

**AOR 2008 « Recherche et greffe »  
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Titre	Thème
COHEN José	<a href="#"><u>Utilisation thérapeutique des Treg spécifiques dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques chez la souris</u></a>	3
DANNER-BOUCHER Isabelle	<a href="#"><u>Mécanismes immunopathologiques de stabilisation de la bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire</u></a>	3
FOURNIER Véronique	<a href="#"><u>Enquête d'éthique clinique auprès de candidats-donneurs de foie à distance de la greffe du receveur</u></a>	1
GAUGLER Béatrice	<a href="#"><u>Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides dans physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)</u></a>	3
GLOTZ Denis	<a href="#"><u>Rôle des anticorps anti-HLA de classe II, spécifiques des antigènes du donneur dans l'accommodation du greffon en transplantation rénale</u></a>	3
KALFA David	<a href="#"><u>Remplacement de la voie de sortie du cœur droit par un patch biodégradable valve utilisant des cellules autologues de cordon ombilical</u></a>	6
LANSAC Emmanuel	<a href="#"><u>Reconstruction valvulaire en péricarde autologue : une alternative plus physiologique au remplacement valvulaire aortique du sujet jeune</u></a>	6
LEPLEGE Alain	<a href="#"><u>Fondements éthiques de l'élargissement du cercle des donateurs. Étude sur les conceptions du consentement et du motif altruiste à l'épreuve des théories de l'équité dans l'allocation des greffons</u></a>	1
MASSARD Gilbert	<a href="#"><u>Préservation pulmonaire in situ par perfusion pulmonaire à cœur arrêté : Evaluation de la faisabilité chez le porc</u></a>	2
PICARD Nicolas	<a href="#"><u>POLYCIS : polymorphisme des cibles protéiques des immunosuppresseurs et réponse au traitement en transplantation</u></a>	4
RETIERE Christelle	<a href="#"><u>Contribution à l'étude fonctionnelle du récepteur activateur KIR2DS1 dans l'alloréactivité cellulaire NK</u></a>	3
ROUAS-FREISS Nathalie	<a href="#"><u>Applications diagnostique et thérapeutique de HLA-G en transplantation</u></a>	3
SANQUER Sylvia	<a href="#"><u>Multiplex "immunosup" test : dosage simultané d'un panel de biomarqueurs pour le suivi de l'état d'immunosuppression</u></a>	4

SIEWEKE Michael	<a href="#"><u>Amplification des monocytes ex vivo à but de thérapie cellulaire régénérative d'organes</u></a>	6
TAUPIN Jean-Luc	<a href="#"><u>Immunsation anti-MICA survenant en l'absence d'anticorps anti-HLA et de facteur de risque d'allo-immunsation</u></a>	4
VIEILLARD Vincent	<a href="#"><u>Reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire</u></a>	3

### **THEMES DE RECHERCHE : GREFFES D'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 de la transplantation ;
- 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

## Utilisation thérapeutique des Treg spécifiques dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques chez la souris

COHEN José - Université Pierre et Marie Curie

### Résumé :

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogénique est l'une des approches thérapeutiques principales pour la reconstitution hématopoïétique de patients atteints d'aplasie médullaire, de déficits immunitaires ou de leucémies. Dans ce dernier cas, l'efficacité de la greffe de CSH allogénique repose à la fois sur la myéloablation induite par le conditionnement et sur le transfert de lymphocytes T (Ly T) du donneur présents au sein du greffon qui exercent (i) un effet antileucémique ou *graft versus leukemia* (GVL), (ii) une facilitation de la prise de greffe et (iii) contribuent à la reconstitution immunitaire du patient. Toutefois, cette action bénéfique des Ly T est contrebalancée par le risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH), principale cause de décès post-greffe. Cette GVH est liée à la reconnaissance par les Ly T du donneur, d'antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité présentés par les cellules du receveur. En 1995, le groupe de Shimon Sakaguchi au Japon a identifié les Ly T CD4+CD25+ immunosuppresseurs (Treg) dans le champ de l'auto-immunité. Nos travaux pionniers ont permis de montrer que l'élimination des Treg naturellement présents dans le greffon médullaire aggrave fortement la GVH, alors qu'au contraire, lorsque le greffon contient un grand nombre de Treg et plus particulièrement des Treg spécifiques pour les antigènes du futur receveur, la GVH est contrôlée. Ce projet repose sur deux objectifs.

1) Sur un plan préclinique : définir la participation des Ly T du donneur présents dans le greffon sur la reconstitution immunitaire post-greffe après contrôle de la GVH par les Treg spécifiques. On sait que ce sont ces LyT du greffon qui portent la reconstitution immunitaire post-greffe du fait de l'involution thymique chez l'homme adulte.

2) Sur un plan fondamental, étudier la possibilité d'utiliser des Treg spécifiques d'antigènes « non allogéniques » pour contrôler la GVH. Ce dernier objectif aborde la question de l'effet suppresseur de proximité ou « bystander » des Treg.

Ce projet de recherche repose dans sa globalité sur des modèles de GVH développés chez la souris. Brièvement, des souris receveuses sont létalement irradiées et reçoivent un greffon médullaire provenant d'une souris incompatible ou semi-incompatible. La GVH est induite par l'adjonction au greffon de Ly T prélevés chez la souris donneuse au niveau de ses ganglions périphériques. La particularité méthodologique de ce projet repose sur l'utilisation de moelle osseuse souris CD3e, classe I ou classe II KO pour répondre aux questions spécifiquement posées ici.

Nous devrions à terme définir l'impact des Treg sur les Ly T du donneur présent dans le greffon et donc la compatibilité de cette approche avec une utilisation clinique. Nous pensons également décrire plus en détail et, dans ce contexte si particulier sur le plan physiopathologique qu'est l'allogreffe de CSH, le mode d'action des Treg.

### Publication :

Gaidot A, Landau DA, Martin GH, Bonduelle O, Grinberg-Bleyer Y, Matheoud D, et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 10 mars 2011;117(10):2975-83.

## Mécanismes immunopathologiques de stabilisation de la bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire

DANNER-BOUCHER Isabelle – Inserm

### Résumé :

La bronchiolite oblitérante (BO) constitue la principale cause à moyen et long terme de perte fonctionnelle du greffon pulmonaire. Elle se manifeste par l'apparition d'un trouble ventilatoire obstructif (TVO) irréversible. Cependant il n'est pas rare d'observer un arrêt de la dégradation fonctionnelle à un stade plus ou moins avancé dans le cours évolutif de la maladie. L'activation des lymphocytes T régulateurs (Treg) joue probablement un rôle central dans ce processus.

**L'objectif** de ce projet est de montrer que les BO stables sont caractérisées par un phénotype Th2 et régulateur, et que l'acquisition de ce phénotype précède la survenue du trouble ventilatoire obstructif. De plus, on s'attend à montrer que l'interaction DC/LT des BO stables est de type « tolérant » par rapport à celle retrouvée dans les BO évolutives, notamment dans des conditions de stimulation des récepteurs TOLL et en présence d'antigène. Il en découlera l'identification de marqueurs immunologiques prédictifs de la stabilisation des BO, et prédictifs de la survenue d'une BO chez les transplantés sans complication. L'identification de ces marqueurs pourrait permettre la mise en place de stratégie de prévention de la BO, ou d'induction d'une stabilisation chez les patients porteurs de BO évolutive.

