulier analysé.
- A plus long terme, ces données pourraient justifier des approches visant à améliorer la fonction thymique au cours des allogreffes de CSH (IL-7, KGF).

Méthodologies

- Nous disposons d'échantillons (cellules mononuclées congelées après séparation sur Ficoll, DNA et RNA) de couples donneur/receveur avant greffe et en suivi à 3, 6, 12 mois après greffe. Ceux-ci ont été collectés de façon prospective dans le cadre d'un programme d'évaluation de la reconstitution immunitaire après allogreffe (PHRC AOM 97093).
- Les approches combineront une analyse phénotypique de la reconstitution immunitaire T, la quantification de la fonction thymique (TREC) et la mesure du taux d'expression du facteur FOXP3 par RT-PCR quantitative et cytométrie intracellulaire. Une technique innovante permettant d'évaluer la prolifération des précurseurs lymphoïdes intrathymique est développée (test « bêta TREC »). La diversité du répertoire T sera étudiée par PCR quantitative des différentes familles V et par Immunoscope.
- Cette étude sera couplée avec une étude *in situ* à partir de biopsies de patients atteints de GVH pour évaluer la présence de lymphocytes T_{reg} au sein de l'infiltrat par marquage immunoenzymatique.

L'analyse statistique sera conduite à la recherche de corrélations avec les événements post-greffe (survie, GVH aiguë et chronique, infections sévères) à l'aide de méthodes statistiques univariées et multivariées.

Publication :

Clave E, Busson M, Douay C, de Latour RP, Berrou J, Rabian C, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(25):6477–6484.

Induction de la tolérance aux allogreffes avec des lymphocytes T régulateurs

VAN MEERJWIJK Joost -INSERM U563, CHU Purpan, Toulouse

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.

Publication :

Pasquet L, Douet J-Y, Sparwasser T, Romagnoli P, van Meerwijk JPM. Long-term prevention of chronic allograft rejection by regulatory T-cell immunotherapy involves host Foxp3-expressing T cells. *Blood*. 23 mai 2013;121(21):4303-10.

Dysrégulation phagocytaire en réponse à l'activation des récepteurs Toll-like et des protéines Nod chez les patients transplantés rénaux

VANDEWALLE Alain - INSERM U 773, Centre de Recherches Biomédicales Bichat-Beaujon

Résumé :

Objectifs : Les infections du tractus urinaire (ITU) et les pyélonéphrites (APN) sont fréquemment observées chez les patients transplantés rénaux. Une étude rétrospective sur une cohorte de patients transplantés rénaux nous a permis de montrer que les APN représentent un facteur de risque associé à une diminution durable de la fonction rénale (Pellé et coll. Am. J. Transplant., 2007). La reconnaissance de motifs conservés d'éléments bactériens (lipoprotéines, lipopolysaccharide, peptidoglycane, flagelline, ou DNA hypométhylé) par des récepteurs de la famille Toll-like (TLR) et/ou des protéines intracellulaires comme les protéines Nod exprimées par les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales, est responsable d'une activation des voies de signalisation intracellulaire. Celles-ci conduisent à la production de cytokines proinflammatoires, notamment l'IL-8 impliquée dans le recrutement au niveau des foyers inflammatoires des polynucléaires neutrophiles (PMN) qui jouent un rôle clé dans la clairance rénale des bactéries. Cependant, la fonction des PMN, comme les niveaux d'expression et la fonctionnalité des TLR et des protéines Nod des cellules phagocytaires chez les patients transplantés soumis à une immunosuppression prolongée, restent encore mal connus.

Résultats attendus : La mise en évidence d'altérations de la fonction des PMN et/ou des niveaux d'expression des récepteurs de l'immunité innée à distance d'épisodes infectieux chez des patients transplantés rénaux pourrait rendre compte, au moins en partie, de la fréquence anormalement élevée des ITU et des APN.

