

**AOR 2009 « Recherche et greffe »
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Thème
IVANOVIC Zoran	Conservation à long et à court terme des cellules hématopoïétiques du sang placentaire après leur expansion ex vivo	2
VANDEWALLE Alain	Effets de la Ciclosporine A dans l'activation cellulaire et la défense des greffons rénaux contre les Escherichia coli uropathogènes	3
MOHTY Mohamad	Evaluation à long terme des patients traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	1
IGNACIO Anegon	Induction de cellules dendritiques tolérogènes par le monoxyde de carbone	3
GUICHEUX Jérôme	Transplantation de cellules autologues par des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral	3
Dany ANGLICHEAU	Dépistage précoce non invasif de la néphropathie chronique du greffon rénal par suivi longitudinal des ARN urinaires	3
CHARREAU Béatrice	Impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale des molécules MICA et conséquences en transplantation rénale	3
VIBERT Eric	Nouveau dispositif de modulation du débit portal pour la prévention du syndrome « small for size »	2
LE MAUFF Brigitte Gilles BLANCHO	Induction de tolérance par blocage des signaux de costimulation CD28 et CD40 chez le primate par vectorisation génétique	5
BENSOUSSAN Danièle	Production de lymphocytes T anti-adénovirus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSh : protocole clinique	3 & 6
THUILLIER Raphaël	La perfusion oxygénée du greffon : évaluation, limitations, perspectives	2
PATTOU François	Développement de l'autogreffe intramusculaire d'îlots pancréatiques dans un modèle pré-clinique chez les patients pancréatectomisés pour TIPMP	6
GUIDOTTI Jacques- Emmanuel	Approche de repeuplement sélectif du foie par transfert de gène dans le cadre de la maladie Crigler-Najjar	6
CARTIER-LACAVE Nathalie	Identification et évaluation préclinique d'une population circulante de progéniteurs de microglie	6
AZZARONE Bruno	Prévention du rejet d'allogreffe rénale : Rôle du système IL-15/IL-15R dans l'homéostasie des cellules épithéliales rénales	3

THEMES DE RECHERCHE :

GREFFES D'ORGANES, TISSUS, CELLULES

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales : étude en santé publique et / ou éthique ;**
- 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) Insuffisance terminale d'organes : études en épidémiologie, santé publique, besoin et offre de soins ;**
- 6) Ingénierie cellulaire et tissulaire comme alternative à l'allogreffe**

Conservation à long et à court terme des cellules hématopoïétiques du sang placentaire après leur expansion *ex vivo*

IVANOVIC Zoran (EFS Aquitaine Limousin) -)

Dans les Laboratoires R&D en Ingénierie Cellulaire et de Thérapie Cellulaire, ainsi que la banque de sang placentaire de l'Établissement Français du Sang – Aquitaine Limousin (EFS-AL), nous avons développé une procédure d'expansion *ex vivo* à partir des cellules CD34+ du sang placentaire congelées. Ce système mis en « grand volume » s'est avéré très efficace (expansion cellulaire ~ 500 fois, expansion des cellules CD34+ et des progéniteurs x 150, aucune perte de capacité des cellules souches très primitives responsables de greffe en série des souris NOD/SCID. Il a été utilisé comme base biologique pour le PHRC qui consiste à greffer aux patients ces cellules après leur expansion (responsable de PHRC : Professeur Noël Milpied ; à débiter courant 2009). Ayant l'expérience dans le domaine de l'expansion *ex vivo* depuis une décennie, notre unité de thérapie cellulaire envisage la possibilité de réaliser l'expansion de cellules du sang placentaire pour les centres greffeurs éloignés.

Le but de ce projet est donc de tester la possibilité de conserver les cellules du sang placentaire obtenues par expansion *ex vivo* à partir des cellules CD34+ issues des unités de sang placentaire congelées. Ce projet a deux volets :

1. Conservation à long terme du produit d'expansion par congélation.
2. Conservation à court terme du produit d'expansion par stockage à basse température (+4°C).

La modalité qui s'avère acceptable pourrait permettre le transport de produits d'expansion et sa greffe dans le centre greffeur éloigné du Laboratoire de Thérapie Cellulaire en charge de l'expansion. Ainsi, un laboratoire d'expansion pourrait effectuer les expansions des cellules de sang placentaire pour un très vaste territoire (notre objectif primaire, est un délai de 48 H entre la fin de l'expansion et la greffe).

Pour chacune de ces modalités, deux conditions seront testées :

1. Les cellules seront congelées par la procédure standard (PBS avec 4% d'albumine), ou dans le milieu Macopharma HP01 (utilisé pour l'expansion *ex vivo*).
2. Les cellules seront stockées à +4°C en solution d'albumine 4% (préalablement lavées après l'expansion *ex vivo*), ou tout simplement gardées dans le milieu de culture (HP01 avec des cytokines).

Ces expériences (au moins 7 essais par condition) devraient fournir les données permettant :

- a) Soit de conclure et de choisir les conditions appropriées et de les appliquer au travail pratique. Soit d'obtenir les données d'orientation afin de concevoir les nouveaux protocoles de conservation de cellules expansées.

Publications :

1. Duchez P, Chevalyere J, Brunet de la Grange P, Vlaski M, Boiron J-M, Ivanovic Z. Functional Stability (at +4°C) of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Amplified Ex Vivo From Cord Blood CD34+ Cells. Cell Transplantation. 9 août 2013;22(8):1501-6.
2. Duchez P, Chevalyere J, Brunet de la Grange P, Vlaski M, Boiron J-M, Wouters G, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells amplified ex vivo from cord blood CD34+ cells: Cryopreservation of Expanded CB. Transfusion. sept 2013;53(9):2012-9.

Poster

CONSERVATION DES CELLULES DE SANG PLACENTAIRE APRÈS LEUR AMPLIFICATION EX-VIVO



Coordinateur de projet: Zoran Ivanovic
 Participants: Pascale Duchez, Jean Chevalere, B Dazey¹, Marija Vlaski, Jean-Michel Boiron
 Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin, Place Amélie Raba Léon, BP 24, 33035 Bordeaux Cedex

INTRODUCTION

Nous avons développé un protocole clinique d'expansion ex vivo des cellules CD34+ sélectionnées à partir de sang placentaire décongelé. (Hematother & Stem Cell Res, 12:587, 2003). Pour permettre le transport du greffon vers les centres greffeurs éloignés, nous avons étudié différents modes de conservation.



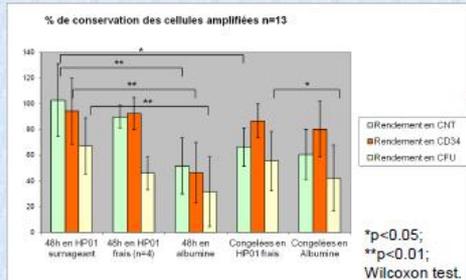
MATERIEL ET METHODE

Les cellules CD34+ issues de sang placentaire décongelé sont amplifiées pendant 12 jours en milieu de culture HP01 Macopharma, enrichi en cytokines (SCF, Flt3, TPO et G-CSF) à 37°C, 5%CO2, 95% H2O (Ivanovic et al Cell Transplant 20: 1453, 2011, Duchez et al, Cell Transplant, en révision). Les cellules obtenues après amplification sont divisées en 4 fractions identiques :

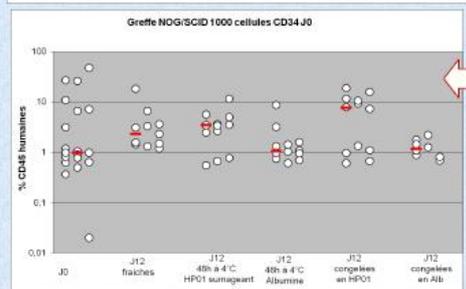
- Deux fractions sont conservées en poche de transfert à +4°C pendant 48 heures, la première dans le surmeuble de culture de l'expansion et la seconde re-suspendue en condition standard : albumine humaine 4%.
- Les deux dernières fractions sont congelées en azote liquide selon le programme de descente en température des cellules souches, l'une en milieu de culture HP01 supplémenté en albumine humaine 4% final et l'autre en albumine humaine 4%, puis décongelées après quelques jours de stockage à -196°C.