**Méthodologie** : Des patients transplantés pulmonaires à Marseille et à Nantes seront inclus. Une étude transversale comparera entre eux les transplantés indemnes de toute complication, les BO évolutives et les BO stables. Une étude longitudinale sera menée sur deux ans, permettant d'établir la précocité de l'activation lymphocytaire T caractéristique de la BO et celle caractéristique de la BO stable. L'activation lymphocytaire T sera étudiée dans le sang par la présence de marqueurs de surface (CD25, CD69, ICOS, CTLA4, CD28), la production de cytokines (Il-13, IFN- $\gamma$ , Il-10) et l'expression de Foxp3. L'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T sera par ailleurs étudiée dans différentes conditions (activation des TLRs et présence d'antigènes).

## **Enquête d'éthique clinique auprès de candidats-donneurs de foie à distance de la greffe du receveur**

**FOURNIER Véronique** - Hop Cochin Saint Vincent de Paul

### **Résumé :**

Depuis 2003, le Centre d'éthique clinique (Cec) a collaboré au programme de transplantation hépatique par donneur vivant (THDV) des hôpitaux Bicêtre et Cochin à Paris. A la demande des chirurgiens préleveurs, l'équipe d'éthique clinique reçoit systématiquement en entretien au cours e leur bilan pré-don tous les candidats donneurs de foie, afin d'évaluer leur niveau d'information, leurs motivations et leur liberté de consentement. Après cinq ans, il nous est apparu important de compléter cette collaboration par un suivi des candidats donneurs précédemment rencontrés, à distance de la transplantation chez le receveur, afin de mieux évaluer les forces et les faiblesses de notre pratique

**Objectifs :** Recueillir auprès des candidats-donneurs des éléments de suivi et de réflexion à distance de la greffe du receveur (au moins un an après) sur la procédure de THDV dans laquelle ils ont été impliqués, à partir de la proposition qui leur a été faite d'être donneur jusqu'à la date de l'interview.

**Méthodologie :** Enquête qualitative par entretiens téléphoniques semi-directifs menés par un binôme (un médecin et une psychologue, tous membres de l'équipe d'éthique clinique). La population de l'étude est composée des candidats-donneurs ayant été reçus en entretien pré-don par le Cec, si les receveurs respectifs ont été transplantés au moins un an auparavant. Les interviews explorent successivement les principaux thèmes suivants : l'état de santé physique et psychologique du candidat donneur et du receveur, les changements et la qualité des relations intrafamiliales, les conséquences professionnelles et socioéconomiques de la procédure THDV, la position du candidat donneur par rapport au don et à la politique de santé publique THDV.

### **Résultats attendus :**

- Mieux évaluer les enjeux à distance pour les candidats-donneurs du fait de leur avoir proposé le don
  - Confronter les éléments de suivi avec les conclusions de l'évaluation pré-don pour affiner cette dernière
- Enrichir la réflexion éthique commune sur la procédure d'ensemble THDV.

### **Publication :**

Fournier V, Foureur N, Rari E. The ethics of living donation for liver transplant: beyond donor autonomy. Med Health Care and Philos. 31 juill 2012;16(1):45-54.



## Quand la demande d'enfant dérange l'éthique: une étude d'éthique clinique.

Denis Berthiau<sup>(1)(2)</sup>, Véronique Fournier<sup>(1)</sup>, Philippe Bataille<sup>(3)</sup>, Julie d'Haussey<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centre d'éthique clinique, Hôpital Cochin, Paris, France,

<sup>(2)</sup> Faculté de Droit, Université Paris Descartes

<sup>(3)</sup> CADIS, EHES, Paris

[www.ethique-clinique.com](http://www.ethique-clinique.com)

### Objectifs

- 1- Identifier les arguments des demandeurs et ceux des équipes médicales lorsque la demande d'AMP dérange l'équipe au plan éthique
- 2 - Faire une lecture critique pluri-disciplinaire de ce qui s'exprime alors sur le terrain à ce sujet (médecine, philosophie, droit, sociologie)

### Méthode

**Enquête qualitative** prospective: mai 2007 - janvier 2009

**Entretiens semi directifs** en *one-to-one* avec les couples demandeurs d'une part et les soignants d'autre part.

**Population étudiée:** demandes d'AMP posant problème au plan éthique soit du fait de l'âge, soit du fait de la maladie, soit du fait de la technique sollicitée (Gestation pour autrui) :

**N = 48 couples et 4 femmes seules**

**23 pour âge élevé:** 15 hommes (âge moyen : 66 ans), 8 femmes (âge moyen : 46 ans)

**15 pour maladie grave:** mucoviscidose (6), cancer (6), divers (3)

**14 pour GPA:** Rokitanski (5), impossibilité utérine ancienne de porter un enfant (3); hystérectomie pour éclampsie (5); homosexualité (1)

**Méthode d'analyse :** thématization séquentielle, "grounded theory"

### Résultats: Les demandeurs:

Résultats très cohérents entre les 3 groupes de l'étude.

Expriment une **grande colère** sur l'intrusion dans leur vie privée de la société via la médecine

**Rèclament le respect de leur autonomie reproductive.**

**Contestent les 3 arguments fondateurs de la loi:**

**L'intérêt de l'enfant:** Se considèrent ses meilleurs garants

**Le non droit à l'enfant :** disent que l'argument est contraire à la finalité même de l'AMP.

**Le respect d'un certain ordre social:** se sentent représentatifs de ce qui fait "norme" aujourd'hui sur le plan social. Pour eux, la famille "idéale" implicitement souhaitée par la loi n'est plus la norme au plan social.

**Promeuvent d'autres valeurs qui devraient servir selon eux à repenser les limites de l'accès à l'AMP:** égalité d'accès pour tous, non commercialisation de l'AMP, sécurité sanitaire.

### Résultats: les soignants

**Se distinguent en 2 groupes selon leur interprétation de la loi et de leur rôle en tant que soignants:**

**Groupe 1:** la loi leur a confié le rôle de garant de l'accueil d'un enfant dans une "bonne" famille. Ils sont soucieux d'honorer la responsabilité qui leur a été confiée, y compris aux dépens du demandeur.

**Groupe 2:** ils se considèrent davantage au service des couples que de la société: tant que la loi n'interdit pas, ils vont jusqu'au bout de ce qu'ils peuvent faire pour répondre à la demande.

### Discussion

**Le tryptique éthique ayant porté les options législatives en matière d'AMP** (intérêt de l'enfant, non droit à l'enfant, respect d'un certain ordre social et familial) **reste-t-il légitime ?**

**Subjectivité :** L'infini des jugements subjectifs et personnels sur ces questions ne doit-il pas inviter à la **tolérance plutôt qu'à l'interdit?**

**Rôle de la médecine :** Au coeur des tensions entre intérêt individuel et intérêt collectif, **quelle est sa mission première?**

**Autonomie reproductive :** jusqu'où l'Etat doit-il/peut-il restreindre l'autonomie reproductive des citoyens ? Au nom de quels arguments éthiques ?

### Conclusions

**Conclusions de la lecture critique et pluridisciplinaire:**

**Le désir d'enfant apparaît élémentaire et vital.** Ni interrogeable ni contestable, il fait partie de la sphère privée.

Les citoyens devraient avoir le droit à toute l'aide et la **solidarité** possibles de la société.