Méthodologie : Le but du projet, associant des membres de l'unité INSERM U773 (Faculté Bichat, Paris) et le service de transplantation rénale de l'Hôpital Tenon (AP-HP), est d'analyser les capacités de réponse immunitaire des cellules phagocytaires de patients transplantés rénaux ayant présenté ou non des épisodes d'ITU et/ou d'APN, les prélèvements sanguins étant effectués à distance des épisodes infectieux. Les études porteront sur l'analyse 1- de la fonction des PMN circulants (i. expression des molécules d'adhérence, ii. production des formes réactives de l'oxygène, iii. degré d'apoptose des PMN) en réponse à différents agonistes des TLR (1, 2, 4, 6 et 9) et des Nod (Nod1 et Nod2) ; 2- de la production de cytokines et chimiokines mesurée sur sang total incubé avec des agonistes des TLR et des Nod et 3- des niveaux d'expression des ARN messagers par PCR en temps réel des récepteurs TLRs et des protéines Nod1 et Nod2 à partir de sang total et de PMN purifiés prélevés à distance des épisodes infectieux. Parallèlement, l'effet d'agents immunosuppresseurs (ciclosporine A, rapamycine) sur les fonctions des PMN et la production de cytokines de sujets sains seront aussi évalués *in vitro*. Les résultats préliminaires ont mis en évidence des anomalies fonctionnelles des PMN en réponse aux agonistes de TLR9 et Nod1 ainsi qu'une augmentation singulière de l'expression de TLR9 associée à une diminution de l'expression de la protéine Nod1. Ce projet devrait ainsi permettre de mieux caractériser les anomalies d'expression des récepteurs de l'immunité innée chez les patients greffés rénaux et d'appréhender leur implication dans la survenue des ITU et des APN.

Publication :

Tourneur E, Ben Mkaddem S, Chassin C, Bens M, Goujon J-M, Charles N, et al. Cyclosporine A Impairs Nucleotide Binding Oligomerization Domain (Nod1)-Mediated Innate Antibacterial Renal Defenses in Mice and Human Transplant Recipients. PLoS Pathog. 31 janv 2013;9(1):e1003152.

Création d'une prothèse valvulaire cardiaque autologue par ingénierie tissulaire

VINCENTELLI André - Equipe de recherche Inserm ERI-9, Université de Lille 2

Résumé :

La prise en charge chirurgicale des valvulopathies cardiaques consiste essentiellement à remplacer la valve malade par un substitut prothétique avec chaque année, plus de 300 000 implantations dans le monde. Malgré des améliorations importantes depuis 20 ans, le substitut valvulaire cardiaque « idéal » n'existe pas encore. L'ingénierie tissulaire offre de nouvelles perspectives pour la création d'un substitut biologique doté de performances hémodynamiques optimales, ainsi que des capacités de remodelage et de croissance. Plusieurs équipes ont montré qu'une matrice valvulaire décellularisée pouvait être recolonisée *in vitro* par des cellules d'origine variée. Nous avons émis en 2004 l'hypothèse originale qu'une matrice xénogénique (porcine), décellularisée pourrait servir de support à une recolonisation *in vivo* par les cellules du receveur, après implantation chirurgicale en position de fonction chez l'agneau. Nous avons montré qu'après décellularisation non enzymatique, les propriétés mécaniques de la matrice étaient satisfaisantes, et qu'une recolonisation spontanée par les cellules de l'hôte était effective. Nous avons ensuite démontré qu'une injection *in situ* de cellules autologues médullaires mésenchymateuses améliorait la recolonisation et l'hémodynamique de la valve. Cependant, des microcalcifications apparaissent après 4 mois, accompagnées de petits foyers inflammatoires, ce qui laisse supposer que la matrice reste immunogène et devait être améliorée. Notre projet est donc d'améliorer les conditions de préparation de la matrice (modification du procédé de décellularisation, essai de solutions immunofacilitantes à base de polyéthylène glycol) avec évaluation physicochimique et biologique (thrombogénicité, adhésion, prolifération et différenciation cellulaire). La matrice extracellulaire améliorée sera ensuite testée *in vivo*, avec ou sans injection de cellules mésenchymateuses, chez l'agneau, en position de fonction, avec des reculs variés allant jusqu'à 1 an. Notre objectif est l'obtention d'un substitut valvulaire utilisable chez l'homme par des techniques combinées de préparation de matrices extracellulaires et d'incorporation de cellules autologues.