Pour comparer ces différents modes de conservation, nous avons analysé les cellules nucléées totales (CNT), les cellules CD34+ et les progéniteurs engagés détectés par le test clonogénique (CFC totales) dans les quatre fractions du greffon. Nous avons également étudié l'activité des cellules souches primitives SRC (Soid Repopulating Cells) par xélogreffe chez la souris NOG-SCID pour ces 4 modes de conservation après amplification. Les souris sont traitées au Busulfan et reçoivent l'équivalent de 1000 cellules CD34+ au temps 0.

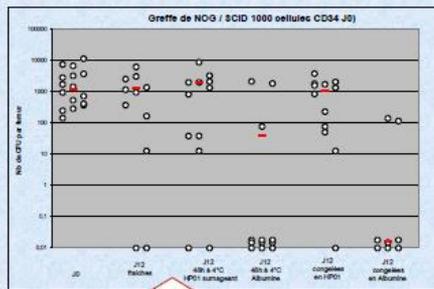
RESULTATS



Le maintien à +4°C de toutes les catégories de cellules à 48 h est très médiocre si les cellules sont gardées en albumine humaine 4% (le rendement de CFU est de 35% seulement). Les cellules après leur amplification ex vivo sont beaucoup mieux maintenues en milieu de culture (HP01 + cytokines : la totalité des CNT et des CD34 et environ 70% de CFU sont maintenues à +4°C à 48 heures. Des rendements similaires sont obtenus avec le milieu HP01 frais dont les cellules sont re-suspendues après lavage. La cryopréservation (congélation, maintien en état congelé pendant au moins 7 jours, décongélation) maintient les cellules CD34+ (aux alentours de 90%) et les progéniteurs engagés (près de 60%). Le fait de congeler les cellules en HP01 a un effet positif sur les progéniteurs engagés (CFU) par rapport à la congélation en albumine (la différence est statistiquement significative).



L'activité des SRC-CD est plutôt bien maintenue à 48 h à +4°C. Cependant, le milieu de culture HP01 présente un avantage en ce qui concerne le taux de chimérisme moyen. La congélation en HP01 maintient la totalité des SRC évalués par les CD45, alors qu'elle est moins efficace si le produit d'expansion est congelé en albumine.



En analysant la présence de progéniteurs humains engagés dans la moelle osseuse des souris 7 à 8 semaines après la greffe, nous avons pu obtenir les informations sur une sous-population SRC (SRC-CFU) un peu plus primitive que SRC-CD. Ainsi, le nombre absolu de ces progéniteurs par fémur reflète l'activité de cette sous-population particulière des SRC. Nos résultats montrent qu'avec HP01, que cela soit à 4°C ou après congélation/décongélation, ces cellules amplifiées ex vivo sont complètement maintenues. Ceci n'est pas le cas en condition « Albumine ».

CONCLUSION

i) le maintien à +4°C en albumine (condition de la routine actuelle) détériore les cellules dans un produit d'expansion. Cette détérioration concerne plus les progéniteurs engagés (CFU), elle est visible au niveau des cellules souches (sous-population SRC-CD) ainsi que sur la sous-population SRC-CFU.

Ce résultat est nettement amélioré si les cellules sont maintenues à +4°C en milieu de culture (HP01). Le taux de préservation des cellules CD34, des progéniteurs engagés (CFU), des SRC-CD ainsi que des SRC-CFU dans cette condition nous semble intéressant pour une application clinique. Au vu du taux d'amplification des progéniteurs clonogéniques et des cellules CD34, les pertes à 48 h pourraient probablement être jugées acceptables pour permettre le transport d'un greffon amplifié jusqu'au centre greffeur dans le monde entier.

ii) qu'un produit d'expansion peut être cryo-préserver (congelé, maintenu en état congelé et décongelé) avec une perte cellulaire acceptable si le processus est effectué en milieu HP01. La procédure standard (en albumine), en dépit des apparences au niveau des cellules CD34, protège moins bien les cellules souches (SRC-CD) et surtout SRC-CFU.

Nous pouvons conclure que l'efficacité du maintien des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques dans un produit d'expansion à partir des cellules CD34 du Sang Placentaire à +4°C et en congélation/décongélation est améliorée en présence de milieu HP01.

Nous considérons que le résultat de ce projet justifie une mise au point pré-clinique « grandeur nature » de ces deux conditions avec HP01. Ce processus devrait optimiser les proportions du volume des réactifs afin d'assurer des rendements stables et intéressants pour une utilisation clinique.

La portée finale de cette mise au point devrait se résumer en deux procédés qui risquent d'avoir un impact majeur sur le déploiement et la généralisation des greffes des cellules hématopoïétiques après leur expansion ex vivo : i) « transportabilité » des greffons amplifiés sans limite de distance; ii) amplification et congélation des greffons pour une utilisation ultérieure.

Effets de la Ciclosporine A dans l'activation cellulaire et la défense des greffons rénaux contre les *Escherichia coli* uropathogènes

Alain VANDEWALLE (INSERM U773, CRB Bichat-Beaujon)

Les pyélonéphrites aiguës (APN) principalement dues aux *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) représentent la principale complication infectieuse des patients transplantés rénaux. Les agents immunosuppresseurs comme la ciclosporine A (CsA), favorisent la survenue des infections, mais leurs effets sur les capacités de réponse inflammatoire des cellules tubulaires rénales cibles des UPECs (i.e. les cellules du tubule collecteur) et la colonisation bactérienne rénale restent encore mal connus. Notre hypothèse est que la CsA induit une altération de l'expression des voies de signalisation dépendante du récepteur Toll-like 4 (TLR4), le récepteur du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négatif. Le but du projet sera d'analyser les effets *in vitro* de concentrations non cytotoxiques (10⁻¹⁰-10⁻⁷M) de CsA sur l'activation de cellules mpkIMCD de tubule collecteur médullaire induite par le LPS et une souche d'UPEC (HT7). Les effets de l'administration chronique de CsA (5 mg/kg pendant 7 jours) seront aussi testés *in vivo* dans un modèle d'APN expérimentale chez des souris, C3H/HeN exprimant TLR4 ou C3H/HeJ présentant une mutation inactivatrice du gène TLR4, infectées par voie transurétrale avec la souche HT7. Les premiers résultats ont montré que la CsA induit une diminution dose-dépendante de l'expression des ARNm de TLR4 associée à une inhibition de l'augmentation induite par le LPS de l'expression des ARNm des cytokines RANTES, MIP-2 et KC. De manière similaire, l'administration prolongée de CsA induit une diminution de l'expression de MIP-2 et KC dans les reins de souris C3H/HeN mais pas des souris C3H/HeJ déficientes en TLR4. Ces expériences seront complétées par l'analyse des effets *in vitro* de la CsA sur 1- la production de RANTES, MIP-2 et KC ainsi que le TNF dans les cellules mpkIMCD, 2- la phosphorylation de la protéine p65 de NF-κB et des MAP kinases ERK1/2, p38 et JNK, et 3- l'analyse transcriptome des cellules traitées par la CsA et stimulées ou non par le LPS et les UPEC. Les conséquences de l'inactivation du facteur de transcription NFAT sur l'expression de TLR4 seront aussi analysées. Ces études seront complétées par l'étude des effets d'un traitement chronique de CsA sur l'expression de TLR4, les charges bactériennes, l'infiltration des neutrophiles et la production de chimiokines dans les reins infectés des souris C3H/HeN. Ces analyses seront aussi réalisées sur des souris C3H chimères exprimant TLR4, soit dans le compartiment parenchymateux, soit dans le compartiment hématopoïétique. Ces études devraient apporter la démonstration que la CsA entraîne une inhibition de la réponse inflammatoire dépendante de TLR4 dans les cellules du tubule collecteur cibles des UPECs. Un tel défaut de réponse immunitaire innée locale pourrait rendre compte, au moins en partie, de la susceptibilité des patients transplantés rénaux aux APN.