**La priorité de la médecine: être une médecine du sujet et non de la société.**

Appuyer les politiques publiques sur **les valeurs-socles** qui émergent (refus de l'exploitation des vulnérables, pas de commercialisation, refus des inégalités d'accès, respect des règles de sécurité et de qualité sanitaires)

**Intérêt de ce type de recherche de terrain :**

Mieux comprendre ce qu'ont à dire les demandeurs versus les équipes soignantes sur ce sujet des limites en matière d'AMP

**Observer les valeurs-socles** de la société et leur évolution en regard des cadres normatifs existants

Potentiellement utiles pour **revisiter les lois** existantes et/ou remettre en cause leur intérêt

### Bibliographie:

Quand la demande d'enfant dérange l'éthique, Ed. Centre d'éthique clinique, Juillet 2011

Access to assisted reproductive technologies in France: the emergence of the patients' voice, Véronique Fournier et al, Med Health Care and Philos, (2013) 16:55-68

## Que vivent les candidats-donneurs de foie lorsqu'ils se proposent comme donneurs?

### Que faut-il en penser?

### Une étude d'éthique clinique

Véronique Fournier<sup>(1)</sup>, Eirini Rari<sup>(1)</sup>, Nicolas Foureur<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centre d'éthique clinique, Hôpital Cochin, AP-HP

[www.ethique-clinique.com](http://www.ethique-clinique.com)

#### Objectifs de l'étude:

- Mieux connaître ce que vivent les candidats-donneurs et ce qu'ils pensent au plan éthique de la procédure
- Enrichir la réflexion collective sur les enjeux éthiques de la transplantation hépatique par don vivant (THDV) [1].

#### Méthode:

Etude qualitative rétrospective, menée entre avril 2007 et décembre 2009, sous forme d'entretiens téléphoniques approfondis (30 à 45 mn), conduits par un binôme médecin-psychologue auprès de candidats-donneurs dont le receveur a été greffé depuis au moins un an.

#### Population:

**N = 46**

Donneurs parent/enfant (atrésie des voies biliaires +++)

24 prélevés, 22 non prélevés

19 mères, 27 pères

Âge moyen: 33 ans (25 – 40)

Age moyen de l'enfant à la greffe: 24 mois

3 receveurs décédés dont 1 après don vivant

20 candidats-donneurs faisant partie de la population d'inclusion n'ont pas pu être recontactés: 15 perdus de vue et 5 refus

#### Résultats:

- **85% des enfants greffés vont bien** : décrits comme dynamiques, gais, bien intégrés socialement et à l'école. Les parents disent que le suivi médical post greffe est peu pesant, mais qu'ils craignent la rechute.
- **Les parents prélevés vont bien** : les hommes gardent le souvenir d'une grosse épreuve douloureuse et restent inquiets pour leur foie. Les femmes semblent avoir « tourné la page » plus vite.
- **Grosse épreuve familiale** mais attribuée à la maladie plutôt qu'à la greffe qui est vécue comme une « *bénédictio*n ».
- **Tous témoignent d'une forte solidarité sociale** face à l'épreuve. Aucun des donneurs ne demandent d'indemnité compensatrice : *c'est la moindre des choses de donner, vu tout ce que la médecine et la société font pour notre enfant.*
- **Un grand « enthousiasme éthique » pour THDV** : les candidats plébiscitent la procédure sur le fond comme sur la forme, qu'ils aient été prélevés ou non et quelque soit l'état de santé du receveur. Ils sont fiers d'avoir pu participer activement au processus.
- **Un poids trop lourd donné à la recherche du consentement** : ils dénoncent la lourdeur du processus de recueil de consentement, qu'ils comprennent comme une façon pour la société et les médecins de se décharger de leur responsabilité sur eux en cas d'accident.
- **Une demande forte d'accompagnement** : ils sont nombreux à s'être sentis insuffisamment suivis et accompagnés au plan médical, psychologique et social.

#### Discussion:

- L'étude ne concerne que THDV : attention à ne pas élargir les conclusions à toute activité de transplantation.
- **On est rassuré quant au vécu de la procédure THDV pour les candidats-donneurs.**
- **Mais on est frappé par l'importance (excessive?) que représente le recueil du consentement** : comme si c'était la seule chose importante pour la société : vécu comme tel par les candidats-donneurs. Pourtant, la littérature internationale est unanime et dit la même chose que ce que nous avons trouvé dans une étude préalable: **le consentement du donneur est un leurre [1].**
- **La validation éthique de la THDV par les candidats-donneurs ne suffit donc pas à rassurer au plan éthique**: ils sont essentiellement préoccupés du receveur et prêts à beaucoup subir pour cela. Ils font alliance avec le chirurgien-transplantateur et leur alliance fait force: elle impose le recours à la THDV, il est difficile de la contester, il n'y a plus qu'à suivre,
- L'éthique ne consiste-t-elle pas alors à maximiser l'accompagnement sous toutes ses formes plutôt qu'à trop s'appesantir sur la seule recueil du consentement?.
- **Le consentement du receveur est souvent négligé**, comme si celui-ci ne pouvait qu'être content qu'on veuille le sauver à tout prix, y compris avec un greffon venu d'un donneur proche.

#### Conclusions:

La procédure gagnerait probablement au plan éthique à moins se focaliser sur la recherche d'un consentement libre et éclairé du donneur que sur une maximisation de son accompagnement au plan médical, psychologique et social.

Malgré ce qui peut être considéré comme un plébiscite de la procédure THDV par les candidats-donneurs, il convient de ne pas perdre de vue certaines limites éthiques :

- Les limites des équipes, au nom de leur intégrité professionnelle : leur tolérance à l'accident-donneur est moindre que celle des candidats au don, voire celle de la population générale [1] .

- La place du receveur dans le processus décisionnel : et en particulier: peut-on et comment aborder cette question pour les receveurs-enfants? [2]

Ces études qualitatives, permettent de récupérer des éléments de terrain et sont utiles pour évaluer et/ou repenser les cadres normatifs (et législatifs) existants.

#### Bibliographie:

[1] : Fournier V et al. "Consent by living donors: an ethics alibi?". *Bioethica Forum*. 2008; vol 1; No2 : 115-120

[2] : Fournier V et al. "The ethics of living donation for liver transplant: Beyond donor autonomy". *Med Health Care Philos*. 2013 Feb;16(1):45-54.

#### Remerciements:

Cette étude a été menée dans le cadre d'une collaboration avec le département d'hépatologie pédiatrique de l'hôpital Bicêtre et le service de chirurgie digestive adulte de l'hôpital Cochin (transféré depuis à Saint Antoine). Elle a été co-financée par l'ABM.

## **Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides dans physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)**

**GAUGLER Béatrice – EFS**

### **Résumé :**

La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) caractérisée par une destruction des tissus de l'hôte, représente l'une des limitations majeures du traitement par allogreffe de cellules hématopoïétiques (CH). Les cellules dendritiques (DC), notamment les DC du receveur résistant à l'irradiation, mais aussi celles du donneur, participent à l'initiation de la GVHD, ou encore modulent sa sévérité. Les DC plasmacytoides (PDC) correspondent à une sous-population particulière de DC initialement décrites pour leur capacité à produire les IFN de type I en réponse à une infection virale, qui peuvent aussi dans certains cas induire des cellules T régulatrices et sont impliquées aussi dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Nous évaluerons dans ce projet le rôle des PDC dans l'initiation ou le maintien de la GVHD, et notamment sur les sites cibles de la GVHD. Nous adresserons ces questions i) dans deux modèles murins de GVHD déjà en place au sein de l'unité UMR645, (un modèle de GVHD aiguë et un second avec une forme sclérodermique de GVHD chronique) où nous étudierons les conséquences de la déplétion ou l'activation des PDC sur la survenue et la sévérité de la GVHD, l'induction des réponses cellulaires T (TH1, TH2, TH17 et T régulatrices), et la fonction des PDC dans les tissus cibles de la GVHD et ii) nous analyserons la présence et la fonction des PDC dans les biopsies de peau chez les patients traités par allogreffe de CH avec un conditionnement d'intensité réduite non myéloablatif et atteints de GVHD cutanée. Les résultats attendus de cette étude devraient nous permettre d'établir la relative contribution des PDC dans la physiopathologie de la GVHD, qui pourraient faire l'objet de nouvelles possibilités d'immunointerventions futures.

### **Publication :**

Bossard C, Malard F, Arbez J, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia*. juill 2012;26(7):1471-4.



## Rôle des anticorps anti-HLA de classe II, spécifiques des antigènes du donneur dans l'accommodation du greffon en transplantation rénale

GLOTZ Denis - Hôpital Saint Louis

### Résumé :

Les allo-anticorps anti-HLA spécifiques des antigènes du donneur (DSA) chez les patients transplantés rénaux sont d'importants médiateurs du rejet aigu humoral (RAH) dont la cible principale est la cellule endothéliale. Sous certaines conditions, leur présence n'entraîne aucune lésion endothéliale, phénomène dénommé « accommodation » du greffon. Un des mécanismes impliqué dans l'accommodation du greffon est l'expression de « gènes de survie » comme Bcl-2 et Bcl-x par la cellule endothéliale. Il a été montré que de faibles concentrations d'anticorps anti-HLA de classe I induisaient l'expression de ces gènes dans la cellule endothéliale en activant la voie de signalisation PI3K/Akt. Le rôle *in vivo* de ces médiateurs de la signalisation associée aux molécules HLA de classe I en transplantation rénale reste néanmoins à définir. Par ailleurs, les effets de l'activation de la cellule endothéliale après engagement des molécules HLA de classe II ainsi que les voies de signalisation associées restent méconnus. Nos travaux précédents ont montré que la signalisation via les molécules HLA de classe II pouvait initier l'apoptose des lymphocytes B et des cellules dendritiques. Par contre, l'activation de monocyte-derived endothelial like cells (MO-ELC) par un anticorps monoclonal anti-HLA-DR n'induisait pas d'apoptose contrairement au lymphocyte B. Ces résultats préliminaires soulèvent donc l'hypothèse d'un effet non délétère des anticorps anti-HLA de classe II sur la cellule endothéliale, voire bénéfique en participant aux mécanismes d'accommodation. Notre projet a trois objectifs :

- 1) déterminer le rôle *in vitro* des anticorps anti-HLA de classe II issus de patients immunisés sur l'activité de la cellule endothéliale (prolifération, différenciation, apoptose, résistance à la cytotoxicité médiée par le complément, expression de gènes de survie) en utilisant comme modèle de culture les Human Arterial Endothelial Cells (HAECs). Notre hypothèse est que l'engagement des molécules HLA de classe II sur la cellule endothéliale conduit à l'expression de gènes de survie, inhibant l'apoptose de la cellule, participant ainsi aux mécanismes d'accommodation du greffon.
- 2) identifier les acteurs de la voie de signalisation associée à l'engagement des molécules HLA de classe II à la surface de la cellule endothéliale. Nous pensons que deux voies distinctes sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose de la cellule endothéliale : (a) une voie impliquant la Focal Adhésion Kinase (FAK) et ses cibles (b) et un rôle direct de l'interaction du cytosquelette avec les molécules HLA de classe II. L'identification des médiateurs impliqués dans chacune de ces deux voies, leur fonction ainsi que leur rôle temporo-spatial dans la signalisation via HLA II seront étudiés en associant des techniques de protéomiques (Immunoprécipitation, Immunoblot), d'imagerie et de SiRNA.
- 3) étudier le rôle *in vivo* de cette signalisation dans la survenue et l'évolution du RAH en transplantation rénale. Nous pensons que les médiateurs de la signalisation via les molécules HLA de classe II dans la cellule endothéliale sont impliqués *in vivo* dans l'accommodation du greffon et dans l'évolution favorable des RAH. Nous étudierons ces deux hypothèses en analysant l'expression *in situ* (par Immunohistochimie et RT-PCR) des médiateurs de la signalisation via HLA II dans les greffons rénaux de patients immunisés (biopsies de greffon protocolaires et avec diagnostic de RAH).

## Remplacement de la voie de sortie du cœur droit par un patch biodégradable valve utilisant des cellules autologues de cordon ombilical

KALFA David – Inserm

### Résumé :

Les moyens actuellement disponibles et utilisés en pratique clinique pour la réparation chirurgicale des cardiopathies congénitales sont des matériaux inertes ne présentant aucun potentiel de croissance ni de régénération et conduisant à des reprises chirurgicales multiples. Notre projet de recherche consiste à remplacer une partie de la voie de sortie du cœur droit chez l'agneau en croissance par un patch biodégradable transannulaire valvé obtenu par ingénierie tissulaire avec ensemencement de cellules souches autologues de sang de cordon ombilical prélevées chez le même agneau à sa naissance.

**Notre objectif principal** est d'évaluer :

- 1) la survie et la différenciation in vivo des cellules souches autologues de cordon ombilical soumises aux conditions de flux artériel pulmonaire
- 2) la croissance in vivo de cette néo-voie de sortie du cœur droit chez l'agneau en croissance.

**Les méthodes** seront les suivantes : les sangs de cordon ombilical d'agneaux seront prélevés par ponction de la veine ombilicale par césarienne. Les cellules souches mésenchymateuses et cellules progénitrices endothéliales issues du sang de cordon seront isolées, cultivées, caractérisées (FACS), marquées (quantum dots), puis ensemencées sur des patches valvés résorbables qui seront implantés chez 9 agneaux (groupe test). Cinq animaux recevant un patch de péricarde autologue avec monovalve de gore-tex constitueront le groupe témoin. Les voies de sortie droite et la fonction valvulaire pulmonaire des animaux test et témoins seront évaluées par échographie cardiaque et IRM.

Les animaux seront sacrifiés 1, 2, 3, 4 et 5 mois après l'implantation des patches. L'étude des patches implantés et non implantés sera macroscopique (mesure de la croissance), histologique (éosinehématoxyline, Masson trichrome, rouge sirius, repérage des cellules marquées par quantum dots) et immunohistochimique (phénotypage cellulaire anti- $\alpha$ -SMA, -CD31, -vimentine et -myosine).

**Les résultats attendus** sont :

- 1) la survie et la différenciation des cellules souches de sang de cordon ombilical en cellules endothéliales et /ou musculaires lisses et/ou myocardiques, différenciation guidée par le microenvironnement cellulaire avoisinant ;
  - 2) la synthèse par ces cellules d'une matrice extra-cellulaire comparable aux tissus natifs d'artère pulmonaire et d'infundibulum pulmonaire et la disparition du polymère biodégradable ;
  - 3) la croissance et la fonctionnalité de ce patch valvé chez ce modèle d'animal en croissance.
- L'une des perspectives à terme est la restitution *ad integrum* d'une néo voie de sortie droite (infundibulum pulmonaire et artère proximale), vivante, autologue, fonctionnelle, douée d'un potentiel de croissance, évitant ainsi la morbidité et la mortalité majeures inhérentes à la chirurgie actuelle. De plus, les cellules de sang de cordon ombilical constitueraient une source immédiate et non invasive de cellules souches autologues disponibles dès la naissance, chez un enfant atteint de cardiopathie congénitale diagnostiquée en période anténatale, pouvant être utilisées pour la réparation de sa propre cardiopathie.