Publications :

1. Ben Mkaddem S, Chassin C, Vandewalle A. Contribution of renal tubule epithelial cells in the innate immune response during renal bacterial infections and ischemia-reperfusion injury. *Chang Gung Med J.* juin 2010;33(3):225-40.
2. Bens M, Vimont S, Ben Mkaddem S, Chassin C, Goujon J-M, Balloy V, et al. Flagellin/TLR5 signalling activates renal collecting duct cells and facilitates invasion and cellular translocation of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 1 oct 2014;16(10):1503-17.
3. Chassin C, Tourneur E, Bens M, Vandewalle A. A role for collecting duct epithelial cells in renal antibacterial defences. *Cellular Microbiology.* 1 août 2011;13(8):1107-13.

Evaluation à long terme des patients traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Mohamad MOHTY (Cellule de Promotion de la Recherche Clinique, CHU de Nantes)

Justification. Bien que les patients survivant au-delà de 2 ans après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-SCT), aient une forte probabilité d'être guéris, ils sont toujours exposés à des complications qui pourraient survenir au long cours, incluant notamment les effets délétères de la maladie chronique du greffon contre l'hôte (cGVHD), un dysfonctionnement immunitaire, ou encore les conséquences de la chimiothérapie et/ou radiothérapie reçus dans le conditionnement. Vue l'origine iatrogène de ces complications, le suivi à long terme de ces patients est de la responsabilité de l'équipe de transplantation. Toutefois, des données fiables portant sur les complications au long cours chez des patients allogreffés en France font encore défaut dans ce domaine.

Patients et méthodes. Il s'agit d'une étude non-interventionnelle impliquant le CHU de Nantes et l'Institut Paoli-Calmettes à Marseille. Plus de 300 patients seront inclus. L'objectif est d'analyser les complications à long terme chez des patients qui ont survécu au moins 2 ans après allo-SCT. L'étude concernera les patients ayant: (1) un diagnostic de maladie hématologique (2) allogreffe entre 1996 et 2006, et (3) survie d'au moins 2 ans après allo-SCT. Cette étude sera réalisée à l'aide de questionnaires précédemment validés dans ce domaine. Les questionnaires permettront d'évaluer les effets secondaires tardifs, l'état de santé actuel, l'usage de médicaments, les comportements, une histoire de grossesse après allo-SCT, les indicateurs socio-économiques, les problèmes d'assurance, la qualité de vie, et certains détails spécifiques qui permettront d'évaluer les caractéristiques et la sévérité de la cGVHD, ainsi que son impact fonctionnel. Les participants seront invités par exemple à préciser les limitations qui interfèrent avec leurs activités quotidiennes, et l'impact de ces limitations fonctionnelles sur leur qualité de vie. Les réponses aux questions sont structurées selon le schéma "oui/non/ne sais pas". Une réponse de type «oui», exigerait du patient d'indiquer la date à laquelle la complication est survenue.

Certaines questions utiliseront des échelles pour «quantifier» le degré de la déficience. Les autres informations sur le diagnostic et les caractéristiques de la transplantation seront obtenues à partir des bases de données institutionnelles. Les autres variables socio-démographiques dans l'analyse comprendront l'âge au moment de l'étude, le niveau d'éducation, et le revenu du foyer. Au total, les objectifs qui seront couverts toucheront à plusieurs domaines, notamment: 1) la santé globale du patient, 2) la santé mentale, 3) la déficience fonctionnelle, 4) la limitation d'activité, 5) la douleur, 6) la notion de peur ou d'anxiété, 7) les effets secondaires médicaux comme le diabète, l'hypertension artérielle, les complications cardiovasculaires etc., 8) la qualité de vie, et 9) la cGVHD.

Perspectives. Actuellement, peu de données sont disponibles sur les complications au long cours et la qualité de vie des patients allogreffés en France au cours des 10 dernières années. Les données recueillies dans cette étude permettront de fournir aux investigateurs dans ce domaine, ainsi qu'aux agences de tutelle des informations précises pour mieux comprendre les complications à long terme de l'allo-SCT et donc d'identifier les besoins et les domaines de recherche à développer.

Publications :

1. Mohty B, Mohty M. Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Blood Cancer Journal*. avr 2011;1(4):e16.
2. Mohty M, Apperley JF. Long-Term Physiological Side Effects After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Hematology*. 12 avr 2010;2010(1):229-36.

Induction de cellules dendritiques tolérogènes par le monoxyde de carbone

Ignacio ANEGON (INSERM U643, CHU de Nantes)

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

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

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

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

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

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

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

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

Transplantation de cellules autologues par des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral

Jérôme GUICHEUX (INSERM ADR Grand Ouest)

Le disque intervertébral (DIV) est un tissu fibro-cartilagineux constitué d'un réseau périphérique de fibres de collagène (*Annulus fibrosus* : AF) qui englobe une structure centrale gélatineuse hautement hydratée (*Nucleus pulposus* : NP). Au cours du vieillissement, le DIV est le siège d'une dégénérescence qui s'initie au sein du NP et s'accompagne d'une perte progressive de son rôle dans la cinématique rachidienne. Cette atteinte est à l'origine de la lombalgie qui affecte aujourd'hui une part importante de la population. Dans ce contexte, la réparation du DIV par thérapie cellulaire est aujourd'hui considérée comme une approche cliniquement prometteuse. Ce concept a pour principe le transfert de cellules autologues à l'aide de biomatériaux. Notre laboratoire a ainsi développé un hydrogel auto-réticulant d'hydroxypropylmethyl cellulose silanisée (Si-HPMC). Nous avons démontré que cet hydrogel permettait la culture tridimensionnelle de chondrocytes, la formation de tissu cartilagineux en site sous-cutané chez la souris *nude* et la réparation de défauts cartilagineux articulaires chez le lapin. Aujourd'hui, nous proposons d'étendre ce concept de réparation du cartilage articulaire assistée par des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire du DIV. Le phénotype « chondrocyte-like » des cellules du DIV demeurant encore à ce jour mal compris, nous souhaitons comparer par PCR en temps réel l'expression des principaux marqueurs chondrocytaires dans les cellules du NP, de l'AF et du cartilage articulaire isolées de lapin. Par ailleurs, afin de mieux comprendre les processus moléculaires du vieillissement et de la dégénérescence discale nous analyserons les variations d'expression de ces mêmes marqueurs lors du vieillissement des DIV chez des lapins d'âges croissants (4 semaines à trois ans). Parallèlement, le vieillissement discal sera objectivé à l'aide d'études histomorphométriques (score histologique) et par imagerie de résonance magnétique (IRM). Compte tenu de l'intérêt potentiel des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux en ingénierie des tissus ostéoarticulaires, le comportement (viabilité, phénotype) de ces cellules et de celles isolées du DIV sera également analysé après culture au sein de notre hydrogel. Le développement d'un modèle de vieillissement et de dégénérescence discale permettra finalement de tester dans un modèle animal pertinent (lapin) notre concept de transplantation de cellules souches mésenchymateuses autologues par un biomatériau injectable pour le traitement des lésions discales. En cas de succès, l'ensemble de ces données nous permettra d'envisager les premiers essais cliniques. L'ingénierie tissulaire par transplantation de cellules à l'aide de biomatériaux pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles fenêtres thérapeutiques dans le traitement et la prévention de la lombalgie d'origine discale.

Publications :

1. Clouet J, Pot-Vaucel M, Grimandi G, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, et al. Characterization of the age-dependent intervertebral disc changes in rabbit by correlation between MRI, histology and gene expression. *BMC musculoskeletal disorders*. 2011;12(1):147.
2. Lucas O, Hamel O, Blanchais A, Lesoeur J, Abadie J, Fellah BH, et al. Laser-treated Nucleus pulposus as an innovative model of intervertebral disc degeneration. *Exp Biol Med (Maywood)*. nov 2012;237(11):1359-67.