### Publication :

Kalfa D, Bel A, Chen-Tournoux A, Della Martina A, Rochereau P, Coz C, et al. A polydioxanone electrospun valved patch to replace the right ventricular outflow tract in a growing lamb model. *Biomaterials*. mai 2010;31(14):4056-63.

## **Reconstruction valvulaire en péricarde autologue : une alternative plus physiologique au remplacement valvulaire aortique du sujet jeune**

LANSAC Emmanuel - INSERM

### **Résumé :**

**Objectifs :** Le traitement actuel des valvulopathies aortiques non réparables du sujet jeune repose sur les valves prothétiques et les homogreffes. Les valves mécaniques sont théoriquement définitives, mais requièrent une anticoagulation efficace, exposant aux risques thromboemboliques et hémorragiques. Les bioprothèses ne nécessitent pas d'anticoagulation mais ont une durée de vie limitée, leur usure est d'autant plus rapide qu'elles sont implantées précocement. Les homogreffes sont peu disponibles et exposées à une dégénérescence rapide par mécanisme de rejet lié à l'absence de traitement immunosuppresseur. Le concept du remplacement valvulaire en péricarde autologue représente théoriquement une alternative intéressante aux bioprothèses actuelles en termes d'immunocompatibilité, de disponibilité, de durabilité ainsi que son faible coût. Le péricarde autologue est le plus souvent traité au glutaraldehyde qui améliore sa maniabilité chirurgicale et diminue les risques de rétraction. Cependant par son action cytotoxique, il l'expose aux mêmes risques de dégénérescence que les bioprothèses. Notre projet propose de trouver une alternative au glutaraldehyde conférant au péricarde autologue une meilleure viabilité tissulaire à long terme en limitant son risque de fibrose rétractile. Les objectifs sont : (1) d'élaborer *in vitro* de nouveaux modes de préparation du péricarde autologue réalisables en extemporanée d'une durée compatible avec les impératifs opératoires ( $\leq 15$  minutes), (2) d'évaluer ces néo-valves *in vivo* sur un modèle ovin en position orthotopique

**Méthodologie :** La première partie du projet sera consacrée à l'élaboration *in vitro* de nouveaux modes de traitement du péricarde autologue (solution de conservation et technique de décellularisation rapide). Ces traitements seront évalués par techniques de cultures cellulaires, études biomécaniques et morphologiques (histologie, immunohistologie ...) sur 4 groupes expérimentaux (péricarde autologue frais, ou decellularisé aux ultrasons puis stabilisé à l'éthanol ou imprégné au LMW Fucoïdane, ou traité au glutaraldehyde (groupe témoin)).

La deuxième partie concerne l'évaluation *in vivo* de la néo-valve aortique en péricarde autologue sur un modèle ovin. Trois groupes de 6 moutons seront opérés d'un remplacement valvulaire en péricarde autologue, traité selon les résultats obtenus *in vitro* (péricarde autologue frais prétraité ou non au LMW Fucoïdan, ou decellularisé ou traité au glutaraldehyde (groupe témoin)). La moitié des animaux seront sacrifiés à 6 mois, l'autre à 1 an. L'efficacité sera évaluée *in vivo* (échocardiographie intra cardiaque), et *in vitro* (analyse histologique et immunohistochimique).

### **Résultats attendus :**

Une standardisation des techniques de traitement du péricarde autologue permettant de préserver sa viabilité à long terme ainsi que des procédures chirurgicales de fabrication de la néo-valve aortique sur un modèle expérimental constitue le préalable indispensable à une étude clinique. Celle-ci pourrait comparer le remplacement valvulaire en péricarde autologue aux bioprothèses actuelles. Le péricarde autologue pourrait être une alternative particulièrement intéressante pour le traitement des valvulopathies aortiques non réparables du sujet jeune et dans les pays à forte endémie rhumatismale, où le traitement anticoagulant reste difficilement gérable.

### **Publication :**

BA M. Reconstruction valvulaire aortique : Mise au point d'une prothèse en péricarde autologue prétraitée par un hydrogel de polysaccharide. Thèse

## **Fondements éthiques de l'élargissement du cercle des donneurs. Étude sur les conceptions du consentement et du motif altruiste à l'épreuve des théories de l'équité dans l'allocation des greffons**

**LEPLEGE Alain** - Université Paris Diderot

### **Résumé :**

A l'origine de ce projet de recherche se trouve l'intuition que face à la pénurie persistante d'organes, il est impératif d'un point de vue éthique de réfléchir à l'élargissement de la catégorie des donneurs non anonymes. De tels élargissements ont déjà été effectués par le législateur français sans dépasser le cercle familial, dans un sens large. L'hypothèse de ce projet qu'un tel élargissement qui constitue un impératif éthique, doit se fonder non seulement sur le principe de la bienfaisance mais aussi sur un principe d'équité. En effet, la limitation de la catégorie des donneurs aux seuls membres de la famille désavantage cruellement les personnes qui disposent d'un « capital famille » faible ou inexistant, au-delà d'un « capital santé » hautement menacé. Ce désavantage peut être évalué en confrontant les résultats des théories égalitaristes de l'équité face à l'infortune (luck egalitarian theories) à ceux de l'éthique de la sollicitude. Par ailleurs, une politique d'élargissement du cercle de donneurs doit être accompagnée d'une refonte des conditions de validité du consentement, afin notamment d'éviter le risque de marchandisation du corps humain. Sans garanties efficaces, ce risque désavantagerait particulièrement les membres les plus démunis de la société. Pour cette raison, notre recherche se propose d'explorer ensemble les deux aspects éthiques de la transplantation d'organes – le consentement au don et l'équité de l'allocation – en faisant l'hypothèse qu'un « facteur important du faible taux de dons d'organes peut être que le système actuel découple les deux composantes de la transplantation, en rompant le lien entre le donneur et le destinataire ». Ce projet de recherche théorique et conceptuelle à visée pratique a donc pour objectif :

- 1/ d'examiner le fondement éthique de l'élargissement des catégories des donneurs potentiels au regard des théories de l'équité,
- 2/ d'analyser les conditions du consentement et les garanties qui devraient être mises en place pour protéger les nouvelles catégories de donneurs afin d'éviter tout risque de « marchandisation » du corps humain,
- 3/ d'évaluer, du point de vue de l'éthique de la sollicitude, le rôle de la famille, du lien affectif et du motif altruiste dans le don entre personnes vivantes, ainsi que dans l'expression de la volonté du défunt, lorsqu'il s'agit d'un prélèvement sur personne décédée.

## **Préservation pulmonaire *in situ* par perfusion pulmonaire à cœur arrêté : Evaluation de la faisabilité chez le porc**

**MASSARD Gilbert** - CHU Strasbourg

### **«Résumé :**

Le prélèvement pulmonaire à cœur arrêté est en train de se concrétiser en France en ce qui concerne la greffe de reins. Différentes expériences ont été tentées en Europe dans le domaine de la transplantation pulmonaire, notamment en Espagne, Suède, Grand Bretagne et Belgique. La préservation pulmonaire est difficile dans les premières heures après l'arrêt cardiaque du fait de la nécessité de respecter l'intégrité du corps du défunt dans l'attente du déroulement des formalités judiciaires et celles liées au consentement. Les expériences faites jusqu'à présent ont démontré qu'on peut préserver les poumons *in situ* par refroidissement topique pendant trois heures, puis évaluer leurs fonctionnalités soit *in situ* par perfusion du corps par oxygénateur à membrane extra corporelle (ECMO), soit en laboratoire, avec un système de perfusion pulmonaire *ex-vivo*. Les défauts principaux de ces méthodes sont liés à la complexité de leur application clinique (expériences *ex-vivo*) et au caractère invasif du refroidissement topique qui est peu compatible avec le respect de l'intégrité corporelle du défunt. Avec ce projet, nous avons l'intention de développer une méthode de refroidissement et d'évaluation fonctionnelle du bloc bipulmonaire « *in situ* » de façon percutanée, par abord direct de la carotide et jugulaire droites. Cette première phase se déroule chez l'animal de laboratoire (le porc de 30/40 kg). Une seconde étude chez l'homme est prévue en fonction des résultats obtenus. Un système de perfusion pulmonaire sélective est mis en place 30-60 min après l'euthanasie de l'animal, d'abord par voie chirurgicale, puis progressivement par voie percutanée, afin de perfuser le bloc bi-pulmonaire par injection directe dans le ventricule droit de Perfadex à 0°-4°C. Le retour sera assuré par une aspiration située dans le ventricule gauche. Une pompe Biomedicus permettra la circulation du système. Sur ces organes ainsi préservés *in situ*, il est prévu d'analyser, en fonction de la durée de l'ischémie froide, les modifications morphologiques, fonctionnelles et hémodynamiques qui surviennent après l'arrêt cardiaque. Les altérations morphologiques du tissu pulmonaire seront étudiées sur biopsies pulmonaires (histologie, cytologie, immunomarquage) obtenus par thoracoscopie. L'étude des altérations alvéolaires sera l'objet de plusieurs lavages bronchiolo-alvéolaires. L'évaluation fonctionnelle pulmonaire est obtenue par perfusion d'une solution de Perfadex avec hématies (Solution de Steen<sup>□</sup>, VitroLife, Göteborg - Suède) permettant d'estimer la capacité d'oxygénation de la solution dans l'arbre vasculaire pulmonaire, la ventilation étant maintenue après l'arrêt cardiaque. Enfin les altérations de l'hémodynamique pulmonaire seront étudiées par cathétérisme sélectif. Nous espérons obtenir des résultats au moins superposables à ceux actuellement présents dans la littérature dans le cas de perfusion intervenant 1 heure après l'arrêt cardiaque, mais avec une méthode plus simple et plus facilement réalisable chez l'homme dans le respect de l'intégrité du défunt mais aussi de façon compatible au prélèvement des organes abdominaux.

### **Publication :**

Pottecher J, Santelmo N, Noll E, Charles A-L, Benahmed M, Canuet M, et al. Cold ischemia with selective anterograde *in situ* pulmonary perfusion preserves gas exchange and mitochondrial homeostasis and curbs inflammation in an experimental model of donation after cardiac death. *Transplant International*. juill 2013;n/a-n/a.

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

**PICARD Nicolas – INSERM**

### **Résumé :**

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

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

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

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

### Contexte

- La mTOR est une sérine thréonine kinase cible d'inhibiteurs immunosuppresseurs (sirolimus, évérolimus) ou anticancéreux (témsirolimus, évérolimus).
- Son principal effecteur est la ribosomal protein S6 Kinase (p70S6K), une protéine proposée comme biomarqueur pharmacodynamique (Peralba et col. 2003; Hartmann et col. 2005) présentant une très importante variabilité d'activité basale et d'inhibition (Fig.1). Son inhibition est par ailleurs en faible corrélation avec l'exposition sanguine aux inhibiteurs de la mTOR (ImTORS)

### Hypothèses

- La variabilité génétique de la mTOR ou de la P70S6K pourrait contribuer aux
- Différences d'activité basale des protéines (expression ou fonction)
  - Différences d'effets des ImTORS
- Et donc potentiellement à la variabilité de réponse thérapeutique

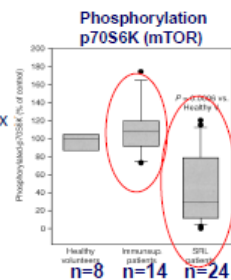


Fig. 1 (Hartmann et col. 2005)

### Objectifs

- 1- Décrire la variabilité génétique de la mTOR et de la p70S6k à partir des données du projet international HapMap (Nature des SNP et des haplotypes ; fréquences dans la population Française)
- 2- Etudier l'influence des SNP mTOR sur son expression lymphocytaire (ARNm)

### Méthodes

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

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

- CIC de Limoges (23 hommes/21 femmes ; 66±13 ans)
- Extraction d'ADN génomique et d'ARN leucocytaire
- Génotypage des TagSNP ( technique TaqMan)
- Identification des haplotypes (logiciel Phase® [Stephens et al., 2001])
- Etude d'expression en ARN messager (PCR TaqMan)
- Analyse statistique (Par haplotype : logiciel Thesias® [D. Tregouet; genecanvas.ecgene.net] ; Par SNP : test non paramétrique de Kruskal-Wallis). Etude de corrélation (expression-âge) (test r de Pearson)

### Résultats

#### ➤ Données HapMap :

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

- p70S6K (gène RPS6KB1) : mTOR SNP 17 SNP (introniques) fréq. 7,5-31%

#### -Structure haplotypique

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

#### - Expression leucocytaire de la mTOR

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



Fig. 2

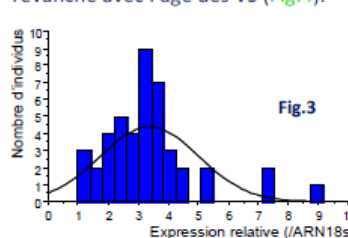
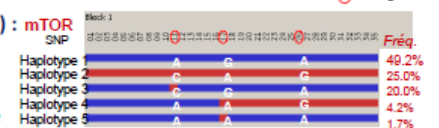


Fig.3

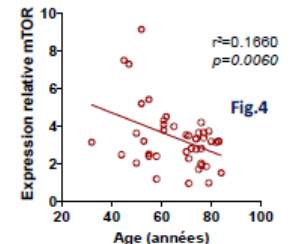


Fig.4

### Conclusion et perspectives

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

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

RETIERE Christelle - EFS-Pays de Loire

### **Résumé :**

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

### **Publication :**

Morvan M, David G, Sébille V, Perrin A, Gagne K, Willem C, et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *European Journal of Immunology*. déc 2008;38(12):3474-86.