Transplantation de cellules autologues par des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral.
Autologous cell transplantation with biomaterials for intervertebral disc tissue engineering.



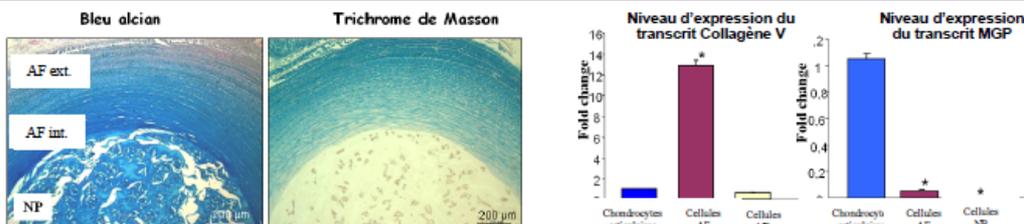
Porteur du projet : Jérôme Guicheux (jerome.guicheux@inserm.fr)
INSERM U791-LIOAD, Groupe STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology", Nantes.
Université de Nantes.



INTRODUCTION

Le laboratoire INSERM U791-LIOAD propose de développer un concept d'ingénierie tissulaire du Nucleus pulposus (NP) basé sur la transplantation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) véhiculées au sein d'un polymère injectable auto-durcissant *in situ* (Clouet et al. DDT, 2009). Ce nouveau concept pourrait présenter plusieurs avantages : l'emploi de techniques chirurgicales mini-invasives, le maintien des cellules sur le site d'implantation par l'auto-réticulation du polymère, la création d'un réseau tridimensionnel nécessaire à la croissance des cellules, l'obtention d'un couple matrice-cellules aux caractéristiques rhéologiques proches de la matrice extra-cellulaire (MEC) native du NP (Clouet et al. Joint Bone Spine, 2008). Trois étapes principales ont été suivies (l'analyse rhéologique du DIV, la définition du potentiel souche des cellules du DIV et le comportement des cellules au sein de l'hydrogel ne seront pas traités dans un souci de compréhension générale).

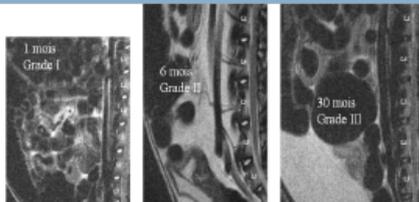
ETAPE 1 : CARACTERISATION CELLULAIRE ET TISSULAIRE DU DISQUE INTERVERTEBRAL DE LAPIN



Le disque intervertébral : un tissu proche du cartilage articulaire avec une MEC riche en protéoglycanes et en collagène. Des cellules qui présentent néanmoins des caractéristiques phénotypiques non-superposables au phénotype des chondrocytes articulaires (Clouet et al. Rheumatology, 2009).

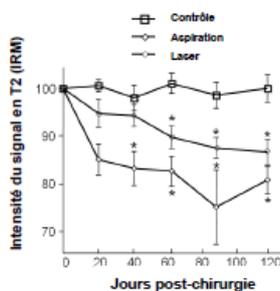
ETAPE 2 : MODELE ANIMAL DE DEGENERESCENCE DISCALE

MODELE SPONTANE DE VIEILLISSEMENT DU DIV



L'analyse histologique, phénotypique et par IRM démontre l'existence d'un processus de vieillissement spontané du DIV chez le lapin en de nombreux points similaires à l'homme (Clouet et al. BMC Musculoskeletal Disorders, 2011).

MODELE INDUIT DE DEGENERESCENCE DU DIV (LASER)



Une méthode innovante d'induction de la dégénérescence discale a été évaluée. Celle-ci, basée sur l'utilisation d'une source laser, montre un processus d'installation progressive de dégénérescence du DIV par IRM, radiographie et histologie. Ce processus apparaît superposable aux observations faites chez l'homme (Lucas et al. Tissue Eng Part C, Soumis).

ETAPE 3 : EVALUATION DE LA FAISABILITE DE L'INJECTION DU SUBSTITUT HYDROGEL-CELLULES



La faisabilité de l'injection de notre polymère associé à du sulfate de baryum a été démontrée par analyse tomodynamométrique. En parallèle, notre capacité de suivi de l'injection de cellules bio-luminescentes a été validée.

La preuve de faisabilité du concept est donc faite. Une étude pilote d'injection du substitut hydrogel-cellules est envisagée dans les prochains mois.

DISCUSSION-CONCLUSION

L'amélioration de nos connaissances autour de la physiopathologie discale permet d'envisager de futures investigations relatives à la différenciation nucléopulpogénique des CSM. Le développement de deux modèles animaux de dégénérescence discale (spontané et induit) a constitué un pré-requis indispensable avant la mise en œuvre d'essais pré-cliniques. L'étude pilote menée dans ce travail a montré des résultats encourageants. D'ores et déjà le développement d'outils d'imagerie qui permettront de démontrer l'efficacité d'une telle approche est en cours. Tous ces résultats s'inscrivent dans un projet global de médecine régénératrice appliquée au DIV auquel l'Agence de Biomédecine a contribué depuis deux ans.

Dépistage précoce non invasif de la néphropathie chronique du greffon rénal par suivi longitudinal des ARN urinaires

Dany ANGLICHEAU (INSERM ADR Paris 5)

Introduction : L'étude de l'expression des ARN messagers (ARNm) des cellules urinaires des transplantés rénaux est en plein essor, comme *outil non invasif* de remplacement de la procédure de référence qu'est la biopsie. Ces techniques ont surtout été appliquées pour prédire le rejet aigu (Anglicheau D & Suthanthiran M. *Transplantation* 2008). Cependant, en transplantation rénale, l'apparition progressive d'une fibrose du greffon, la néphropathie chronique du transplant (NCT), secondaire à divers facteurs immuns, hémodynamiques ou toxiques, demeure la principale cause de perte de greffon à long terme. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est impliquée dans ce phénomène. Par analyse immunohistochimique, nous avons précédemment montré que des altérations épithéliales tubulaires suggestives de TEM dans des biopsies de greffons rénaux à 3 mois post-greffe prédisaient la progression vers la fibrose entre 3 mois et 1 an post-greffe (Hertig A et al. *J Am Soc Nephrol* 2008). Nous avons également montré que la ciclosporine était responsable de TEM des cellules tubulaires humaines (Pallet N et al. *Am J Transplant* 2008).

Objectifs : Les objectifs de ce projet sont de démontrer que l'étude de l'expression urinaire d'ARNm impliqués dans la TEM et la fibrogénèse constitue (i) un outil de diagnostic non invasif de l'existence de lésions de NCT, (ii) un outil prédictif de la progression vers la fibrose interstitielle du greffon au cours de la première année et (iii) un outil prédictif de la fonction du greffon rénal à long terme.

Résultats attendus : Le développement de biomarqueurs précoces prédictifs, diagnostiques ou pronostiques de NCT comporte un intérêt majeur, puisqu'il pourrait conduire à optimiser et individualiser le traitement immunosuppresseur. Nous prédisons de définir un *outil non invasif diagnostique* (le profil d'expression des ARNm urinaires évalué au moment d'une biopsie de dépistage diagnostiqueront de façon non invasive des lésions de NCT) *et prédictif de la NCT* (les profils d'expression des ARNm urinaires prélevés séquentiellement au cours de la première année de greffe prédiront de façon non invasive la progression de la NCT entre 3 mois et 1 an post-greffe et la fonction ultérieure du greffon).

Méthodologie : Les patients éligibles sont tous les receveurs adultes d'un greffon rénal transplantés dans le service de Transplantation rénale adulte de l'Hôpital Necker pendant 1 an. Dans ce centre, des biopsies de greffons sont systématiquement réalisées à 3 mois et 1 an post-transplantation et une évaluation du débit de filtration glomérulaire est effectuée à 1 an et 3 ans. Un prélèvement urinaire sera obtenu à 3, 6, 9 et 12 mois post-greffe en vue d'une extraction d'ARN. Une étape de pré-amplification permettra la quantification par PCR quantitative de 21 ARNm impliqués dans la TEM et la fibrogénèse. La fibrose du greffon rénal sera quantifiée sur les biopsies effectuées à 3 mois et à 1 an post-greffe par analyse d'image.