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

**ROUAS-FREISS** Nathalie – CEA

### **Résumé :**

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

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

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

**SANQUER Sylvia** – hôpital NECKER

### **Résumé :**

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

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

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

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

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

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

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

### Objectifs

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

### Méthodologie

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

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

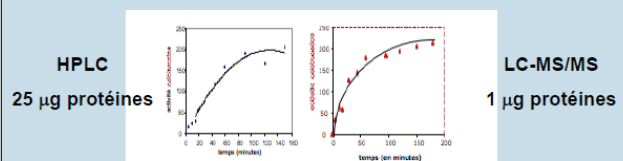
Trois objectifs ont été poursuivis:

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

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

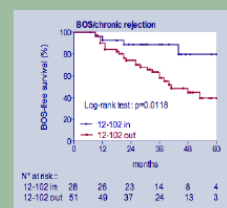
### Résultats

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



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

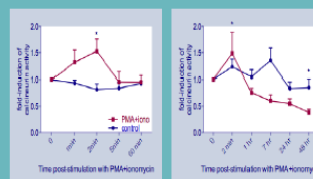
#### Evaluation de l'activité calcineurine pendant 2 ans après transplantation pulmonaire



Détermination d'une zone d'activité optimale pour la calcineurine avec 2 seuils :  
**12-102 pmol/mg/min**

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

#### Régulation de la calcineurine après activation lymphocytaire



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

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

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

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

**SIEWEKE Michael** – Inserm

### **Résumé :**

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

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

Au laboratoire, nous avons montré que les monocytes déficients pour les facteurs de transcription MafB et c-Maf continuent de proliférer en culture pendant plusieurs mois jusqu'à atteindre un facteur d'amplification d'au moins 1010 fois, sans monter de signes ni de transformation ni de perte d'expression de marqueurs, de morphologie ou de fonction macrophagiques. De manière intéressante, chez la souris, les monocytes doublement déficients pour MafB et c-Maf n'induisent pas de leucémies, contribuent normalement au tissu macrophagique et ne dépassent pas un nombre normal. De plus, les monocytes MafB/c-Maf doublement déficients peuvent toujours être amplifiés en culture même à partir du sang de souris âgées. Les applications thérapeutiques potentielles de ces observations sont incluses dans une demande de brevet (European patent application EP 07 300717.1). Nous proposons ici d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénotype et tenterons de transférer nos observations au système humain en utilisant l'interférence ARN et des protéines porteuses d'activité c-Maf et MafB dominante-négative

### **Publication :**

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, et al. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science*. 6 nov 2009;326(5954):865-7.

## **Immunsation anti-MICA survenant en l'absence d'anticorps anti-HLA et de facteur de risque d'alloimmunsation**

**TAUPIN Jean-Luc** – Université

### **Résumé :**

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

## Reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire

VIEILLARD Vincent - AP-HP -Hop Pitié Salpêtrière

### Résumé :

Les greffes géno-identiques de cellules souches hématopoïétiques (CSH) permettent de guérir certaines leucémies non curables par une chimiothérapie conventionnelle. Cependant, environ 60% des patients n'ont pas de donneurs HLA-identiques, familial ou non apparenté. Les greffes de CSH haplo-identiques étaient une alternative intéressante pour les patients sans donneur, mais les résultats cliniques furent désastreux avec une rechute leucémique chez plus de 90% des patients. Les greffes de sang placentaire chez des patients adultes leucémiques permettent d'obtenir une survie globale d'environ 60% et une très faible mortalité liée au conditionnement (<15%). L'obtention d'un système immunitaire fonctionnel à partir des cellules souches du donneur est un des événements qui concourent au succès d'une greffe de CSH d'origine médullaire, périphérique ou placentaire. Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée qui contribuent à l'élimination des cellules tumorales. Le sang placentaire semble être riche en cellules NK, mais aucune étude n'a évalué la reconstitution en cellules NK après greffes de sang placentaire. Pourtant, ces cellules NK sont parmi les premières à être générées après une greffe de CSH, plusieurs mois avant les lymphocytes T et sont donc pendant cette période les principaux acteurs responsables de l'absence de rechute leucémique. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire chez les patients de la cohorte Minicord (PHRC national, Coordinateur Principal : B. Rio), porteurs de leucémies aiguës myéloblastiques. L'étude portera sur une cinquantaine de patients, elle sera quantitative et qualitative avec des études phénotypiques (récepteurs NK) et fonctionnelles (cytotoxicité vis-à-vis de cellules leucémiques) des cellules NK. De plus, la reconstitution NK sera corrélée avec différents facteurs cliniques comme la rechute, la GvH, la survenue d'infections et la survie globale. Il s'agit de la première étude réalisée chez des patients leucémiques recevant une greffe de sang placentaire qui pour but d'évaluer le rôle des cellules NK dans une thérapeutique innovante chez des patients en échec thérapeutique. Le projet original et pluridisciplinaire sera réalisé sur les échantillons de la Cohorte Minocord qui réunit plus de 30 services d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire dans toute la France dans le cadre du projet Minicord et le Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire (INSERM U543) de la Pitié-Salpêtrière à Paris, permettant une mise en commun des compétences dans le domaine des hémopathies malignes réfractaires, des greffes de sang placentaire et de l'étude de la reconstitution en cellules NK.

### Publications :

1. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadiere B, et al. CD56brightCD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 15 juin 2011;186(12):6753-61.
2. Beziat V, Nguyen S, Exley M, Achour A, Simon T, Chevallier P, et al. Shaping of iNKT cell repertoire after unrelated cord blood transplantation. *Clinical Immunology*. juin 2010;135(3):364-73.
3. Beziat V, Nguyen S, Lapusan S, Hervier B, Dhedin N, Bories D, et al. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia*. 2009;23(4):721-728.
4. Nguyen S, Béziat V, Roos-Weil D, Vieillard V. Role of Natural Killer Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Myth or Reality? *Journal of Innate Immunity*. 2011;3(4):383-94.

# Appel d'Offres « Recherche et greffe »

## Fully Functional NK Cells after Cord Blood Transplantation

V Beziat<sup>1,2</sup>, S Nguyen<sup>1,2,3</sup>, S Lapusan<sup>4</sup>, B Hervier<sup>1,2</sup>, N Dhedin<sup>3</sup>, D Bories<sup>5</sup>, M Uzunov<sup>3</sup>, A Boudifa<sup>6</sup>, H Trebeden-Negre<sup>7</sup>, F Norol<sup>7</sup>, Z Marjanovic<sup>4</sup>, J-P Marie<sup>4</sup>, J-P Vernant<sup>3</sup>, P Debre<sup>1,2,6</sup>, B Rio<sup>4</sup>, V Vieillard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 945, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>2</sup>UPMC, Université Paris-6, Paris, France; <sup>3</sup>Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>4</sup>Département d'Hématologie et d'Oncologie Médicale, Hôtel Dieu, Paris, France; <sup>5</sup>Unité d'Hématologie Moléculaire, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France; <sup>6</sup>Département d'Immunologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>7</sup>Laboratoire de Thérapie Cellulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

### Introduction :

Human natural killer (NK) cells are innate immune lymphocytes that held early clinical promise because of their ability to lyse leukemic cells without specific antigen recognition. Progress in the field of NK cell receptor has revolutionized our concept of how NK cells recognize and lyse leukemic cells while sparing normal cells. To accomplish this task, they are equipped with a large number of inhibiting and activating receptors, including killer cell immunoglobulin like receptors (KIR), C-type lectin (NKG2A) and natural cytotoxicity receptors (NKP30, NKP46). Functionally, NK cells are an important source of cytokines (ie: IFN- $\gamma$ ), and cytolytic activities.

Treatment of leukemia with transplantation of allogeneic bone marrow or stem cells from peripheral blood is limited by the scarcity of HLA-matched related donors; Only 50% of patients were eligible. There is considerable evidence that cord-blood from unrelated donors is a promising option for patients which lack a donor. The advantages of umbilical cord blood transplantation (UCBT) are the immediate availability of cells, the absence of risk for the donor, but also the greater tolerance of HLA disparity and lower incidence of GvH disease, with similar disease-free survival as compared to bone marrow transplantation. UCBT have been successfully primarily in children but also more recently in adults (Gluckman et al, NEJM 1997, Laughlin et al NEJM 2004, Rocha et al NEJM 2004).