Impact du polymorphisme génétique sur l'expression endothéliale des molécules MICA et conséquences en Transplantation rénale

Béatrice CHARREAU (ITERT)

Bien que la fréquence de l'immunisation anti-MICA et son implication dans le rejet de greffe aient été montrées par plusieurs études cliniques, les conditions de cette alloimmunisation demeurent mal connues. Par ailleurs, le génotypage de MICA n'est pas réalisé en routine et peu d'informations sont à l'heure actuelle disponibles pour détecter un éventuel mismatch entre donneur et receveur avant la greffe ni prédire une alloimmunisation spécifique de MICA.

Dans ce contexte l'objectif principal de notre projet est de déterminer le polymorphisme génétique de MICA dans une cohorte de patients transplantés rénaux pour lesquels nous possédons des cellules endothéliales issues du donneur afin d'identifier les bases de l'alloimmunisation spécifique de MICA. La collection de cellules endothéliales issues des donneurs d'organes (n=65 à ce jour) qui est développée dans notre équipe est un outil unique pour réaliser une corrélation génotype/phénotype et un suivi post greffe de l'alloréactivité humorale spécifique du donneur et de l'endothélium en Transplantation rénale. Les objectifs secondaires seront (1) de déterminer la fréquence dans notre cohorte et (2) de caractériser 2 polymorphismes de MICA (A5.1 et Met/Val129) modifiant l'expression (A5.1) et la fonction (variants Met/Met129) des molécules MICA. Cette caractérisation utilisera notre collection de cellules endothéliales et elle comportera une analyse du phénotype par cytométrie de flux, western blot et microscopie confocale associée à une analyse fonctionnelle des molécules MICA sur l'activation du récepteur NKG2D.

Il n'existe à ce jour aucun test prédictif des épisodes de rejet aigu, de dysfonction chronique du greffon, ou d'évaluation de la cinétique de dégradation de la fonction du greffon. A terme, une meilleure connaissance des molécules MICA de leur polymorphisme génétique et phénotypique à leur rôle dans l'alloimmunisation et le rejet permettra de développer de nouveaux tests de screening pré-greffe et de suivi des patients transplantés.

Publication :

Allard M, Tonnerre P, Nedellec S, Oger R, Morice A, Guilloux Y, et al. HLA-E-Restricted Cross-Recognition of Allogeneic Endothelial Cells by CMV-Associated CD8 T Cells: A Potential Risk Factor following Transplantation. Boussiotis VA, éditeur. PLoS ONE. 30 nov 2012;7(11):e50951.

Nouveau dispositif de modulation du débit portal pour la prévention du syndrome « small for size »

Eric VIBERT (INSERM U785, hôpital Paul Brousse)

L'hyperdébit portal est la cause du syndrome de « small-for-size » qui bloque la régénération hépatique après transplantation d'un foie réduit, à partir d'un donneur vivant ou d'un foie cadavérique partagé. Après transplantation d'un petit foie chez le porc, le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'un anneau périportal gonflable par voie sous-cutanée pour moduler le débit portal afin d'améliorer la régénération hépatique. La première étape du projet est une étude de faisabilité de la mise en place de l'anneau et de la modulation du débit portal en fonction du degré de remplissage de l'anneau sur le foie natif entier du porcelet. Lors de la deuxième étape de l'étude on va tester l'utilisation de l'anneau péri-portal dans un modèle porcin de transplantation de foie réduit. Le lobe latéral gauche du foie (qui représente 20-25% du volume hépatique total) sera transplanté chez 14 porcelets repartis en deux groupes : un groupe contrôle et le groupe traité qui aura en plus une modulation du débit portal à l'aide de l'anneau péri-portal. Le débit portal sera modulé initialement à moins de 250 ml/min/100 g de tissu hépatique pendant les premières 12h après la transplantation, puis l'anneau sera desserré progressivement pour laisser le débit portal libre au bout de 48h.

Après sacrifice les paramètres évalués seront la survie à 7 jours dans les deux groupes, l'hypertrophie hépatique et splénique et les marqueurs biologiques du syndrome « small-for-size » : l'élévation de la bilirubine et la baisse du taux de prothrombine. On réalisera des études complémentaires d'immunohistochimie pour évaluer la prolifération hépatocytaire (incorporation de 5-Bromodéoxyuridase) et l'apoptose (caspase 3 clivée). Avec la modulation précoce du débit portal, on espère démontrer un bénéfice de survie à 7 jours et une meilleure fonction hépatique par une amélioration de la régénération hépatocytaire dans le petit foie transplanté.

Publication :

Bucur PO, Bekheit M, Audebert C, Othman A, Hammad S, Sebah M, et al. Modulating Portal Hemodynamics With Vascular Ring Allows Efficient Regeneration After Partial Hepatectomy in a Porcine Model. *Ann Surg.* 1 févr 2017;

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Réduction du calibre de la veine porte par un anneau réglable dans le traitement de l'insuffisance hépatique après résection: étude expérimentale chez le porc
P. BUCUR, E. VIBERT, B. DECANTE, C. RADULESCU, D. CASTAING

Étudier l'efficacité de la modulation du débit portal à l'aide de l'anneau portal pour améliorer la fonction et la régénération hépatique après hépatectomie majeure chez le porc
Objectifs

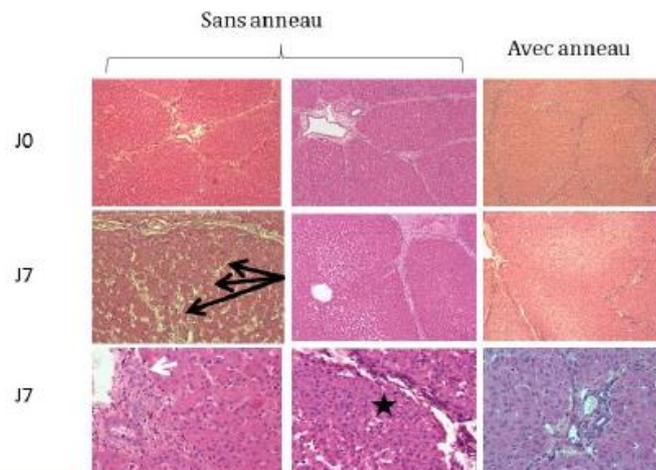
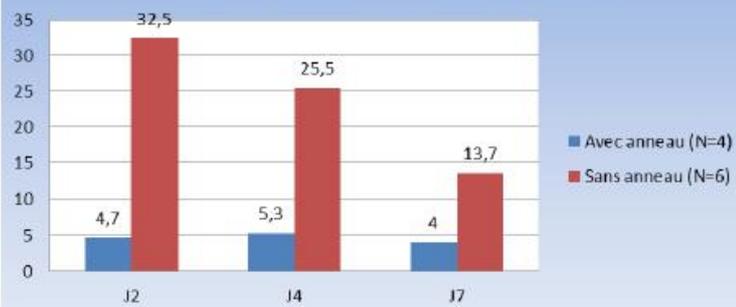
Méthodes



14 animaux ont subi une hépatectomie de 75%, Les animaux ont été repartis en deux groupes, un avec modulation portale par anneau ajustable et l'autre sans MDP. Les animaux ont été surveillé pendant 7 jours. Les bilans biologiques ont été effectué à J0, J2, J4 et J7. Les mesures hémodynamiques et les biopsies ont été effectuées lors de l'hépatectomie et lors du sacrifice

Résultats

Bilirubine totale en postopératoire



conclusions

La modulation du débit portal à l'aide d'un anneau ajustable après hépatectomie 75% améliore la fonction hépatique et s'accompagne d'une conservation de l'architecture du lobule hépatique

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

LE MAUFF Brigitte / Gilles BLANCHO (ITERT)

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

Publication :

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

Production de lymphocytes T anti-adénovirus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSh : protocole clinique

Danièle BENSOUSSAN (CHU Nancy)

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH), s'accompagne d'un déficit immunitaire cellulaire et humoral plus ou moins prolongé. Cette immunodépression est à l'origine d'un grand nombre d'infections. Parmi celles-ci, les infections virales et en particulier celles dues à l'adénovirus (ADV) constituent un défi particulièrement important, peu de molécules étant actives à leur rencontre en l'absence de reconstitution immunitaire. L'incidence des infections à ADV varie de 5 à 21% chez les adultes et de 20 à 80 % chez les enfants. La mortalité peut atteindre 60 voire 73%. Les traitements antiviraux comme le cidofovir, molécule anti-virale à large spectre la plus largement utilisée, semblent présenter une efficacité relative lorsque le patient ne présente pas d'immunité spécifique anti-ADV. De plus, leurs toxicités (notamment rénale) rendent leur utilisation difficile.