The aim of the present study is to evaluate the reconstitution of NK cells following UCBT in adult patients, which received a reduced-intensity conditioning regimen.

### Methods :

#### Phenotypic analysis :

Five-color FACS analysis was performed on freshly harvested blood cells. NK cells were analyzed after staining with an appropriate antibody cocktail. FACS lysing solution (BD) was used to lyse erythrocytes. At least 20 000 leukocytes were analyzed on a FC500 cytometer (Coulter)

#### Functional studies :

For intracellular staining, PBMC were incubated overnight in presence of IL12 (10 ng/ml) and IL18 (100 ng/ml). Cells were fixed and permeabilized with Cytotop/Cytoperm reagent (BD), and then stained with an anti-IFN- $\gamma$  antibody. For cytotoxicity, PBMC were cultured with 100 IU/ml IL2 for 48h. Direct cytotoxic activity of NK cells was assessed in a standard 4h 51Cr-release assay, against either K562 cells or primary leukemias blasts from AML patients. The degranulation assay was performed to determine CD107a cell-surface expression in the presence of target cells.

#### Statistical analysis

Analysis was performed with Mann and Whitney test. Results were considered significantly different from healthy adult controls when the p value was < 0,05 (1\*: p<0,05; 2\*: p<0,01; 3\*: p<0,001).

Table 1 - Patients Characteristics :

Recipient median age at transplantation, years (range)	43.3 (18-64)
Male patient, number (%)	18 (72)
Disease numbers (%)	
Acute myelogenous leukemia	13 (52)
Acute lymphoblastic leukemia	3 (12)
Non Hodgkin's lymphoma	6 (24)
Myeloma	2 (8)
Secondary fibrosis myeloma	1 (4)
CMV Seropositivity (%)	17 (68)
Previous transplant (%)	
None	11 (44)
1	12 (48)
>2	2 (8)
HLA matching (%)	
6/6	1 (4)
5/6	5 (20)
4/6	14 (56)
3/6	5 (20)
Infused CD45+ cells/kg ( $\times 10^6$ )	1.6 $\pm$ 1.0
Infused CD34+ cells/kg ( $\times 10^6$ )	8.7 $\pm$ 4.3
Double cord-blood transplant (%)	6 (24)
Acute GvHD I-III (%)	8 (32)
Acute GvHD IV (%)	0 (0%)
Median before neutrophils > 500/mm <sup>3</sup> , days (range)	20 (4-45)
Median donor chimerism at day 30 (% extreme quartile)	99.3 (70.5-99.9)
KIR ligand mismatch in GrV direction (%)	4 (16)
Free relapse survival rate at 6 months (%)	17 (68)

Figure 1 – NK cell reconstitution following UCBT :

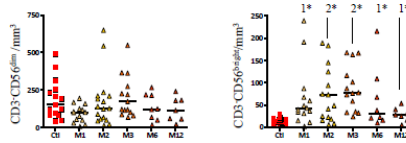


Figure 1: Absolute cell counts, NK CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>high</sup> gated on CD45<sup>+</sup> leukocytes from peripheral blood. Cells were collected from healthy individuals (Cb), and from the patients at one (M1), two (M2), three (M3) and six (M6) months after UCBT. The black bar indicates the median.

Figure 2 – Inhibitory NKG2A receptor overexpression is counterbalanced by an increase of activating receptors (NKP30 and NKP46) in relationship with *in vivo* cell activation after UCBT :

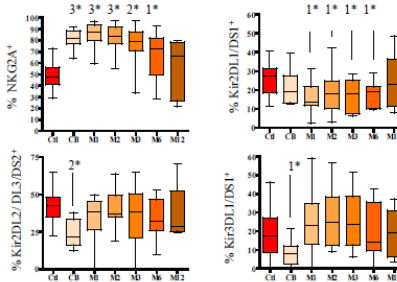


Figure 2: Expression NKG2A and KIR (KIR2DL1/DS1 = p58a, KIR2DL2.3/DS2.3 = p58b and KIR3DL1/DS1 = p70), on CD3-CD56<sup>dim</sup> NK cells. Cells were collected from healthy individuals (Cb), cord blood (CB), and from the patients at one (M1), two (M2), three (M3) and six (M6) months after UCBT. The black bar indicates the median.

Figure 3 – High frequency of NK cells express maturity markers early after UCBT

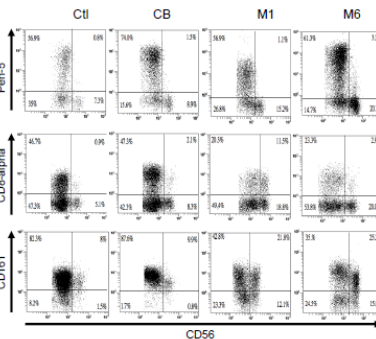


Figure 3: NK cells were tested by flow-cytometry for maturity markers expression. Pictures were obtained by gated on CD3-CD56<sup>+</sup> and analyzed for Pen-5 (upper panel), CD8 $\alpha$  (middle panel) and CD161 (lower panel) expression. Cells were collected from healthy individuals (Cb), cord blood (CB), and from the patients at one (M1) and six (M6) months after UCBT. Pictures are representative of all tested samples.

Figure 4 – Over-expression of IFN- $\gamma$  CD56<sup>dim</sup> NK cells following UCBT :

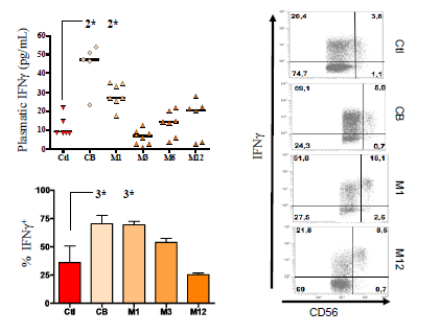


Figure 4: IFN- $\gamma$  production was determined by ELISA in the sera (Upper left panel) or intracellularly by flow cytometry on CD3-CD56<sup>+</sup> NK cells (Upper right panel). Cells were collected from healthy individuals (Cb), cord blood (CB), and from the patients at one (M1), three (M3) and twelve (M12) months after UCBT. Right panel represents representative samples. Regions used to determine the proportion of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>high</sup> NK cells, which expressed IFN- $\gamma$  are shown.

Figure 5 – Rapid restoration of direct lysis against primary blasts after UCBT :

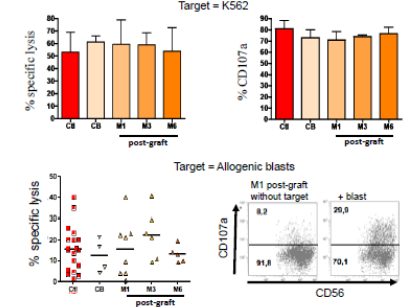


Figure 5: NK cytotoxic activity was tested against K562 target cells and allogeneic primary AML blasts. Functional activities were performed using <sup>51</sup>Cr release assay (left panel) or degranulation responses by cell surface expression of CD107a (right panel) on CD3-CD56<sup>+</sup> NK cells. Cells were collected from healthy individuals (Cb), cord blood (CB), and from the patients at one (M1), three (M3) and six (M6) months after UCBT.

### Conclusion :

Previously, NK cells generated after haplo-identical stem-cell transplantation were characterized by an immature phenotype, and impaired functional activities, in association with very poor clinical outcome (Nguyen et al Blood 2005, Leukemia 2008). In contrast, following UCBT, NK cells become very rapidly functional and could mediate graft-versus-leukemic (GvL) effect.