En l'absence d'efficacité du Cidofovir, aucune alternative thérapeutique ne peut être proposée à ce jour face à une charge virale ADV augmentée et en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique, ce qui peut conduire au décès du patient. C'est pourquoi, nous souhaitons initier la production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV (CTL anti-ADV) à partir de cellules du donneur (leukaphérèse) à l'aide d'une technique rapide de grade clinique (Cytokine Capture System de Miltenyi) afin de proposer une alternative thérapeutique aux patients en échec de traitement par Cidofovir. Le principe de production des CTL anti-ADV repose sur le recueil de cellules mononucléées du donneur de CSH, préalablement testées pour leur réponse cellulaire anti-ADV. Ces cellules sont stimulées par un pool de peptides de la protéine Hexon de l'ADV5 (Peptivator-ADV5, Miltenyi Biotec, Allemagne) pendant 6 heures. Les cellules sécrétant de l'IFN γ sont ensuite sélectionnées sur CliniMACS en utilisant le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Les CTL anti-ADV après isolement sont prêtes à être réinjectées. Une fraction est amplifiée *in vitro* en présence d'IL2 et de cellules de la fraction négative irradiée, afin de réaliser des contrôles qualité fonctionnels (en moyenne 2 Log d'amplification après 1 semaine de culture). Nous contrôlons par dosage de cytokines intracellulaires qu'après restimulation par le Peptivator ADV les CTL sécrètent de l'IFN γ . Un test de cytotoxicité contre des cellules cibles autologues chargées ou non avec du lysat viral d'ADV2 ou d'ADV5 est réalisé. Une culture mixte lymphocytaire permet de mesurer l'alloréactivité résiduelle des CTL vis-à-vis des PBMC du receveur.

Nous proposons un protocole pilote oligocentrique sous l'égide de la SFGM-TC et notamment du groupe pédiatrique, ayant pour objectif d'inclure 12 à 16 patients sur une durée maximale de 2 ans, présentant une infection à adénovirus en échec de traitement par Cidofovir, après une allogreffe de CSH génodentique ou non apparentée 9/10 ou 10/10ème identique et chez lesquels l'immunité spécifique antiADV n'est pas reconstituée.

Publication :

Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, Jeulin H, Salmon A, Clement L, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. J Immunother. mai 2010;33(4):414-24.

Poster

Appel d'Offres « Recherche et greffe »



Production de lymphocytes T anti-adénovirus pour Immunothérapie adoptive après allogreffe de CSH : Protocole clinique CTL anti-ADV

Appel d'Offre Recherche et Greffe 2009
Coordinateur : Pr D. BENSOUSSAN, UTCT, CHU de Nancy

Présentation du Protocole Clinique

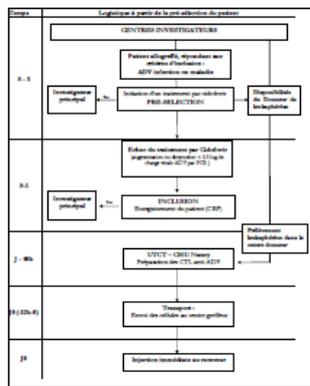
Nombre de patients à inclure : 12

Ouverture du protocole : Mars 2012

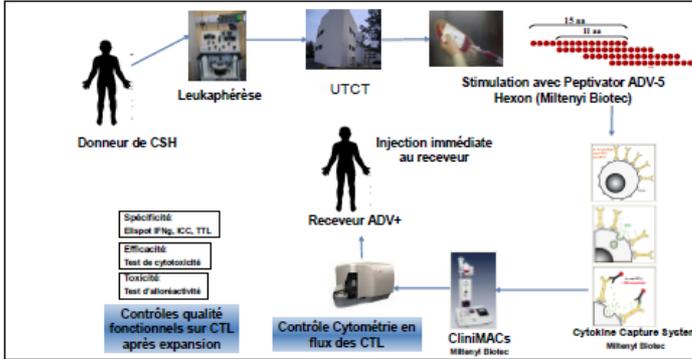
Fin des inclusions : Septembre 2013

<p>ETUDE PILOTE PHASE I/II multicentrique</p> <p><i>Sous l'égide de la SFGM-TC</i></p> <p>Promoteur : CHU de Nancy</p> <p>Investigateur principal : Dr L. CLEMENT</p> <p>Centres investigateurs associés : Besançon, Strasbourg, Lille, Rouen, Rennes, Nantes, Marseille, Montpellier, Clermont Ferrand, Bordeaux.</p> <p>Investigateurs Biologiques : UTCT, Plateforme Nancytomique, Laboratoires de Virologie</p> 	<p>OBJECTIFS DE L'ETUDE</p> <p>Principal :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de GvH > II ou GvH chronique extensive - Absence de réactivation ou d'aggravation d'une GvH à 1 mois <p>Secondaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evolution Charge ADV - Evolution Reconstitution Immunitaire spécifique anti-ADV 	<p>CRITERES D'INCLUSION</p> <ul style="list-style-type: none"> - Allogreffes génoidentiques ou MUD (9 ou 10/10). - Adénovirose infection ou maladie en échec après un traitement par cidofovir - Toxicité rénale ou intolérance majeure - Non disponibilité du Cidofovir - GvH aiguë ou GvH chronique à forme aiguë < II, - GvH chronique contrôlée.
--	---	--

Schéma de traitement



Procédure de production des CTLs

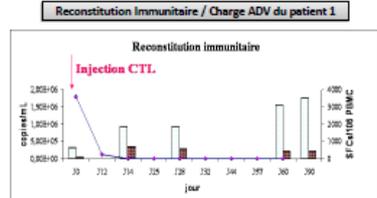


Résultats

Nombre de patients pré-inclus : 8
Nombre de patients inclus : 2
Nombre de patients traités : 1

Résultats des 2 Productions

N°	Avant traitement					Après traitement					
	CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4/FIg (%)	CD8 (%)	CD8/FIg (%)	CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4/FIg (%)	CD8 (%)	CD8/FIg (%)	Viabilité (%)
1	713	29,59	0,14	18,83	0,34	7,56	0,76	58,97	0,68	9,32	65,48
2	906	32,34	0,12	23,45	0,1	22	7,05	29,57	2,65	22,04	31,33



Conclusions et Perspectives

Un patient traité : avec efficacité clinique des CTL anti-ADV.
Efficacité des CTL anti-viraux d'autant plus importante que la charge virale n'est pas trop élevée
Problème : Taux de recrutement des patients Faible

Remerciements aux organismes ayant apporté leur soutien financier

Journées de l'Agence
30-31 mai 2013
Contact: d.bensoussan@chu-nancy.fr

La perfusion oxygénée du greffon : évaluation, limitations, perspectives

Raphaël THUILLIER (INSERM ADR Bordeaux)

Actuellement, les demandes de greffes excèdent les dons, et les listes d'attente s'allongent, posant un réel problème pour les équipes de transplantation en termes de santé publique. Pour y remédier, des greffons de plus en plus marginaux sont transplantés, dont la susceptibilité aux lésions d'ischémie reperfusion (IR) est majorée. Ces lésions, en grande partie liées à la conservation, influencent le devenir à court et long terme du greffon et majorent le risque de rejet aigu. Les organes provenant de donneurs décédés après arrêt cardiaque pourraient être utilisés. Ces greffons sont exposés à une période d'ischémie chaude avant la conservation, majorant le risque de reprise différée et de non-fonction primaire. Dans ce contexte, il apparaît important de disposer de moyens de conservation plus adéquats. Des données récentes mettent en avant l'intérêt de l'oxygénation pendant la conservation ainsi que celui d'une perfusion sub-normothermique. Nous proposons de perfuser les organes avec une solution oxygénée pendant la conservation à l'aide d'une machine conceptualisée par notre partenaire. Le but de ce projet est de minimiser les lésions d'IR, et par le fait améliorer la qualité du greffon transplanté. Cette étude a un impact direct sur la santé : comme les lésions d'IR sont liées à la survie et le comportement du greffon, le contrôle de ces phénomènes lésionnels peut éviter la perte du greffon et donc directement affecter le bien être du patient. Ce projet utilise un modèle d'étude de transplantation rénale chez le porc *Large White*, qui présente une proximité intéressante avec l'homme en termes de physiologie rénale et d'un point de vue anatomique. De plus, ce modèle permet la mise en place de protocoles proches de la clinique. En effet, l'utilisation de machines de perfusion destinées initialement à un usage chez l'homme, peuvent être évaluées tel quel dans ce modèle, permettant une extrapolation rapide des résultats du laboratoire vers la clinique. Les outils mis en œuvre permettront une étude fonctionnelle complétée par une approche histologique ainsi qu'une analyse génomique et protéomique.

Notre objectif est de vérifier le concept permettant d'obtenir une amélioration substantielle de la qualité des greffons, par rapport aux méthodes actuelles.

Publication :

Thuillier R, Allain G, Celhay O, Hebrard W, Barrou B, Badet L, et al. Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors. *Journal of Surgical Research*. oct 2013;184(2):1174-81.

Développement de l'autogreffe intramusculaire d'îlots pancréatiques dans un modèle pré-clinique chez les patients pancréatectomisés pour TIPMP

François PATTOU (Inserm U859 « Thérapie Cellulaire du Diabète » - Faculté de Médecine)

Introduction : La greffe intraportale d'îlots permet la normalisation prolongée de l'équilibre glycémique chez les patients atteints de diabète de type 1 sévère. D'autres patients devenus diabétiques après une pancréatectomie totale pour TIPMP (Tumeur Intra-canalair Papillaire et Mucineuse de Pancréas) pourraient également bénéficier de ce traitement. L'absence de maladie auto-immune et la possibilité de recourir à l'autogreffe permettraient de s'affranchir des complications de l'immunosuppression dans cette indication. Etant donné la nature pré-néoplasique de ces tumeurs, il paraît indispensable de proposer un site d'implantation dans lequel le greffon puisse être plus facilement surveillé et retiré. Déjà couramment utilisé en clinique lors d'autogreffe de parathyroïde, le site intramusculaire paraît ici particulièrement séduisant.

But du travail : Ce projet est un pré-requis à l'application clinique de l'autogreffe intramusculaire d'îlots chez les patients pancréatectomisés pour TIPMP.

Méthodes : Nous confirmerons la survie et la fonction des îlots humains greffés en intramusculaire en l'absence de réaction immunitaire spécifique chez le Rat immunoincompétent.

Nous confirmerons ces résultats et l'absence de prolifération tumorale avec des îlots provenant de patients atteints de TIPMP.

Enfin, nous validerons la stratégie envisagée chez l'homme en confirmant la prévention du diabète lors d'une autogreffe intramusculaire d'îlots chez le Miniporc pancréatectomisé.

Résultats attendus : Ce projet nous permettra de proposer une stratégie nouvelle pour le traitement chirurgical des TIPMP, basé sur la pancréatectomie totale avec prévention du diabète par autogreffe des îlots. Cette approche pourrait également constituer une alternative de choix car moins invasive, pour la greffe d'îlots chez les patients atteints de diabète de type 1.

Publication :

Pattou F, Kerr-Conte J, Wild D. GLP-1–receptor scanning for imaging of human beta cells transplanted in muscle. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(13):1289–1290.

Approche de repeuplement sélectif du foie par transfert de gène dans le cadre de la maladie Crigler-Najjar

Jean-Emmanuel GUIDOTTI (INSERM ADR PARIS V Sainte-Anne)

La transplantation hépatique est une stratégie thérapeutique lourde qui s'accompagne d'un traitement immunosuppresseur à vie. C'est la seule thérapie curative proposée pour le traitement de certaines maladies hépatiques acquises, comme la cirrhose virale ou métabolique, ou génétiques. Cependant, à l'heure actuelle, le nombre de patients en attente de greffe ne cesse d'augmenter contrairement à celui des donneurs. Ceci se traduit par le décès de plus de 15% des personnes inscrites sur liste d'attente. Ainsi, des stratégies alternatives sont développées pour pallier ces problèmes. L'une des plus prometteuses est la transplantation d'hépatocytes isolés. Des premiers essais chez l'homme ont démontré l'innocuité de cette approche et les résultats publiés sont encourageants. Cependant, cette stratégie souffre en premier lieu du trop faible nombre d'hépatocytes thérapeutiques implantés dans le foie receveur et, secondairement, des conséquences délétères communes à la transplantation hépatique de l'allogreffe.

Afin d'augmenter la proportion de ces cellules dans le foie, nous avons développé des stratégies de repopulation hépatique sélective, basées sur le concept d'avantage de survie ou de prolifération des hépatocytes transplantés par rapport aux hépatocytes résidents. En conférant un avantage de survie, nous avons montré (1) la possibilité de repeupler un foie normal murin à plus de 80%, (2) la valeur thérapeutique de cette approche. Plus récemment, nous avons montré dans un modèle murin d'agression chronique du foie, que les hépatocytes qui surexpriment FoxM1B, un accélérateur du cycle cellulaire, ont une capacité de repeuplement du foie supérieure à celle d'hépatocytes 'sauvages'. Toutefois, ces stratégies soit ne sont pas compatibles avec une application clinique, soit sont applicables au traitement des seules rares maladies métaboliques qui présentent une cytolysse hépatocyttaire.

Par ailleurs, pour s'affranchir des problèmes liés à l'allogreffe, il est possible de modifier *ex-vivo* les hépatocytes du patient avant de les transplanter. En utilisant des vecteurs dérivés du virus VIH, nous avons développé une stratégie novatrice qui permet de transduire les hépatocytes fraîchement isolés en suspension, avec une très grande efficacité sans altération ni de leur viabilité ni de leur fonctionnalité. Ainsi, notre but est de développer une approche pharmacologique qui permette d'obtenir une repopulation sélective du foie applicable aux patients dont le foie ne présente pas d'agression chronique et ce, en modifiant *ex vivo* les hépatocytes du patient préalablement à leur transplantation. Pour cela, nous utiliserons une drogue, le Somavert®, déjà utilisée en clinique, susceptible d'inhiber la prolifération des hépatocytes résidents et à laquelle les hépatocytes transplantés surexprimant FoxM1B sont insensibles. Nous testerons la valeur thérapeutique de cette approche chez le rat Gunn, modèle animal de la maladie de Crigler-Najjar de type 1, prototype des maladies métaboliques du foie dans des conditions de greffe autologue (transduction d'hépatocytes syngéniques apportant l'expression à long terme du transgène correcteur et l'expression restreinte du transgène de sélection à la seule phase de prolifération hépatique).

Ce projet vise donc à poser les bases d'un protocole préclinique sur le rongeur d'une approche de repopulation sélective du foie afin de proposer une stratégie alternative efficace à la transplantation hépatique allogénique pour le traitement des maladies métaboliques du foie.

Publication :

Collin de l'Hortet A, Gilgenkrantz H, Guidotti J-E. EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *Int J Hepatol.* 2012 476910.

Identification et évaluation préclinique d'une population circulante de progéniteurs de microglie

Nathalie CARTIER-LACAVE

Résumé du projet (*maximum 3000 caractères*) (objectifs, résultats attendus, méthodologie)

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) permet de corriger certaines maladies neurodégénératives du SNC comme l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD), grâce au remplacement de la microglie déficiente par une microglie normale dérivant des CSH greffées. Ce remplacement est un processus lent, limité par le passage, à travers la barrière hémato-cérébrale (BHC), des précurseurs médullaires. La cellule circulante issue de la moelle osseuse capable de migrer à travers la BHC n'est pas clairement identifiée.

Notre objectif final est d'améliorer l'efficacité de la greffe de CSH (allogreffe ou autogreffe de CSH corrigées). Pour cela, il est crucial d'identifier une population de cellules issues de la moelle osseuse capable de migrer plus efficacement dans le SNC et dont l'amplification *ex vivo* pourrait permettre l'infusion d'un grand nombre de cellules, potentiellement répétée pour en optimiser l'efficacité.

Le but de ce projet est de :

- 1) Caractériser la population progénitrice de microglie dérivée des CSH murines et humaines, leur capacité de différenciation microgliale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de maladie cérébrale comportant une neuroinflammation et une démyélinisation, la souris Saposine, et les facteurs qui favorisent leur migration.**
- 2) Démontrer dans la modèle murin (souris saposine) que cette population amplifiée et éventuellement génétiquement modifiée peut être utilisée dans un but thérapeutique, comme alternative à la greffe de CSH classique, dans des maladies neuroinflammatoires du système nerveux central (SNC)**

Des données récentes ont permis de mieux cerner les caractéristiques des cellules précurseurs de microglie et les conditions de leur migration.

- Une sous-population de cellules CD34+/B220 a été identifiée chez la souris. Ces cellules sont capables de se différencier en microglie *in vitro* en condition neuro-inflammatoire, et leur amplification est retrouvée *in vivo* dans le modèle d'encéphalite expérimentale (EAE).
- Le rôle de CCR2 dans le recrutement des cellules circulantes vers le SNC et la différenciation microgliale de précurseurs Ly-6C CCR2+ a été démontré chez la souris.
- Nous avons enfin montré *in vitro* que les cellules CD34+ humaines ne passent la BHC qu'en présence de CCL2 et CCL4.

Nous allons :

- 1) quantifier la fraction CD34+CCR2+ dans la population CD34+ humaine.
- 2) évaluer la capacité de différenciation microgliale des cellules CD34+CCR2+ *in vitro* (collaboration avec Michel Mallat, INSERM UMR U711).
- 3) Analyser la cinétique de migration de la population progénitrice de microglie ainsi caractérisée en présence de différentes chimiokines (CCL2, CXCL4 en particulier).
- 4) Tester la possibilité d'amplifier cette sous-population en présence de cytokines (SCF, FLT3L, G-CSF, TPO, M-CSF).
- 5) évaluer la capacité de ces progéniteurs circulants à renouveler la microglie *in vivo* chez la souris normale et dans un modèle de maladie neurodégénérative comportant une démyélinisation et une neuroinflammation, la souris saposine (modèle de maladie de Krabbe). Nous mesurerons le *turn-over* de la microglie *in vivo* chez la souris après injection IV de cette population de progéniteurs circulants. Cette injection sera associée à un conditionnement (irradiation létale) et à une greffe de CSH. Le marquage différentiel des cellules (protéines fluorescentes) permettra de suivre *in vivo* leur devenir dans le SNC et en périphérie après greffe. Les conséquences de leur greffe sur le phénotype clinique et neuropathologique de la souris saposine seront analysées.

Publication :

Cartier N, Lewis C-A, Zhang R, Rossi FMV. The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? *Acta Neuropathologica*. sept 2014;128(3):363-80.

Prévention du rejet d'allogreffe rénale : Rôle du système IL-15/IL-15R dans l'homéostasie des cellules épithéliales rénales

Bruno AZZARONE (INSERM Paris XI)

Au cours du rejet d'allogreffe rénal, l'IL-15 sécrétée par les cellules de l'épithélium tubulaire rénal (CET) agit comme un facteur clé impliqué dans le rejet aiguë et chronique. Elle représente donc une cible prioritaire à inhiber afin d'éviter le rejet. Cependant, ces études considèrent uniquement l'action de l'IL-15 sous sa forme soluble et négligent l'implication d'autres formes fonctionnelles de la cytokine et de son récepteur (formes membranaires et soluble liée à l'IL-15R α (hyper-IL-15) considérées comme les formes physiologiquement dominantes de la cytokine. En effet, alors que les cultures primaires de CET, dérivées d'un rein normal, ne sécrètent pas d'IL-15R α soluble et expriment une IL-15 membranaire retenue par la chaîne IL-15R $\alpha\beta$ (IL-15mb type 1), nos études montrent que les CET primaires péricancéreuses sécrètent l'IL-15R α soluble et expriment une IL-15mb indépendante du récepteur de l'IL-15 (type 2). Cette dernière est capable, après stimulation par de l'IL-15R $\alpha\beta$ soluble, d'activer une rétrosignalisation responsable de l'induction de la *trans*-différenciation épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Nous proposons que les changements du microenvironnement tissulaire rénal et plus particulièrement le développement d'un état d'hypoxie pourrait moduler le système IL-15/IL-15R et permettre notamment la transition d'une IL-15mb de type 1 vers une forme de type 2. En effet, chez la souris s'établit *in vivo* lors de la phase d'ischémie-reperfusion un état d'hypoxie du greffon responsable sur les CET de l'expression du Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) dont l'activation (voie MyD88) induit une production disproportionnée de cytokines proinflammatoires comme l'IL-15. De plus, l'activation du TLR-4 induit dans les monocytes humains le recrutement rapide à la surface d'IL-15mb de type 2 suggérant que l'hypoxie pourrait être associée à l'expression de cette forme d'IL-15mb.

Pour vérifier cette hypothèse, nous adapterons des cultures primaires de CET à un état d'hypoxie permanent en utilisant une enceinte spécifique garantissant un niveau d'hypoxie constant. Nous évaluerons si ce traitement induit: A) l'expression du TLR-4, B) l'expression d'IL-15mb de type 2 et les effets induits en réponse à l'IL-15R $\alpha\beta$ soluble, C) l'activation des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 conduisant à la sécrétion de différentes formes d'IL-15 et de son récepteur qui pourraient modifier l'environnement immunitaire. Les effets de l'IL-15mb et de l'hyper-IL-15 sur les populations immunitaires impliquées dans le rejet d'allogreffe seront ensuite analysés. Enfin, nous chercherons :1) à identifier les partenaires d'ancrage et de signalisation associés à l'IL-15mb par des expériences de coimmunoprécipitations, couplées à des analyses par spectrométrie de masse et du phosphoprotéome, 2) à corrélérer à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, ces voies de signalisation aux différentes fonctions dépendantes de l'IL-15mb, dans le but de définir de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement du rejet.

Publications :

1. Azzi S, Bruno S, Giron-Michel J, Clay D, Devocelle A, Croce M, et al. Differentiation Therapy: Targeting Human Renal Cancer Stem Cells with Interleukin 15. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 21 déc 2011;103(24):1884-98.
2. Giron-Michel J, Azzi S, Ferrini S, Chouaib S, Camussi G, Eid P, et al. Interleukin-15 is a major regulator of the cell-microenvironment interactions in human renal homeostasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* févr 2013;24(1):13-22.
3. Giron-Michel J, Azzi S, Khawam K, Mortier E, Caignard A, Devocelle A, et al. Interleukin-15 Plays a Central Role in Human Kidney Physiology and Cancer through the γc Signaling Pathway. Meurs EF, éditeur. *PLoS ONE.* 21 févr 2012;7(2):e31624.